

AZ IMMUNFLUORESzcENCIA ALKALMAZÁSA A MIKROBIOLÓGIÁBAN

Doktori értekezés

VARGA KÁROLY



Készült: SZOTE Központi Klinikai Mikrobiológiai
Laboratóriumban

Szeged, 1985

- 3.1. Az immunfluoreszcens mikroszkóp alkalmazása a virus diagnosztikájában
- 3.1.1. CMV és Rota virus specifikus IgM és IgG típusu immunoglobulinok kimutatása
- 3.1.1.1. A CMV virus
- 3.1.1.2. Primer Human Embriónális Fibroblaszt kultúra készítése CMV virus tenyésztéshez
- 3.1.1.3. A szövet fertőzése
- 3.1.1.4. Az antigén készítése tárgylemezen
- 3.1.1.5. Az ellenanyag titrálása
- 3.1.1.6. Összehasonlító CMV specifikus ellenanyag meghatározás KKR és I.I.F. segítségével
- 3.1.2. A Rota virus és az I.I.F.-val történő specifikus immunoglobulinok kimutatásához szükséges antigén készítése tárgylemezen
- 3.1.2.1. Összehasonlító vizsgálatok Rota virus specifikus ellenanyagok meghatározása céljából KKR-val és I.I.F.-val
- 3.2. Az immunfluoreszcencia alkalmazása a bakteriológiában
- 3.2.1. A Bacteroides fragilis
- 3.2.2. A Bacteroides fragilis antigén kimutatása direkt immunfluoreszcenciával
- 3.2.3. A tenyésztéssel és a direkt IF-val kapott eredmények összehasonlítása

- 3.3. Az immunfluoreszcencia alkalmazása a parazitológiában
- 3.3.1. Malária ellenes immunglobulinok kimutatása
 - 3.3.1.1. A Plasmodiumok kimutatása
 - 3.3.1.2. Különböző Plasmodiumfajtákra specifikus immunglobulinok titerének megállapítása
 - 3.3.1.3. Az IIF-val és az IHT-val kapott eredmények összehasonlítása
- 3.3.2. Toxoplasma gondii specifikus immunglobulinok kimutatása
 - 3.3.2.1. A Toxoplasma gondii kimutatása
 - 3.3.2.2. Az antigén készítése tárgylemezen
- 3.3.3. Entamoeba histolytica specifikus IgM és IgG típusu immunglobulinok kimutatása
 - 3.3.3.1. Az Amoebák kimutatása
 - 3.3.3.2. Az antigén készítése tárgylemezen
 - 3.3.3.3. Összehasonlító vizsgálatok Amoeba specifikus immunglobulinok kimutatása céljából KKR-val és IIF-val
- 4. ÖSSZEFOGLALÁS

1. BEVEZETÉS

COONS és munkatársai /1941, 1942, 1945/ sikerrel jeleztek különböző immunglobulinokat fluoreszcens festékekkel. Olyan mikroszkóp alkalmazásával továbbá, amely ultraibolya fénnnyel világítja meg a vizsgálandó preparátumot, egy korszerű szerológiai módszert sikerült kidolgozni. Ennek lényege, hogy a vizsgálandó preparátumhoz valamilyen immunglobulin segítségével fluoreszkálásra képes anyagot, ún. fluorkrómot kapcsolunk. Ezt a fluorkrómot ultraibolya fénnnyel megvilágítva gerjesztjük. A gerjesztés során a fluorkróm molekulái magasabb energiaszintre jutnak. Az alapállapotba való visszatéréskor a felesleges energiát a molekulák fotonok alakjában kisugározzák, amely fényjelenségben nyilvánul meg. Számunkra a vizsgálatok során ennek a fényjelenségnek az intenzitása a lényeges.

Az immunglobulinok konjugálás előtti frakcionálási, tisztítási, majd konjugálás utáni tisztítási módszereinek fejlődésével, valamint a fluoreszcensz mikroszkóp optikai tényezőinek javulásával a módszer általánosan elterjedtté vált. Alkalmazzák a hisztológiában, kémiában, biológiában, immunológiában, mikrobiológiában stb. A fluoreszcensz technika alkalmazásának az orvosi diagnosztikában számos előnye van;

1. Kórházba kerüléstől számított 3-4 órán belül diagnózist adhat
2. Antibiotikus therápiára megfelelő javallat nyerhető
3. Antivirális therápia vonatkozásában eligazít

4. Keresztfertőzések ellenőrzéséhez laboratóriumi módszert ad
5. Hirtelen halál esetén a viruseredetet igazolhatja
6. A betegség késői szakában a viruseredetet bizonyíthatja
7. Ritka kórképek diagnózisában segítséget nyújt
8. Nem tenyésztethető kórokozó ágensek kimutatását teszi lehetővé
9. Távolról beküldött anyagok vizsgálata is lehetséges

Laboratóriumunkban 1980 óta alkalmazzuk az immunfluoreszcensz technikát, elsősorban a vírusfertőzések gyors megállapításának céljából.

A Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratóriumban az alábbi vírusok diagnózisára van lehetőségünk a szóbanforgó módszerrel

VIRUSOK:

Rota

Herpes

Mumps

Lymphocytás choriomeningitis virusa

Adeno

Cytomegália

Epstein - Barr

Alkalmazzuk ezentúl az alábbi mikroorganizmusok által létrehozott specifikus ellenanyagok meghatározására:

Toxoplasma gondii

Entamoeba histolytica

Munkánk során CMV, Rota vírusok, valamint a Toxoplasma gondii, és a különböző plasmódium törzsekre specifikus ellenanyagok immunfluoreszcensz technikával való kimutatásának eredményeit

állítjuk párhuzamba más szerológiai módszerekkel, és ezen keresztül szeretnénk a módszer megbízhatóságát bemutatni, ugyanakkor célunk az immunfluoreszcenz módszer számos előnyének bizonyítása is.

Itt szeretném megemlíteni, hogy dr. Tomcsik József magyar származású, de Svájcban dolgozó egyetemi tanár elsők között volt Európában, aki elterjesztette és magas szintre emelte az immunfluoreszcenz technikát /1, 2/.

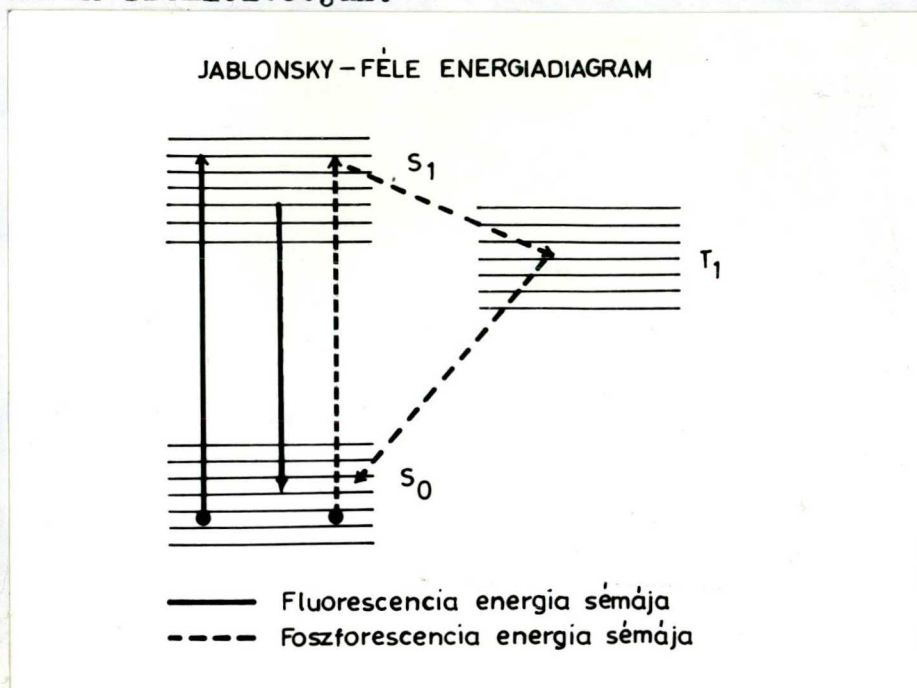
2. ESZKÖZÖK, ANYAGOK, MÓDSZEREK /3/

2.1. A fluoreszcencia alapjelenségeinek ismertetése

Ismert fizikai tény, hogy az alapállapotban lévő atomok vagy molekulák elektronjai meghatározott S_0 kvantumpályán keringenek. Az atomokat vagy molekulákat megfelelő energiájú fénysugárral gerjesztve, az elektronok az alapállapothoz viszonyítva egy magasabb, S_1 energiaszintre jutnak. Az atomszerkezet törvényei alapján a gerjesztés megtörténnével az egyensúlyi állapot visszaállítása céljából ezek a gerjesztett atomok vagy molekulák eredeti energia állapotukat nyerik vissza. Ez úgy lehetséges, hogy a gerjesztés során felvett energia többletet az alapállapotba való visszatéréskor kisugározzák, emittálják.

A fotonok alakjában történő energiakisugárzás fényjelenségből áll. Az olyan fénykibocsátást, amely gerjesztés hatására következik be, lumineszcenciának nevezzük. A ger-

jesztés történhetik elektromágneses sugárzás korpuszkuláris sugárzás, vagy kémiai folyamatok következtében. Lumineszkáláskor az azonos időpontban gerjesztett különböző atomok, molekulák nem egy időben emittálnak. A lumineszcencia tehát a gerjesztő fény kioltása után nem szűnik meg azonnal, hanem hosszabb-rövidebb idő alatt alszik ki. A lumineszcenciának két fajtáját különböztetjük meg, mégpedig a fluoreszcenciát és a foszforeszcenciát. Fluoreszcenciáról beszélhetünk abban az esetben, ha az elektron, emissziókor abból a magasabb energia állapotból esik vissza, - valamely alacsonyabb energia állapotba - amelybe a gerjesztés során jutott. A fluoreszcencia kialakulási ideje általában jóval kisebb, mint a foszforeszcenciáé. A különbség a fluoreszcencia és a foszforeszcencia között annyi, hogy az utóbbinál az abszorpciós és emissziós energia állapot között legalább egy közbeeső energia állapot is van. A fluoreszcencia energia állapotának sémáját a következő ábrán szemléltetjük.



1. ábra

Jablonski-féle energiadagram



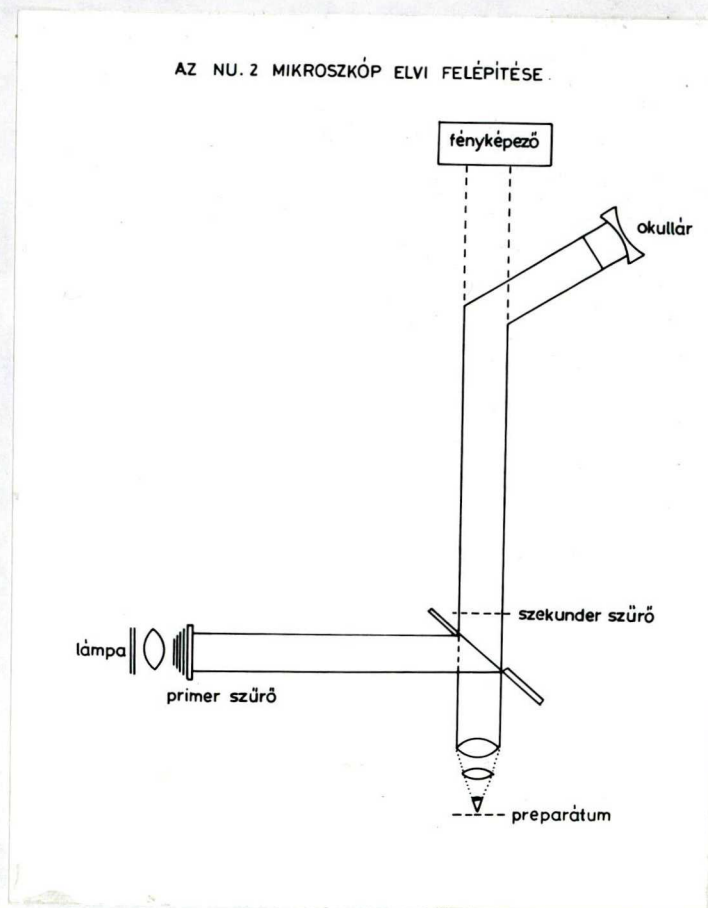
Az ábrán csupán az az eset látható, amikor az elektron rögtön az alapállapotba esik vissza, és így az emittált foton energiája éppen egyenlő a gerjesztett foton energiájával. Természetesen ez idealizált eset. Az alapállapotba történő visszajutás ugyanis közbeeső energianívókon keresztül történik. Így nyilvánvaló, hogy a gerjesztő fotonok energiája nagyobb, mint az emittált fotonoké. A Stokes féle törvény általánosan alkalmazható a fluoreszcenciára. Kimondja, hogy az emittált fotonok energiája kisebb a gerjesztő fotonok energiájánál. Stokes szerint továbbá, egy adott fénysugár annál nagyobb energiával rendelkezik minél kisebb a hullámhossza. Ez azt jelenti, hogy mi a gerjesztés során nagy energiájú, tehát rövid hullámhosszú sugárzást alkalmazunk, hiszen a célunk az, hogy a gerjesztett anyag által emittált fotonok energiája, tehát a gerjesztett fény minél nagyobb legyen.

2.2. A fluoreszcenz mikroszkóp és optikai tényezői

2.2.1. A mikroszkóp felépítése

Az immunfluoreszcenz vizsgálatok végrehajtásához megfelelő optikai eszközökkel kell rendelkezünk. Munkánk során fluoreszcenz feltétellel ellátott NU-2. jelzésű mikroszkópot alkalmaztunk. A mikroszkóphoz fényképezőgép csatlakoztatható, ennek segítségével készítettük felvételeinket. Az elkészített preparátumot ráeső ultraibolya fény alkalmazásával vizsgáltuk. A mikroszkóp elvi felépítését a követ-

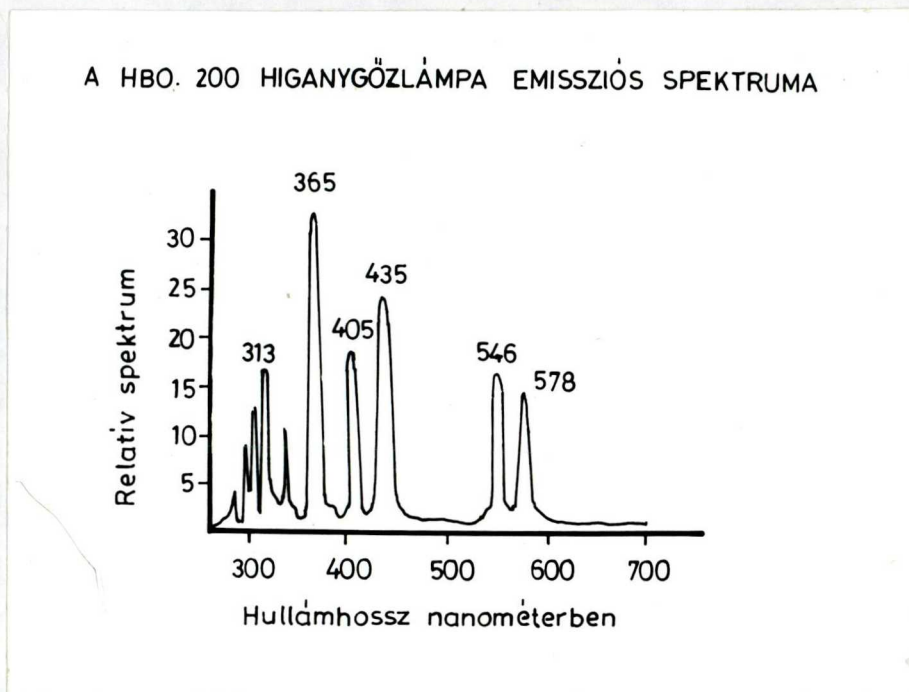
kező ábrán mutatjuk be.



2. ábra.

A mikroszkóp elvi felépítése

A kellő energiájú sugárzást egy HBO 200 jelzésű magasnyomású higanygőzlámpa szolgáltatja /4/. A magasnyomású higanygőzlámpa kapcsolásakor külön erre a célra készített előtétkészüléket kell alkalmaznunk. Ez a berendezés biztosítja a lámpa bekapcsolásához szükséges feszültséget a két elektród között. A lámpa által kibocsájtott fény jól jellemezhető az emissziós görbe segítségével /5/.



3. ábra.

A HBO 200 jelzésű lámpa emissziós spektruma

2.2.2. A primer szűrők

A lámpa által kibocsájtott fény először a lámpaházhoz csatlakoztatott hőszűrőn, majd az ugynevezett primer szűrőn halad keresztül. A hőszűrő biztosítja, hogy a primer szűrő ne károsodjék a lámpa által sugárzott hőtől. A primer szűrők feladata, hogy a lámpa által sugárzott különböző hullámhosszusú fényből csak a gerjesztés szempontjából lényeges hullámhosszusú fénysugarakat engedje át. Ezek a 496 nm hullámhosszusú fénysugarak, amelyek a gerjesztendő fluoreszcens festékre jutnak. Primer szűrőként a B 224 g jelzésű szűrőt alkalmaztuk.

2.2.3. A szekunder szűrők

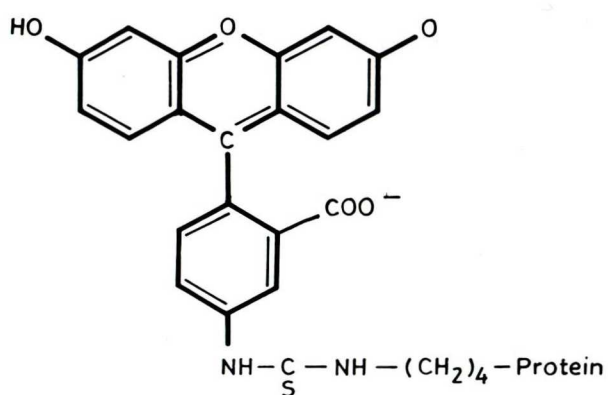
A preparátumról visszaverődő fénynek át kell haladnia az un. szekunder szűrőkön. Ezek feladata, hogy a preparátumról visszaverődő gerjesztő sugárzást kiszűrje és csak a gerjesztett fluoreszcensz festék által kibocsátott és arra jellemző fénysugarakat engedje át /6,7/. Ezek a fénysugarak az 540 nm hullámhossz tartományba esnek. Munkánk során a G.G.9/1 és a O.G.1/1 jelzésű szűrők kombinációját alkalmaztuk szekunder szűrőként.

2.3. A szérum antitestek fluorkrómmal való jelzése és tisztítása

2.3.1. Konjugálás

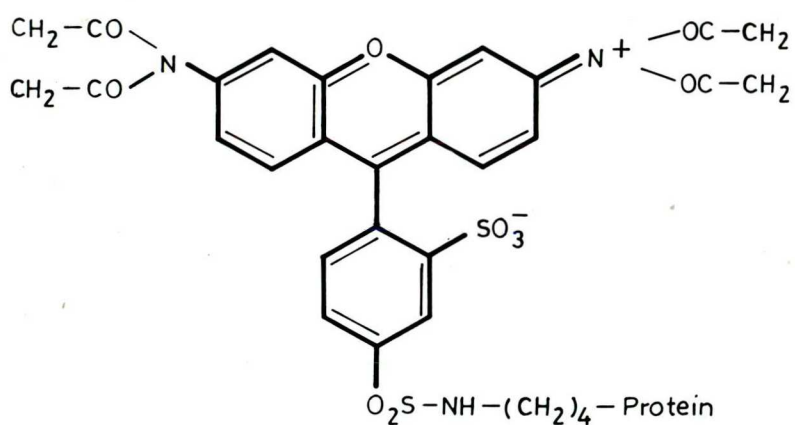
A fehérjéket, beleértve a szérum antitesteket is, fluoreszcensz festékekkel jelezhetjük anélkül, hogy az adott fehérjék biológiai, immunológiai aktivitásukat elvesztenék. COONS és munkatársai fluorkrómmal jelölt immunglobulint használtak a szövetekhez fixált antigének kimutatására /8,9,10/. Közleményük megjelenése óta eltelt évtizedekben számos speciális fehérjejelölési módszer vált ismertté. A gyakorlatban RIGGS és munkacsoportja által leírt fluoreszcein-izotiocianát /11/, /továbbiakban FITC/, valamint CHADWICK és munkatársai által közölt Lissamin-Rhodamin /12/, továbbiakban RB 200/ jelölést használják a leggyakrabban. A következő ábrák a fehérje, valamint a két általánosan használt fluorkróm kémiai kötését mutatják be.

A PROTEIN FLUORKRÓMMAL VALÓ JELÖLÉSE:
A LYSIN SZABAD 3-AMINO CSOPORTJÁHOZ
KAPCSOLT FITC



4. ábra.

A LYSIN 3-AMINO CSOPORTJÁHOZ KAPCSOLT RB-200

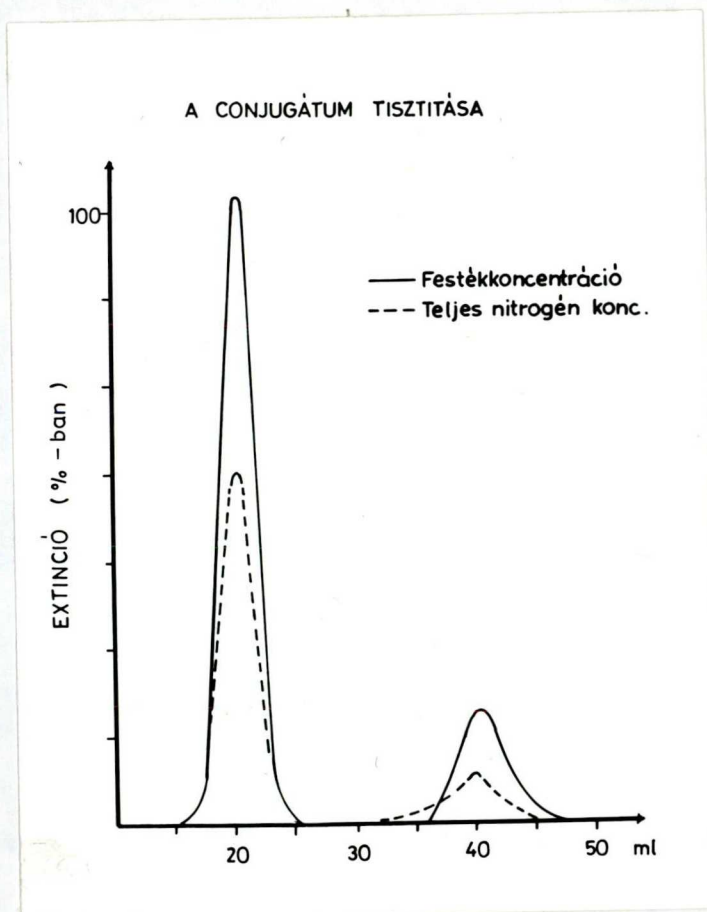


5. ábra.

Látható, hogy a konjugálás során a fehérje a lizin szabad 3-amino csoportján keresztül kapcsolódik az első esetben a tiokarbonát gyökhöz, a második esetben pedig a szulfát csoporthoz.

2.3.2. Tisztítás

Az így konjugált fehérje, valamint a kötetlen festék szétválasztásának, azaz a konjugátum tisztításának általánosan használt módszere a faszén extrakciós módszer, és a Sephadex gélfiltrációs eljárás /13/. A következő ábra FOTHERGILL és NAIRN által 1961-ben leírt Sephadex G-25-ös oszlopon végzett kromatográfiás eljárás eluciós görbéjét mutatja /6. ábra/.



2.3.3. A fluorkróm és protein aránya

A fluoreszcensz módszer kivitelezéséhez szükséges tényezők közül az egyik legfontosabb a reagens. Ennek minőségét alapvetően meghatározza a benne található protein és fluorkróm mennyisége. A konjugátum tehát jól jellemezhető a benne található fluorkróm és protein mennyiségének hányadosával; F/P. A fluorkróm mennyiségét jelöljük nagy F-fel, a protein mennyiségét pedig P-vel. Az értékelés során nagyon gyenge fluoreszcenciát kapunk, ha ez az érték 0.5-nél alacsonyabb. A preparátumunk viszont túlfestődik, ha a hányados értéke 1.5-nél nagyobb. A helyes arányt tehát az 1.5 és a 0.5 érték között kell keresnünk. Alapvető szempont még a konjugátum készítésekor, hogy a nativ ellenanyag specifitása a festék kötéssel ne változzék /14/.

2.3.4. A konjugátum

A vizsgálatainkhoz mint konjugátumokat a Human Oltóanyagtermelő és Kutató Intézet által gyártott /specifikáció 5 E. Sh. AHu IgG /H/ FITC; 5 E. Sh. AHu IgM /H/ FITC/; rendelkezésre bocsátott és a Hyland cég által készített /specifikáció IgM 003444 160 AA/ FITC-cel jelzett állatban termelt anti-human immunglobulinokat /IgG 003444 190 11; a továbbiakban Ah. ./ alkalmaztunk.

Az állatban való ellenanyagtermelés után a kapott Ah. globulinokat fisztitották és frakcionálták /15/. Így sikerült a

komplex immunszérumból kinyerniük a különböző immunglobulin frakciókba tartozó globulinokat. Ez után következett az Ah . globulinok fluorkrómmal történő jelzése /15,11,12/. Ismételt tisztítás után kerül sor a már jelzett tisztítására /13/, és liofilezésére. A különböző immunglobulin frakciókba tartozó immunglobulinok így kerülnek forgalomba. Vizsgálataink során párhuzamosan használtunk IgM és IgG FITC-cel jelzett Ah . globulinokat. Felhasználáskor a liofilezett ampulla tartalmát 0.01 %-os NaN_3 tartalmu desztillált vízben oldjuk. A mikroszkóppal történő helyes értékeléshez meg kell találnunk az optimális konjugátum higitást. Ehhez ismert titerű pozitív savókat alkalmaztunk, és a konjugátum különböző higitásait elkészítve /1:5; 1:10; 1:20 stb./ megállapítottuk az optimális higitást. Az a legnagyobb konjugátum higitás a megfelelő, ahol az ismert titerű pozitív savók a reájuk jellemző pozitivitást adnak. Tulságosan alacsony higitás esetében a preparátum tulfestődik, ha pedig túl nagy a higitás a fluoreszcencia nem kellő intenzitású.

2.3.5. A háttérfluoreszcencia kioltása, a preparátum értékelése

A preparátum értékelésekor igen gyakran zavaró tényező lehet az erős háttérfluoreszcencia. Ennek kioltására használjuk az Evansblue 1:5000-es higitását. A methodika utolsó lépéseként alkalmazzuk ezt az oldatot, mégpedig úgy, hogy készítményünket ezzel az oldattal 2-5 percig festjük. Mosás után fedjük a pre-



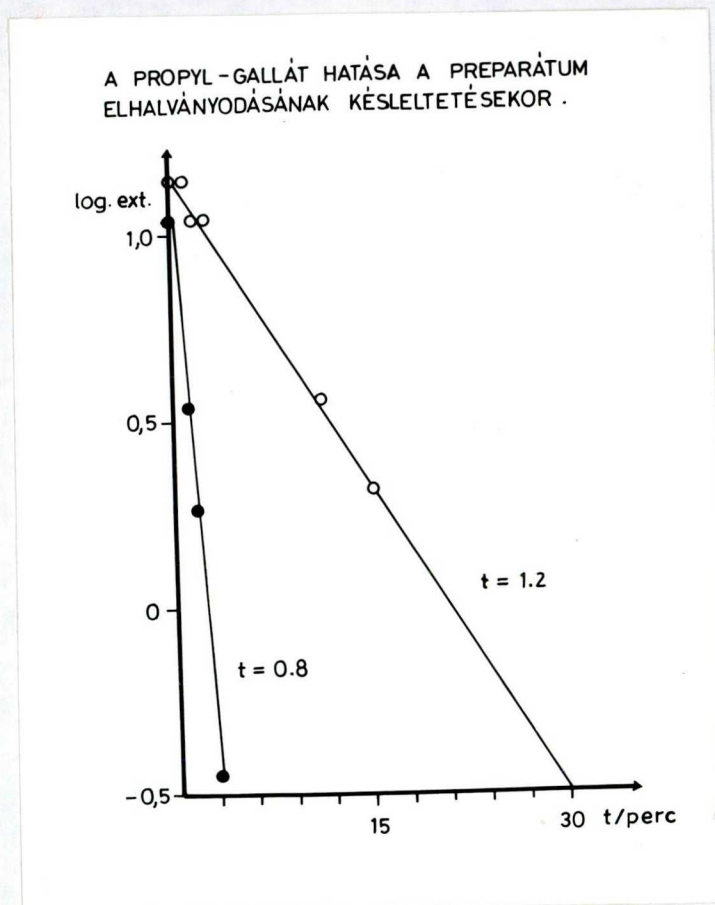
parátumot. Ezek után kerül sor az értékelésre. Az eredmény akkor pozitív, ha a vizsgálat során élénk almazöld fluoreszcenciát tapasztalunk. Fontos kritérium még, hogy a látótérben lévő sejtek legalább 50 %-a élénken fluoreszkáljon. A látótérben lévő sötét sejtek vagy nem tartalmaznak antigént, vagy más okból nem kötődött hozzájuk az immunglobulin. A fluoreszcens methodikát helyesen végezve a párhuzamosan elkészített kontrol preparátumok az elméletileg várt pozitív, illetve negatív eredményt adják. A sejt ama része, ahol a vírusreplikáció történik, sokkal erőteljesebben fluoreszkál.

Festődhetik az egész sejt, de pl. Rota vírus esetében a sejtmembrán erőteljesebben festődik a sejt többi alkotóelemeinél /16/. Más esetekben erőteljesebben festődhetik a sejtmag, maghártya stb. Mindezeket az értékelés folyamán figyelembe kell vennünk.

2.3.6. A preparátum elhalványodásának késleltetése, a preparátum fedése

Lényeges momentum a fluoreszcencia korai elhalványodásának meggátlása érdekében, vajon a preparátum fedése során milyen oldatot cseppentünk a fedőlemez alá. Az elhalványodás gátlása különösen abban az esetben fontos, ha a preparátumról felvételt akarunk készíteni, vagy hosszabb ideig akarjuk tanulmányozni. H. GILON és W. SEDAT szerint a propilgallát 2-5 %-os vizes glicerines oldata kellő mértékben késlelteti az elhal-

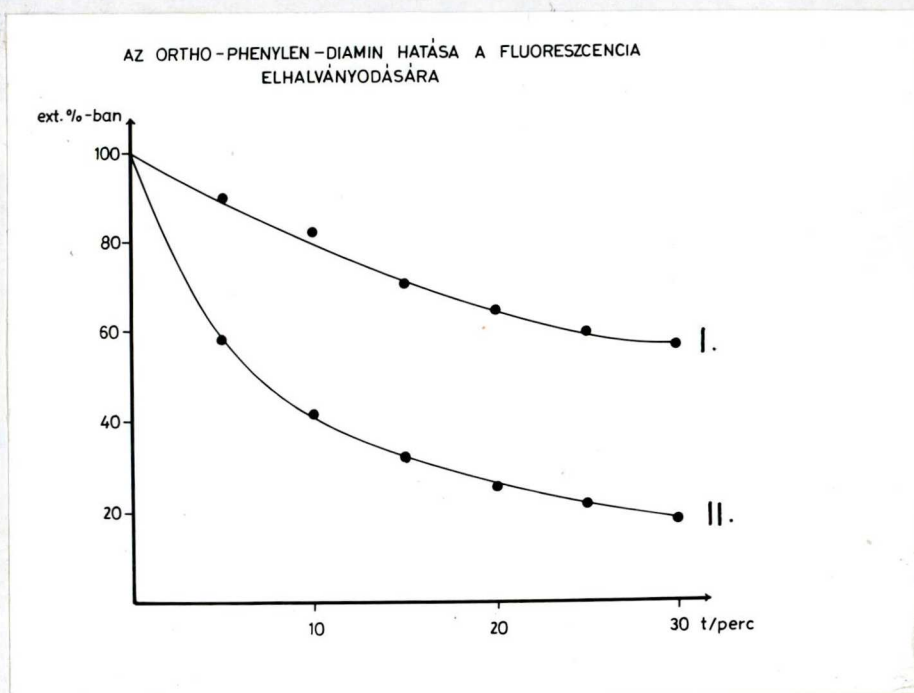
ványodást. Az intenzitás csökkenésének mértékét a propilgallát nélkül, illetve annak hozzáadásával a következő grafikon szemlélteti /17/.



7. ábra.

A fluoreszcencia elhalványodásának gátlása propilgaláttal

G.P. JONSON és munkacsoportja a para-feniléndiamint ajánlja az elhalványodás késleltetésére. 80 % glicerint tartalmazó PBS-ben oldottak 5 % para-feniléndiamint. Az intenzitás csökkenésének mértékét az alábbi grafikonon mutatjuk be /18/.



I. ortho-feniléndiamint alkalmazva

II. ortho-feniléndiamin nélkül

13. ábra.

Nemcsak a tárgylemez fedésekor, hanem már a methodika korábbi fázisában, a konjugátum higitásakor, a savóminta higitásakor, valamint a mosási lépések során is lehet adalék anyagot a rendszerhez adni a fluoreszcencia elhalványodásának késleltetése céljából /18/. Ezekben az esetekben a NaN_3 1 ezrelékének vi-
zes oldatát ajánlják a szerzők. Ezeket az anyagokat azonban nem lehet egy bizonyos koncentrációnál nagyobb mennyiségben alkalmazni, mert az már a fluoreszcensz festék extinkciójának csökkenéséhez vezetne /17,18/.

2.4. Az immunfluoreszcenz mikroszkópos vizsgálati módszerek és azok jellemzése

Az immunfluoreszcenz vizsgálathoz anyagunkat kétféle módon preparálhatjuk.

a./ direkt eljárással /továbbiakban I.F.A./ /8,19,20/.

b./ indirekt eljárással /továbbiakban I.I.F.A./ /19,21/.

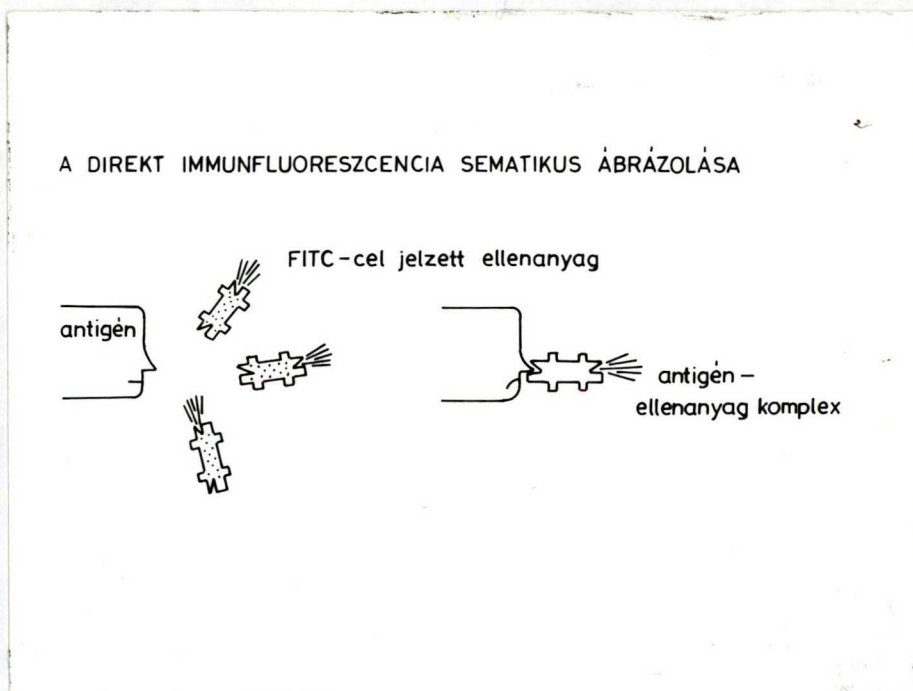
2.4.1. A direkt immunfluoreszcenz eljárás

A direkt eljárás egyszerűbb és gyorsabban kivitelezhető, mint az indirekt módszer. A direkt eljáráshoz egy adott antigénre specifikus, jelzett immunglobulinra van szükségünk. Ennek előállítása nem egyszerű feladat, beszerzési ára is meglehetősen magas. Ez nyilvánvalóan megnöveli a vizsgálat költségét. A direkt módszert először COONS és KAPLAN /1950/ írta le /8/. Rendkívül gyors, specifikus és egyszerű módszernek bizonyult. Lényege, hogy a feltehetőleg antigént tartalmazó vizsgálati anyagot /széklet, liquor, vizelet, szövettani metszet stb./ megfelelő előkészítés után az adott antigénre specifikus, jelzett ellenanyaggal inkubálunk. Antigén jelenlétekor az antigén ellenanyag kötődés lezajlik. A feleslegben maradt jelzett ellenanyagot a rendszerből kimossuk, majd a preparátumot a

2.4.3. fejezetben ismertetett módon fedjük. Ezután vizsgáljuk a preparátumot immunfluoreszcenz mikroszkóppal. Abban az esetben, ha a vizsgálati anyag tartalmaz antigént, amely megkötötte a specifikus FITC-cel jelzett immunglobulint, élénk alma-

zöld fluoreszcenciát tapasztalunk. Természetesen szükséges a kontroll preparátumok elkészítése az ál pozitív eredmények elkerülése érdekében. A következő kontroll lemezek párhuzamos beállítását kell elvégeznünk.

1. antigén + konjugált nem immunszérum
2. a./ antigén + nem konjugált antiszérum
b./ antigén + konjugált antiszérum
3. a./ antigén + nem konjugált immunszérum
b./ antigén + konjugált antiszérum.



8. ábra.

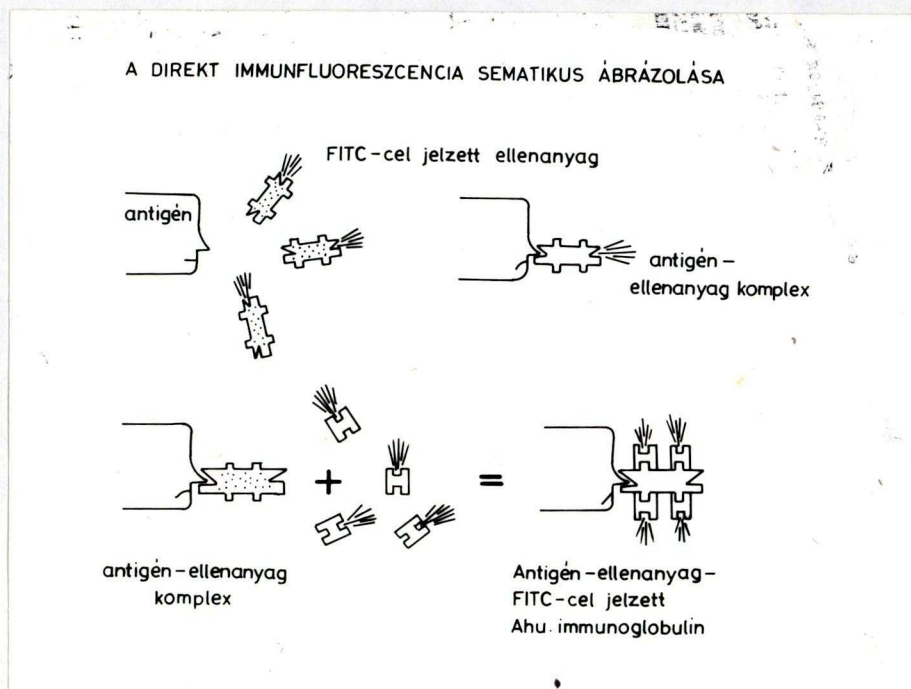
Az I.F. módszer sematikus ábrázolása.

2.4.2. Indirekt immunfluoreszcenzs technika

Az első leírás 1954-ből WELLER és COONS-tól származik, akik vizsgálataikhoz állatban termelt anti-human globulint jeleztek FITC-cel /22/.

Az indirekt immunfluoreszcenciás módszer kivitelezése több lépésből áll, és hosszabb időt vesz igénybe, mint a direkt módszer. Az indirekt eljárást leggyakrabban a savóminták ellenanyag tartalmának meghatározására alkalmazzuk. Vizsgálatainkhoz legtöbbször előre elkészített antigéntartalmu fixált sejteket hordozó tárgylemezt használunk. A vizsgálandó vérszérumból sorozathigitást készítünk, majd a higitás minden egyes cseppjéből optimális mennyiséget az előre elkészített, antigént hordozó tárgylemezre cseppentünk.

A savómintát az antigént tartalmazó sejtekkel 37°C-on inkubáljuk, majd a feleslegben maradt ellenanyagot tartalmazó savót mosással eltávolítjuk. A mosás és a szobahőn való szárítás után cseppentjük az antigén-ellenanyag komplexhez a FITC-cel jelzett anti-human immunglobulint a megfelelő higitásban. Ezután ismét inkubáció következik. Ez alatt az idő alatt az antigén ellenanyag komplexhez kapcsolódik a FITC-cel jelzett anti-humán ellenanyag, tehát az ellenanyag ellenanyaga. Az inkubációs idő leteltével a feleslegben marad konjugatumot mosással eltávolítjuk, majd sor kerül a fluoreszcencia elhalványodásának kiegészítésére szolgáló lépésekre és a preparátum fedésére a 2.3.6. fejezetben ismertetett módon.



9. ábra.

Az I.I.F. sematikus rajza

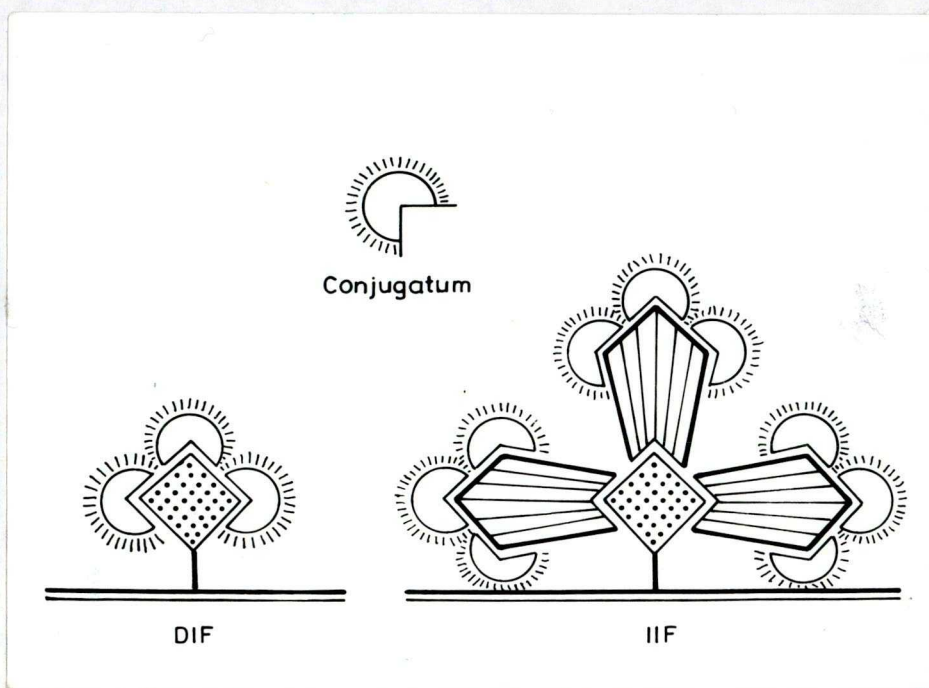
Természetesen az álpozitivitás kiküszöbölése céljából a vizsgálat során különböző, de azonos körülmények között párhuzamosan elkészített kontroll preparátumot kell beállítanunk.

1. antigén + PBS + konjugátum
2. antigén + normál szérum + konjugátum
3. nem fertőzött szövet + vírus antiszérum + konjugátum.

2.4.3. A két módszer rövid összehasonlítása

Az előzőekben ismertetett két módszernek külön-külön megvannak a maguk előnyei és hátrányai. A direkt módszer javára írhatjuk, hogy nagyon gyors, és igen specifikus módszer. Óriási előny, hogy segítségével az antigént tudjuk rövid idő alatt kimutatni, és ennek köszönhető, hogy a direkt eljárást alkalmazva egyetlen anyag vizsgálata után már eredményt adhatunk ki. Hátránya, hogy egy adott antigénre specifikus ellenanyag igen nehezen állítható elő, valamint beszerzési ára is meglehetősen magas.

Az indirekt módszer segítségével leginkább ellenanyag meghatározásokat végzünk, bár lehetőség van antigén kimutatására is. Ez utóbbi azonban több lépésből álló, hosszadalmasabb eljárás. Az indirekt módszer előnye más szerológiai eljárással szemben, hogy segítségével lehetőség nyílik a korai, tehát IgM típusba tartozó immunglobulinok kimutatására. Előnyként írhatjuk az indirekt eljárás javára a direkt módszerrel szemben, hogy erősebb fluoreszcenciát kapunk. Ennek okára könnyen rájöhethetünk, ha a következő ábrát jól megfigyeljük.



10. ábra.

Direkt, illetve indirekt I.F. során kapcsolódó
FITC mennyisége

Az ábrán látható, hogy az indirekt módszer esetében a jelölt anti-human globulin több helyre tud kapcsolódni, mint a direkt eljárás esetében, és így nyilvánvalóan több festék marad a sejtekben, ezért értelemszerűen nagyobb lesz a fényintenzitás /23/.

3. A KÖZPONTI KLINIKAI MIKROBIOLÓGIAI LABORATÓRIUMBAN
VÉGZETT IMMUNFLUORESZCENZSZ VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

3.1. Az immunfluoreszcenzsz mikroszkóp alkalmazása a vírus
diagnosztikában.

3.1.1. CMV és Rota vírusra specifikus IgM és IgG típusu
immunglobulinok kimutatása.

3.1.1.1. A CMV jellemzése

A Cytomegalovirus morfológiailag a herpesvirusokhoz áll legközelebb. Gömb alakú vírus, peplonnal rendelkezik, éter iránt érzékeny. A vírus emberről emberre terjed. Sok egyéb megbetegedésen kívül fejlődési rendellenességet is okozhat. A magzat méhben való fertőződése úgy következik be, hogy a vírust tartalmazó leukocyták a véráram segítségével a fiatal magzathoz jutnak, ahol azután a CMV vírusok a magzat fibroblaszt sejtjeiben gyors szaporodásnak indulnak. Nem csak a véráram segítségével juthatnak el azonban a vírusok a magzathoz. Az a tény ugyanis, hogy terhesek méhnyakváladékában is sokszor kimutatható a CMV vírus, arra utal, hogy a szülőutakon felfelé haladó vírus is okozhatja az infekciót /24,25/.

A CMV fertőzés igen gyakran előfordul transzplantációban részesült, vagy vérátömlesztést kapott betegeknél.

A fentiek szerint tehát a CMV vírusfertőzéseket három csoportba sorolhatjuk: /15/

1. újszülöttkori fertőzések
2. gyermek- és felnőttkori fertőzések
3. transzfuziót és szervátültetést követő fertőzések csoportjába /24/.

Az anya terhesség alatti fertőződése okozza a veleszületett, újszülöttkori virushordozást. Ennek igen súlyos következményei lehetnek, hiszen a vírus embrio- vagy főtotoxikus hatásai közé tartoznak a halláskárosodás, mikrokephalia, máj és lépmeagnagyobbodás. Mononukleosis infectiosa lehet a következménye a gyermek és felnőttkori fertőzéseknek /24,25/. A transzfundáltakon és a transzplantáltakon poszttranszfúziós szindróma alakulhat ki.

3.1.1.2. Primer human embrionális fibroblasztkultúra készítése

A CMV kizárólag primer human embrionális fibroblasztkulturán tenyésztethető /24/. A virustenyésztéshez használt kultúrát a következőképpen készítjük: a 4-12 hetes embriódarabokat mechanikus szétdarabolás után tripszinnel emésztjük 37°C-on 3x10 percig, állandó kevergetés közben. Az első tripszinoldatot elöntjük, a 2. és 3. oldatot gézen át szűrjük. Így eltávolítjuk a még meg nem emésztett nagyobb szövetdarabokat, és az esetleg szilárd részeket. Szűrés után a fibroblaszt sejteket tartalmazó szűrletet Ph 7 PBS-pufferben mossuk. A mosási fázist centrifugálás követi. Janetzky T. centrifugában 800-as fordulatszámmal 10-15 percig ülepitjük. A mosást 3x ismételjük. A

harmadik mosás után a sejteket penicillin, gentamicin, és streptomycin antibiotikumot, nistatint, valamint antimikoplazmás szereket tartalmazó Parker 199 tápfolyadékba szuszpendáljuk. A tápfolyadék a fent említetteken kívül 10 % borjuszavót is tartalmazott. Az 50.000 sejt/ml szuszpenziót szövettenyésztő edényekbe töltjük, majd légterében 5 % CO₂-t tartalmazó termosztátba helyezzük. Egy nap elteltével a sejtek kitanádnak a szövettenyésztő edény falára, 4-5 nap múlva pedig fertőzéshez megfelelő állapotba kerülnek. A primer sejteket cseppfolyós nitrogénben hosszú ideig tárolhatjuk.

3.1.1.3. A szövet fertőzések /21,26/.

A fertőzés kezdetekor a 10 % borjuszavót tartalmazó Parker 199 szaporító tápfolyadékot leöntjük a fertőzni kívánt szövetről. AD 169 CMV törzs 3x10⁶ /ml citopatogén egységet /továbbiakban CPE/ tartalmazó tápfolyadékának 0,1 milliliterét juttatjuk az 50 cm² alapterületű 80 % monoliert alkotó human embrionalis fibroblasztot tartalmazó Greiner szövettenyésztő edényekbe. Ezután az edényeket lezárjuk, és egy órára 37°C-os termosztátba helyezzük. Ez alatt az idő alatt a vírus adszorbeálódik a sejtek felületére. Az adszorpciós idő leteltével a szövetre megfelelő mennyiségű Parker 199 tápfolyadékot viszünk. A szövettenyésztő edényeket ezután 37°C-os termosztátba helyezzük. A következő napokban folyamatosan figyelemmel kísérjük, hogy a vírus milyen mértékben fejti ki citopatogén

hatását. A vírus által a szöveten létrehozott citopátiás hatás jellemzésére az 1-4 kereszt jelölést alkalmazzuk. További feldolgozásra a 3-2 kereszttel jellemezhető szövetkultúrák felelnek meg.

Az értékelhető citopátiás hatás kialakulásának ideje függ a fertőző vírus tulajdonságaitól. Pl.: a Herpes vírus 1. típusa már a fertőzést követő 2-3. napon észlelhető citopátiás hatást hoz létre. Ezzel szemben a vizsgálatainkhoz alkalmazott CMV AD 199 törzse 7-8 nap alatt fejti ki megfelelő mértékű citopatogén hatását /27/.

A kellő nagyságú citopátiás hatás kialakulása után kerül sor a fertőzött szövetkultúra további feldolgozására /21,27/.

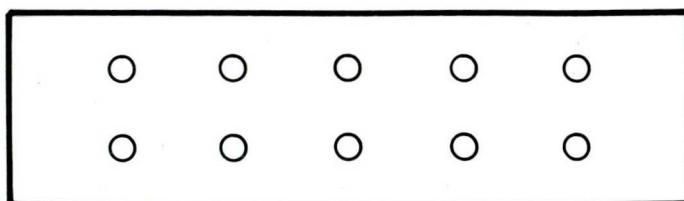
3.1.1.4. Az antigén tartalmu sejtek tárgylemezre vitele

A fenti módon fertőzött szövetről a citopathogén hatás kialakulása után centrifugába öntjük a fenntartó tápfolyadékot, majd a tenyésztő edény faláról eltávolítjuk a még tapadó sejteket. Ez végezhető mechanikai uton, az edény falának kaparásával, vagy minimális mennyiségű tripszin segítségével.

A 30 cm² tenyésztőedénybe 0.5 ml. 0.025 %-os tripszinoldatot mérünk, majd annyi tripszinoldatot hagyunk az edényben, hogy filmszerűen elfedje a sejteket. Két perc elteltével a tapadó sejtek is eltávolíthatók. Ezek után PBS-ben való mosással eltávolítjuk a tápfolyadék maradványait, és a

tripszint. A mosást centrifugálás követi 800 RPMI fordulaton 10 percig Janetzky T.24. típusu centrifugában. A műveletet 3x megismételjük. A harmadik mosás után mosó folyadékot elöntjük, majd a centrifugacső aljában maradó sejtekből tömény szuszpenziót készítünk PBS-ben /21/. Az így elkészített szuszpenzióból tárgylemezre egy-egy cseppet viszünk, és inverz mikroszkóppal ellenőrizve beállítjuk a megfelelő sejtszámot. Egy látótérben kb. 30-50 sejtnak kell lennie. A fenti módszerrel megfelelő sűrűségűre beállított sejtsuszpenziót ezek után előzetesen alkohollal megtisztított tárgylemezre cseppentjük, két párhuzamos sorba, soronként 5-5 cseppet, az alábbi ábra szerint.

AZ ANTIGÉNT TARTALMAZÓ SEJTEK ELHELYEZÉSE A
TÁRGYLEMEZEN



11. ábra.
Az antigént hordozó lemez

Igy tehát minden lemezünk 10-10 cseppet hordoz. A lemezeken lévő cseppek beszáradását hideg levegő áramoltatásával segítjük elő. 4°C-os acetonban 10 percen keresztül fixáljuk. Fixálás után a lemezeket csomagoljuk és -20°C-on tároljuk. Ezen a hőmérsékleten megfelelő csomagolásban - szilikagél, vagy egyéb nedvszívó anyag használatával - hosszú ideig, akár évekig is eltarthatók.

3.1.1.5. Az ellenanyag titrálása

A fenti módon elkészített tárgylemezen preparált antigént tartalmazó sejtek segítségével mód nyílik a beküldött savóminták ellenanyagtartalmának mennyiségi és minőségi vizsgálatára.

A vizsgálat céljából beérkező savómintákból 0.01 % NaN_3 -at tartalmazó PBS-ben különböző higitásokat készítünk. Az IgM és IgG osztályokba tartozó immunglobulinok kimutatásához a vizsgálandó savómintákat különbözőképpen higitjuk. Az IgM osztályba tartozó immunglobulinok alacsonyabb titerben mutathatók ki, ezért a savómintákat kisebb higitásban visszük az antigént tartalmazó sejtekre, míg az IgG immunglobulinok kimutatásához magasabb savóhigitásokat alkalmazunk. A szokásos higitások:

IgM kimutatása esetén: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20.

IgG kimutatása esetén: 1:40, 1:80, 1:160

Természetesen a vizsgálati mintával párhuzamosan higitást készítünk egy biztosan ismert titerű pozitív és egy negatív

savóból. Az elkészített higitások megfelelő mennyiségét visszük az antigént tartalmazó sejtek cseppjeire, a jegyzőkönyvben előzetesen megtervezett helyekre. Miután a savómintát az antigénre cseppentettük lemezünket nedves kamrába helyezzük és 37°C-on IgG kimutatása esetén 45 percig, IgM típusu ellenanyagok kimutatása esetén 1.5 óráig /21/ inkubáljuk. Az ellenanyaggal való inkubálást PBS-ben való mosás követi, amit háromszor megismétlünk. A FITC-cel jelzett Anti-hüman IgM és IgG immunglobulinokból megfelelő higitást készítünk /IgM esetében 1:10, IgG esetében 1:20/ és ennek a higitásnak a megfelelő mennyiségét visszük az antigén-ellenanyag komplexre.

Abban az esetben, ha a savó tartalmaz specifikus ellenanyagot az antigénnel szemben, akkor az IgM típusu immunglobulinokat kb. egy hónapig mutathatjuk ki. Akkor, ha a fertőzés a vizsgálatot megelőzően egy, vagy több hónapja történt, legtöbbször már csak az IgG típusu immunglobulinok kimutatására van lehetőségünk. Abban az esetben, ha sikerül IgM típusu immunglobulinokat kimutatnunk, friss fertőzésről van szó. Amennyiben csak az IgG típusu immunglobulinok jelenlétét sikerül igazolnunk, akkor a feltételezett reinfekció bizonyításához az szükséges, hogy két, meghatározott időkülömbiséggel /2-3 hét/ levett savómintából legalább négyszeres titerkülömbiséget mutassunk ki.

Vizsgálataink során egyaránt törekedtünk az IgM és IgG típusu immunglobulinok kimutatására minden beérkezett vizsgálati anyagból. Ezt - mint már az előzőekben említettem -

figyelembe kell vennünk az inkubációs idők megállapításakor. Az IgM típusu immunglobulinok kötődéséhez tehát 1.5 óra, az IgG típusu immunglobulinok kötődéséhez pedig 0.5 óra szükséges, 37°C-on, nedves kamrában.

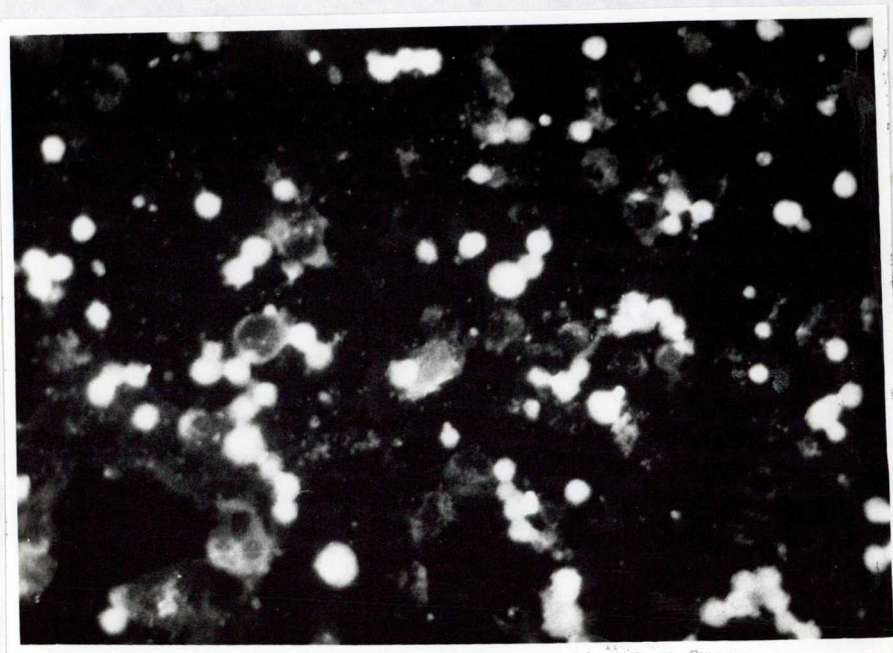
3.1.1.6. Eredmények

Azoknak a betegeknek a savóját, akik a klinikai kép alapján feltehetőleg CMV vírus fertőzöttek, párhuzamosan vizsgáltuk komplementkötési reakcióval és indirekt immunfluoreszcenciával CMV vírus specifikus ellenanyagok kimutatása céljából. Az intézetünkbe érkezett 159 vizsgált anyagból 74 esetben kaptunk immunfluoreszcenciával és komplementkötési reakcióval egyaránt pozitív eredményt. A pozitív esetek mindegyikében immunfluoreszcenciával magas IgG ellenanyagszintet sikerült kimutatnunk. Azokból a savókból, amelyek IgG negatívnak bizonyultak, 20 esetben sikerült CMV specifikus IgM típusu ellenanyagot kimutatnunk. Ezek közül 12 alkalommal igen alacsony titerben bár, de IgG típusu ellenanyagot is sikerült kimutatnunk. 8 savó azonban csak az IgM osztályba tartozó immunglobulinokat tartalmazta. Az a tény, hogy ilyen magas arányban találtunk IgM típusu CMV-re specifikus immunglobulint, abból adódik, hogy a savóminták célzottan érkeztek vesetranszplantáltaktól, gravidáktól, és jellemző tünetekkel kísért megbetegedett gyermekektől és felnőttektől. Megvizsgálva, hogy az IgM pozitív savók milyen betegektől érkeztek, megfigyelhetjük,

hogy ezeknek a vizsgálati mintáknak igen tekintélyes része a gyermek klinikáról származik. A másfél év alatt ugyanis a gyermek klinikáról 42 esetben kértek vizsgálatot CMV specifikus ellenanyagok kimutatása céljából.

Hat esetben sikerült ezek közül CMV specifikus, IgM típusu ellenanyagot kimutatnunk. Ebből három olyan csecsemőktől származik, kiken a CMV fertőzés klinikai tüneteit észlelték. Ezeknél a csecsemőknél kis mennyiségű CMV specifikus IgG típusu ellenanyagot is sikerült kimutatni.

Három esetben a gyerekek CMV fertőzésre utaló tünetekkel kerültek a klinikára. A tőlük származó szérumokból csak az IgM típusu ellenanyagot sikerült kimutatnunk. IgG osztályba tartozó CMV vírus specifikus ellenanyaggal még nem rendelkeztek. IgM típusu ellenanyagok esetében 1:10, az IgG típusu ellenanyagok esetében pedig 1:40 hígításban még erősen fluoreszkáló mikroszkópos kép esetén az eredményt pozitívnak tekintjük. Az alábbi felvétel a CMV vírus immunfluoreszcenz képét mutatja. A képen jól elkülöníthetők egymástól a pozitív, illetve negatív sejtek, ezenkívül még gyenge háttér fluoreszcenciát is tapasztalhatunk.



1. felvétel.

CMV virus immunfluoreszcensz képe

Az 1. számú táblázat a kapott eredményeinket mutatja be:

ÖSSZEHASONLÍTÓ CYTOMEGALOVIRUS SPECIFIKUS ELLENANYAG MEGHATÁROZÁS KOMPLEMENTKÖTÉSI REAKCIÓ ÉS IMMUNFLUORESCENCIÁS VIZSGÁLATOK ALAPJÁN.

Módszer	KKR. +	KKR. -	Összesen
IF. +	74 (46,5 %)	20 (12,6 %)	94 (59,1 %)
IF. -	0	65 (40,9 %)	65 (40,9 %)
Összesen	74 (60,5 %)	85 (53,4 %)	159 (100 %)

1.sz.táblázat.



3.1.2. A Rota vírus és az I.I.F.-vel történő Rota vírus
specifikus immunglobulinok kimutatásához szüksé-
ges antigént hordozó tárgylemez készítése

A Rota vírus kettősskapsziddal rendelkező, gömb a-
laku, a Reoviridae családba tartozó vírus. Főleg csecsemő és
kisgyermekkorban okoz gasztorintesztinális megbetegedéseket,
amit magas láz kísér /24/.

A humán Rota vírus nagyfoku antigén azonosságot mutat
a majom SA - 11 típusu Rota virussal. Ez a vírus könnyen te-
nyészthető. Így lehetőség adódott arra, hogy az antigén szer-
kezeti hasonlóságot kihasználva human eredetű Rota vírus speci-
fikus immunglobulinokat mutassanak ki. Laboratóriumunk az in-
direkt immunfluoreszcenciás eljárást dolgozta ki, a Rota specifi-
kus IgM és IgG típusu immunglobulinok kimutatására /28,16/.

Munkánk során a Zöld apácamajom vesekérgéből származó GMK jel-
zésű sejtvonalat fertőztük a majom SA - 11 jelzésű Rota vírus
törzsével. A citopáthiás hatás kialakulása után, amely kb.

6 - 7 napot vett igénybe, a 3.1.1.4. pontban leírtakkal meg-
egyező módon jártunk el. A vizsgálatainkhoz alkalmazott savó-
mintákat előzetesen már komplementkötési reakcióval, gél
elektroforézissel vizsgáltuk, illetve olyan savómintákat tesz-
teltünk, amelyek azokból a betegekből származtak, akik székle-
téből elektronmikroszkóppal Rota virust mutattunk ki. A savó-
higitásokat, illetve a konjugátum higitást ugyancsak a

3.1.1.5. pontban leírtaknak megfelelően hajtottuk végre.

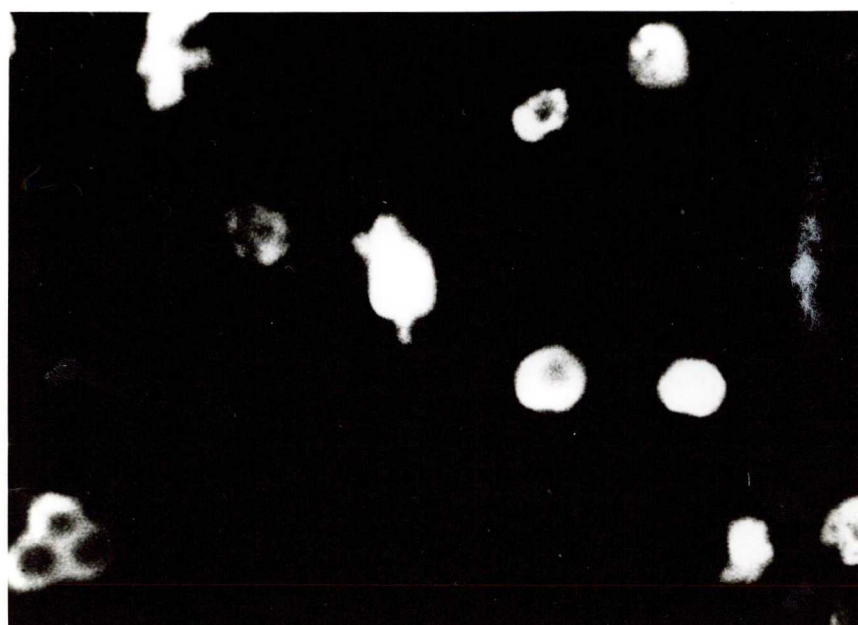
3.1.2.1. Összehasonlító vizsgálatok Rota virus specifikus ellenanyagok kimutatása céljából.

Intézetünkben 1983-ban összesen 37 darab savómintát vizsgáltunk meg komplementkötési reakcióval és immunfluoreszcensz technikával párhuzamosan. Ebből 11 esetben kaptunk mindkét szerológiai eljárással pozitív eredményt. 12 esetben komplementkötési reakcióval negatív eredményt kaptunk, ezekből a savókból azonban minden esetben korai típusu Rota virus specifikus IgM típusu immunglobulinokat sikerült kimutatnunk. Az alábbi táblázat a két módszerrel kapott eredményeinket mutatja be.

ÖSSZEHASONLÍTÓ ROTAVIRUS SPECIFIKUS ELLENANYAG MEGHATÁROZÁS
KOMPLEMENTKÖTÉSI REAKCIÓ ÉS IMMUNFLUORESCENCIÁS VIZSGÁLATOK
ALAPJÁN

Módszer	KKR. +	KKR. -	Összesen
IF. +	11 (29,1%)	12 (32,4%)	23 (62,18%)
IF. -	0	14 (37,8%)	14 (37,82%)
Összesen	11 (29,15%)	26 (70,85%)	37 (100%)

Érdekes volt megfigyelni, hogy az akut tünetekkel kórházba kerülő betegek faeceszéből az elektronmikroszkóppal /ELMI/ kapott eredmények milyen összefüggést mutattak a szerológiai vizsgálatok eredményeivel. Több esetben előfordult ugyanis, hogy az akut tünetekkel gyorsan kórházba kerülő betegek faeceszét ELMI-vel vizsgálva pozitív eredményt kaptunk, ugyanakkor komplementkötési reakcióval az illető beteg savója negatívnak bizonyult. Ezeket a savókat immunfluoreszcensz módszerrel vizsgálva minden esetben korai, IgM típusu immunglobulint tudtunk kimutatni. Ebből is kitűnik, hogy az IgM típusu immunglobulinok kimutatásának igen nagy a jelentősége, akkor ha a beérkező székletminta ELMI-vel történő vizsgálatára nincs lehetőség. A savóminta KKR kötéssel végzett vizsgálata során friss fertőzés esetén negatív eredményt kapunk. Abban az esetben viszont, ha mód van immunfluoreszcensz vizsgálat végzésére, és sikerül IgM típusu immunglobulint kimutatnunk, diagnózist adhatunk ki, és elkerülhetjük esetleg felesleges antibiotikum therápia alkalmazását.



2.sz.felvétel.

A Rota virus immunfluoreszcenz képe

3.2. Az immunfluoreszcenz mikroszkóp alkalmazása a bakteriológiában.

Az immunfluoreszcenz módszert a bakteriológiában is széles körben alkalmazhatjuk. A vizsgálatok során - az előzőekhez hasonlóan - választhatunk a direkt, illetve az indirekt módszer között. Bakteriológiai munkánk során mi a direkt eljárást alkalmaztuk. A következőkben ennek eredményét szeretnénk ismertetni. Az anaerob baktériumok közé tartozó *Bacteroides fragilis* törzs immunfluoreszcenz vizsgálata és táptalajon való tenyésztése egyidőben folyt. Az immunfluoreszcenz módszer

alkalmazása során a Bio Meriux gyártmányu Bacterioides fragilis anaerob törzsre specifikus FITC-cel jelzett immunoglobulint használtunk. /specifikáció / 58711 FLUO FRAGILIS-Kit Bacteroides fragilis/

3.2.1. A Bacteroides fragilis

Mint már említettük, a Bacteroides fragilis anaerob kórokozó. Rendkívül súlyos megbetegedéseket okozhat: igen gyakran kimutathatók peritonitisz esetén, hasi tályogokból és a női nemi szervek gyulladásos elváltozásaiból is. A bakteriológiai tenyésztése táptalajon történik, anaerob körülmények között.

3.2.2. Módszer /19/

A beérkező vizsgálati anyagot, amely feltehetően anaerobbal fertőzött betegről származik /sebváladék, tályog stb./ kevés PBS-ben /Ph. 7.2/ kb. 2-3.-szeresére hígítjuk, és alkohollal előzetesen megtisztított tárgylemezen egyenletesen elkenjük. A kenetet 24 órán keresztül szobahőn szárítjuk, majd 10 percen keresztül $+4^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött acetonban fixáljuk. Ezután a már említett FITC-cel jelzett B. Fragilis specifikus immunglobulin kis mennyiségét rétegezzük a kenetre. Nedves kamrába helyezzük, és 45 percre $+37^{\circ}\text{C}$ -os termosztátba rakjuk. Az inkubációs idő lejártá után a preparátumot háromszor PBS.-ben mossuk, majd a kenetre 80 %-os glicerinben oldott 5 % ortho-feniléndiamint cseppentünk a fedőlemez alá.

A következő táblázaton mutatjuk be kapott eredményeinket.

A BACTEROIDES FRAGILIS TENYÉSZTÉSÉVEL ÉS DIREKT
IMMUNFLUORESZCENS VIZSGÁLATÁVAL KAPOTT EREDMÉNYEK

Eredmény \ Módszer	Tenyésztés	Direkt IF
Pozitív	25	23
Negatív	15	17

3.sz.táblázat

Párhuzamba állítottuk I.F.-val kapott eredményeinket a bakteriológiai eredményekkel. Látható, hogy eredményeink, melyet I.F.-val kaptunk, igazolják a bakteriológiai tenyésztés eredményeit. Két esetben fordult elő, hogy a bakteriológiai tenyésztést az indirekt immunfluoreszcensz vizsgálat nem igazolta.



3.sz.felvétel

A B. fragilis immunfluoreszcenz képe

3.3. Az immunfluoreszcenz mikroszkóp alkalmazása a parazitológiában

Az immunfluoreszcenz módszer alkalmazási területe a parazitológiában sem korlátozódik szűk területre, sőt igen sok esetben specifikusan és kizárólagosan alkalmazhatjuk. A parazitológia területéről mi a maláriát okozó plasmódiumfajtákra, az Entamoeba histolyticára, a Toxoplasma Gondii-re specifikus immunglobulinok kimutatását végeztük el.

3.3.1. A maláriát okozó plasmódiumfajtákra specifikus immunglobulinok kimutatása, mennyiségi meghatározása

3.3.1.1. A plasmodiumfajták rövid jellemzése

Az emberi máláriát a következő plasmodiumfajták okozhatják /30/: 1./ Plasmodium falciparum, 2./ Plasmodium vivax, 3./ Plasmodium malariae, 4./ Plasmodium ovale.

A kórokozók fejlődéséhez gazdacsere szükséges. A vektor szerepét a szunyog tölti be. Itt történik a szexuális szaporodás, amelyet az emberben a plazmodium aszexuális fejlődése követ. A plasmodiumfajták szaporodásuk során különböző érési folyamatokon keresztül jutnak el a végső alakig: a szunyog a sporozoitákat közvetíti az emberbe. Ezek retikuloendothélbe jutnak, majd a következő lépésben a vörösvértestekbe telepsznek. Itt alakulnak ki a merozoiták. Egy részükből gametociták fejlődnek, és ezek kerülnek vissza a szunyogba, ha vért szív, ahol a szaporodási ciklus újra indul /30/.

3.3.1.2. A különböző plasmodiumfajtákra specifikus immunglobulinok titerének megállapítása

A különböző plasmodiumfajtákra specifikus, tisztított, liofilezett állapotban kézhez kapott immunglobulin titerének megállapítását immunfluoreszcensz módszerrel végeztük /31,32/. Az antigént tartalmazó tárgylemezünk a Bio Merieux cégtől származott, vörösvértestekre fixált Plasmodium falciparum antigéneket tartalmazott /31/.

A következő plasmodiumfajtákra specifikus immunglobulinok tesztelését végeztük el.

Plasmodium malariae CDC. komplex immunglobulin
Plasmodium vivax CDC. komplex immunglobulin
Plasmodium ovale CDC. komplex immunglobulin
Plasmodium falciparum CDC. komplex immunglobulin
Plasmodium falciparum IgG frakció CDC.
Plasmodium falciparum IgG frakció Grönoble.

Az immunglobulint 0.01 %-os NaN_3 -ot tartalmazó desztillált vízben oldottuk /24/. A konjugálási, festési, majd fedési methodika a 2.4.1. fejezetben ismertetettel egyezik meg. A következő felvételen a plasmodium falciparum immunfluoreszcensz képét láthatjuk. A 4.sz. táblázaton a különböző immunglobulinok indirekt immunfluoreszcenciával nyert titerértékeit mutatjuk be. A két különböző gyártmányu P. falciparum IgG frakció titere teljesen megegyezik. A komplex P. falciparum immunglobulin, - mely tartalmazza az immunglobulinok minden osztályát - alacsonyabb titerű mint a két, ugyanerre az antigénre specifikus, de csak az IgG globulinfrakciót tartalmazó készítmény. Megfigyelhetjük továbbá azt is, hogy a P. falciparum bizonyos antigénszerkezeti hasonlóságot mutat a P. malariae-val. A következő táblázaton az I.H.T.-val kapott eredményeinket állítjuk párhuzamba az I.I.F.A.-val kapott eredményeinkkel. A Plasmodium falciparum immunfluoreszcensz képét a 4. felvételen láthatjuk.

KÜLÖNBÖZŐ PLASMODIUMFAJOKRA SPECIFIKUS IMMUNOGLOBULINOK
PÁRHUZAMOS MEGHATÁROZÁSA INDIREKT IMMUNFLUORESZCENCIÁS
MÓDSZERREL VALAMINT INDIREKT PASSZIV HAEMAGLUTINÁCIÓVAL

Plasmodiumfajok	Módszer	IHA .	IIF.
Plasmodium malariae	CDC	1 : 200	1 : 80
Plasmodium vivax	CDC	negatív	negatív
Plasmodium ovale	CDC	negatív	negatív
Plasmodium falciparum	CDC	1 : 100	1 : 160
Plasmodium falciparum	IgG CDC	1 : 1600	1 : 640
Plasmodium falciparum	IgG Grönoble	1 : 1600	1 : 640
Plasmodium falciparum	7898 London	negatív	negatív
Plasmodium falciparum	H - 408	negatív	negatív

4.sz.táblázat



4.sz.felvétel

A plasmodium falciparum immunfluoreszcensz
képe



3.3.2. A Toxoplasma gondii specifikus immunglobulinok kimutatása

3.3.2.1. A Toxoplasma gondii

A Toxoplasma gondii egy protozoon, amely a toxoplazmózis kórokozója. Mérete megjelenési formájától függően különböző. A trofozoit 2-7 X 2-4 mikrométer, a ciszta 10-100, az Ociszta 9-13 μm . A cisztái meglehetősen ellenállóak, az Ociszta 2-3 hónapon keresztül is fertőzőképes marad. Orálisan, nazálisan vagy diaplacentárisan kerülhet a szervezetbe. A különböző szervekbe, szövetekbe jutva jellegzetes szöveti károsodást, gyulladást, nekrozist okozhat. A toxoplazmózis lehet veszesületett vagy szerzett. A szerzett toxoplazmózis okozhat hepatitist, pneumóniát, miocarditist, limfadenitist. Az idült toxoplazmózis esetében a szemkárosodások a jellemzőek.

3.3.2.2. Az antigén készítése tárgylemezen

Indirekt immunfluoreszcensz technikát alkalmaztunk a Toxoplasma gondii specifikus IgM és IgG típusu immunglobulinok kimutatására. Standard savóként a WHO-tól kapott savót alkalmaztunk.

A Toxoplasma gondii antigént egerek intraperitoneális oltásával szaporítottuk. 24 óra után az egerek peritoneális nedvét leszivtuk. A Toxoplasma gondiit tartalmazó peritoneális nedvet PBS-ben hígítottuk, centrifugáltuk, majd nagyon gondosan mostuk. Így megszabadítottuk a fehérvérsejtektől és a külön-

bőző zavaró fehérjéktől stb. Ezután PBS segítségével olyan sűrűségű szuszpenziót készítettünk, hogy egy-egy látótérben kb. 100-150 Toxoplasma Gondii legyen látható. A továbbiakban a 3.1.1.5. fejezetben leírtakkal megegyező módon jártunk el.

A Toxoplasma Gondii fertőzések korai kimutatása különösen nagy jelentőségű terhes anyák esetében, hiszen a Toxoplasma Gondii rendkívül súlyos magzati károsodásokat okozhat: Spontán abortust stb.

A Toxoplasma Gondii ellenanyag meghatározás céljára beküldött szérumok közül 64-et vizsgáltunk meg I.I.F.-val és indirekt passzív haemagglutinációval.

Eredményeinket az alábbi táblázaton mutatjuk be.

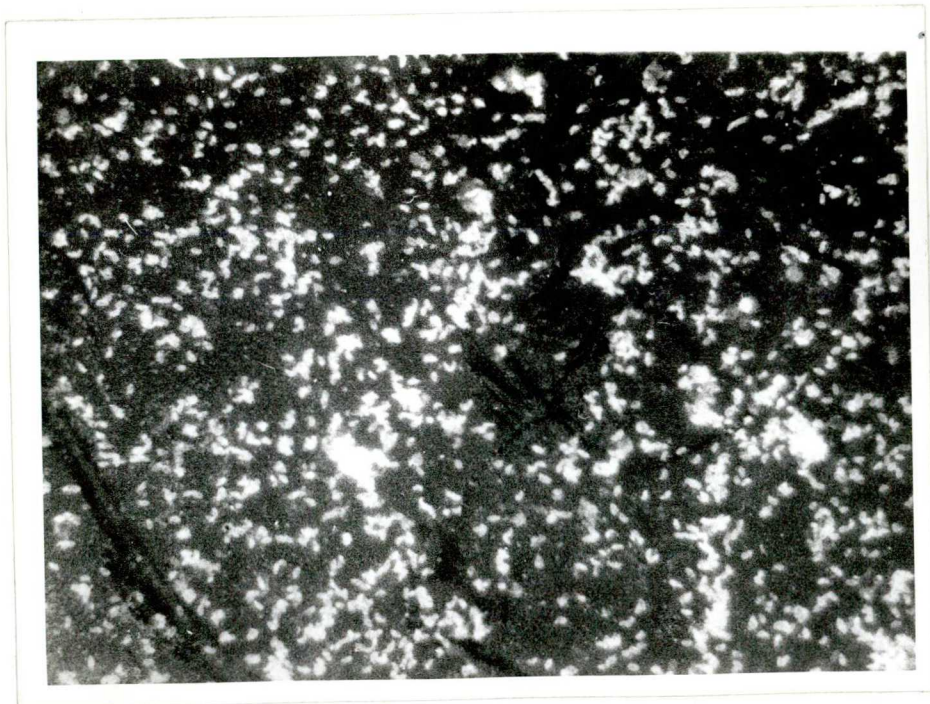
TOXOPLASMA GONDII SPECIFIKUS IMMUNOGLOBULINOK ÖSSZEHASONLÍTÓ
VIZSGÁLATA INDIREKT PASSZIV HAEMAGLUTINÁCIÓVAL ÉS INDIREKT
IMMUNFLUORESZCENCIÁVAL

Módszer	IHA. +	IHA. -	Összesen
IIF. +	37 (57,8 %)	6 (9,3 %)	43 (67,1 %)
IIF. -	0	21 (32,8 %)	21 (32,8 %)
Összesen	37 (57,8 %)	27 (42,1 %)	64 (100 %)

5.táblázat.

64 eset közül 37 alkalommal kaptunk I.I.F.-val és indirekt passzív haemaglutinációval pozitív eredményt. 6 esetben I.I.F.-val pozitív eredményt kaptunk, de ezt a passzív haemaglutináció nem igazolta. Ezekből a szérumokból azonban minden esetben Toxoplasma Gondii specifikus IgM típus ellenanyagot sikerült kimutatni. Ezekben az esetekben a szervezet először találkozott az adott antigénnel, ezért még csak a korai, tehát IgM osztályba tartozó immunglobulinok jelentek meg.

Laboratóriumunkban a Toxoplasma Gondii specifikus ellenanyagok kimutatása során az IgM típusu immunglobulinok esetében 1:10, az IgG típusu immunglobulinok kimutatása esetében pedig az 1:40 -es hígításban még erősen fluoreszkáló preparátumot számítunk pozitívnak. Az alábbi felvételen a Toxoplasma Gondii immunfluoreszcenz képe látható.



5.sz.felvétel

A Toxoplasma Gondii immunfluoreszcenz képe

3.3.3. Az Entamoeba histolitica ellen termelődött immunglobulinok kimutatása immunfluoreszcencia módszerrel

3.3.3.1. Az amoebák rövid jellemzése

Az Entamoeba histolitica a mérsékelt égövön általában enyhe lefolyású úgynevezett amoebás dizentériát okoz. A parazitának két megjelenési formája van, a vegetatív forma és a ciszta. A vegetatív forma mérete 10-40 nm, a ciszta mérete pedig 5-20 nm között ingadozik. Tenyésztése májkivonatot és lósavót tartalmazó különleges tápfolyadékban lehetséges, sokféle különböző vitamin is szükséges még a tápfolyadékban.

3.3.3.2. Az antigént hordozó lemezek készítése /35/

Az antigénes lemezek elkészítéséhez az E. histolitica TPS-1 levesben lévő 24 órás tenyészetét használjuk. Az amoebákat tartalmazó csövet a munka megkezdése előtt néhány percre -20°C-os vízfürdőbe helyezzük. Erre azért van szükség, hogy a cső falára tapadt amoebákat eltávolítsuk onnan. Ezután centrifugálás következik /10 percig 1000 RPMI/, majd az üledéket PBS-ben /Ph.7.2/ 3x mossuk. Az utolsó mosás után a már tisztára mosott amoebákról elöntjük a mosófolyadékot, majd PBS segítségével szuszpenziót készítünk belőle, mégpedig úgy, hogy egy látótérre kb. 50-60 amoeba essék. Ezt a szuszpenziót csepegtetjük ki az előzetesen megtisztított tárgylemezre. Ezután 24 órás szobahőn való fixálás következik, majd az antigénes lemezeinket elcsomagoljuk és -20°C-on tároljuk.

A savóval, valamint a FITC-cel jelzett Ah . IgG-vel való kezelés teljes egészében megegyezik a 3.1.1.5. fejezetben leírtakkal. Intézetünkben E. histolytica specifikus ellenanyag vizsgálat esetében pozitívnak mondjuk az eredményt akkor, ha 1:40 savóhígítással élénk almazöld fluoreszcenciát tapasztalunk. Az immunfluoreszcenz vizsgálatokkal párhuzamosan végzett haemagglutinációs próba esetében az eredményt akkor mondjuk pozitívnak, ha a savó 1:64-es hígításban még agglutinál.

A beérkezett és vizsgált 52 savóminta közül IHA. -val 39 esetben negatív, 13 esetben pedig pozitív eredményt kaptunk. Ugyanezeket a savókat vizsgálva IIF-val 40 esetben negatív, 12 esetben pedig pozitív eredményt kaptunk. Látható, hogy a két vizsgáló módszerrel kapott eredmények jól fedik egymást. Csupán egyetlen esetben fordult elő, hogy az IHA-val kapott pozitív eredményünket IIF-cel nem tudtuk igazolni. Az IIF-val való vizsgálatok során IgM típusu ellenanyagok kimutatása nem sikerült.

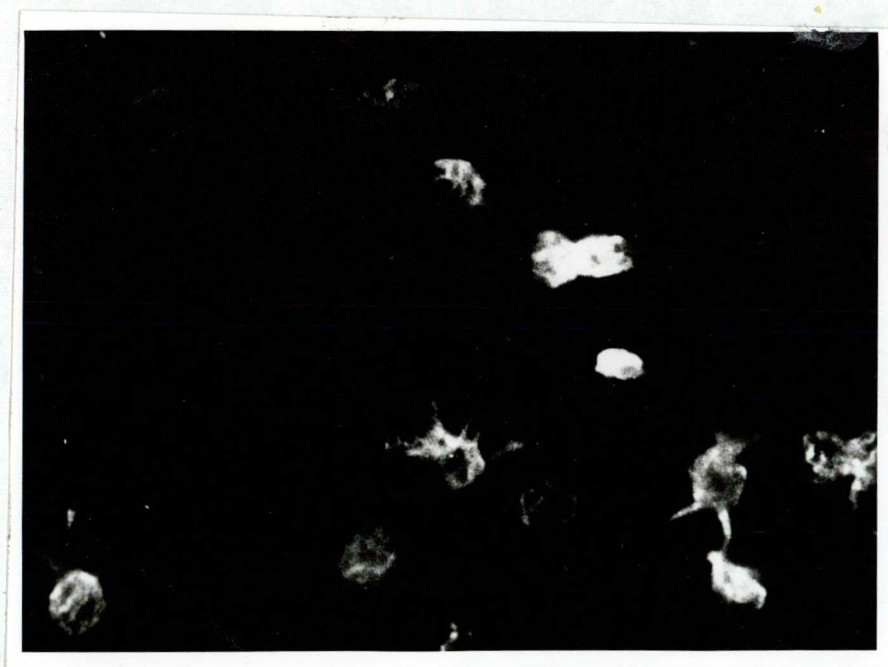
Eredményeinket az alábbi, 6.sz. táblázaton mutatjuk be.

Az E. histilitica IIF képét alább láthatjuk.

ENTAMOEBA HISTOLYTICA SPECIFIKUS ELLENANYAG VIZSGÁLATOK
IHA.-val ÉS IIF.-val.

Eredmény \ Módszer	IHA	IIF
Negatív	39	40
Pozitív	13	12

6.sz.táblázat



6.sz.felvétel

Az E. histolytica immunfluoreszcensz képe

3.3.3.3. Keresztreakciók vizsgálata

A Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratóriumban sikerrel folyik más amoeba fajták izolálása is. Sikerrel izoláltunk a Tisza és Maros folyóban szabadon élő amoebákat. Célunk, hogy olyan módszert találjunk, amellyel bebizonyítható, vagy elvethető az a feltevés, hogy a szabadon élő amoebák és az *E. histolitica* között antigénszerkezeti hasonlóság van. A bizonyítási eljárás során az immunfluoreszcensz technika is segítségül hívható.

A vizsgálathoz előzetesen *P. aerogenes*-szel fedett BST-agar táptalajon tenyésztett, Marosból és Tiszából izolált amoebákat alkalmaztunk. A táptalajról desztillált víz segítségével lemostuk az amoebákat, majd PBS-ben mostuk, és a

3.3.3.2. fejezetben leírtakkal megegyező módon jártunk el.

A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a különböző amoeba-fajtákat /vizsgálva/ antigénként használva, mindhárom esetben azonos eredményt kaptunk. Ezek az eredmények azt valószínűsítették, hogy az antigénszerkezeti hasonlóság valóban fennáll.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Az immunfluoreszcensz metodika a mikrobiológia területén széles körben alkalmazható. Két különböző eljárást ismertettünk. A módszerek mindegyikének vannak előnyei és hátrányai.

A direkt módszer jelentősége nagyfoku specifikusságában, gyorsaságában rejlik. Gyorsaságára jellemző, hogy egy óra alatt megerősíthetjük, illetve elvethetjük a klinikus által feltételezett diagnózist. Különösen nagy jelentősége van annak, hogy a direkt módszerrel a testnedvekben keringő ellenanyagok közvetlen kimutatására nyílik lehetőség. Ez azért rendkívül fontos, mert a vírus diagnosztikában hosszú tenyésztésnek kell megelőzni az eredmény kiadását. A bakteriológiában is nagy hasznát vehetjük a direkt módszerrel történő antigén kimutatásnak, hiszen elkerülhetjük a baktérium táptalajon végzett tenyésztését. Éppen az antigén kimutatás lehetősége jelenti az előnyt más szerológiai reakciókkal szemben a direkt módszer javára. A szerológia legtöbb esetben ugyanis csak a keringő ellenanyagot tudja kimutatni.

A direkt módszer hátránya, hogy meglehetősen költséges.

Az indirekt módszerrel is mutathatunk ki antigéneket. Így sikerült pl.; szöveten való tenyésztés után lymphocitás choriomeningitis virusát kimutatni. L-41 jelzésű, csőben indított 48 órás szövettenyészetet fertőztünk a beérkezett liquor 1:2 hígításával. A következő napokban folyamatosan figyelemmel

kisértük, hogy a szöveten milyen változások mennek végbe. Citopatogén effektust tapasztalva, a csőben lévő, valószínűleg vírus antigént tartalmazó sejteket a már ismertetett módon tárgylemezre preparáljuk, és fixáljuk. Ezután összehozzuk ismert titerű, lymphocitás choriomeningitis virusra specifikus immunglobulint tartalmazó savóval. A festés az előzőekben ismertetett módon történik.

A klinikusok azonban legtöbbször nem az antigénkimutatást, hanem valamely vírusra, vagy baktériumra specifikus immunglobulin titerének meghatározását kérik. Ezért az indirekt immunfluoreszcensz technikát elsősorban a specifikus ellenanyag meghatározásokhoz alkalmazzuk. Más szerológiai módszerekkel szemben az indirekt eljárás igen nagy előnye, hogy segítségével nemcsak az IgG, hanem az IgM típusu immunglobulinok kimutatására is lehetőség nyílik. Kétségtelenné teszi a fertőzés friss eredetét, ha sikerül IgM típusu specifikus ellenanyagot kimutatnunk, hiszen az antigén szervezetbe jutásakor először is az IgM típusu ellenanyagok jelennek meg, amelyek csak rövid ideig mutathatók ki. Az IgM típusu ellenanyagok kimutatása azonban csak az első megbetegedés korai időpontjában lehetséges. Abban az esetben, ha IgM ellenanyagot nem sikerül kimutatnunk, akkor két különböző időpontban /2-3 hét/ levett savóminta párhuzamos vizsgálatával tudunk arra vonatkozóan eredményt mondani, hogy a fertőzés mikor történt. Különösen nagy jelentősége van az IgM ti-

pusu ellenanyagok kimutatásának olyan kórokozók esetében, amelyek fejlődési rendellenességet okoznak /CMV, Toxoplasma Gondii/.

Az immunfluoreszcensz módszerrel történt vizsgálatainkat más szerológiai módszerekkel párhuzamosan végeztük. A jó egyezést bizonyítják kapott eredményeink is. Hiszen a Cytomegalovirus IIF. technikával és KKR-val való vizsgálata során 159 vizsgálati anyagból 74 esetben kaptunk mindkét módszerrel pozitív eredményt. 20 esetben az IIF technikával történő vizsgálat pozitív eredményét a KKR nem igazolta. Ezekből a savókból azonban IgM típusu specifikus ellenanyagot tudtunk kimutatni. Ekkor a vérben még nem jelentek meg a komplementkötő ellenanyagok. Eredményeink jól igazolták a klinikusok feltételezését vagyis a friss CMV infekció gyanúját.

A Rota virus esetében IIF technikával és a KKR-val kapott eredményeink, valamint elektronmikroszkóppal történt vizsgálatok eredményei jól fedték, illetve kiegészítették egymást. A 37 db. savómintából 11 esetben IIF-val és KKR-val egyaránt pozitív eredményt kaptunk. 12 esetben IIF-val pozitív eredményt kaptunk, ezt azonban a KKR-val nem tudtuk igazolni. E savók mindegyikéből azonban IgM típusu specifikus ellenanyagot tudtunk kimutatni. Ennek a 12 betegnek a székletét ELMI-vel vizsgálva Rota virust találtunk. Így kétséget kizáróan igazolni tudtuk a fertőzés friss eredetét.

A B. fragilis esetében a tenyésztési eredmények és az IF. eredmények jól fedték egymást. Csupán egyetlen esetben

nem sikerült a tenyésztés eredményét IF-val igazolni.

A különböző plasmodiumfajtákban specifikus ellenanyagokat vizsgálva a haemagglutinációs próba eredményei jól fedték egymást. A keresztreakciók vizsgálata során is azonos eredményeket kaptunk.

A Toxoplasma gondii esetében 64 savót vizsgálva 37 alkalommal kaptunk IIF-val és haemagglutinációval pozitív eredményt. 6 esetben IIF-val pozitív eredményt kaptunk, ezt viszont a haemagglutináció nem igazolta. Ezekből a savókból azonban minden esetben specifikus IgM típusu ellenanyagot sikerült kimutatnunk.

Az *E. histolytica* specifikus ellenanyagok vizsgálata során 52 anyagból haemagglutinációval 39 esetben negatív, 13 esetben pozitív eredményt kaptunk, IIF technikát alkalmazva 40 alkalommal pozitív, 12 alkalommal pedig pozitív eredményt kaptunk. A kapott eredményekből teljes bizonyossággal megállapítható, hogy az immunfluoreszcensz módszer nagy specifitással rendelkezik, igen érzékeny, így ezek tudatában állítjuk, hogy a módszer segítségével teljes értékű diagnózis adható ki. Az immunfluoreszcensz vizsgáló módszerek alkalmazása háttérbe szorítja, vagy feleslegessé teszi más szerológiai reakció elvégzését.

IRODALOM

- 1./ TOMCSIK J.: Immunocytological studies on the erythrocytes and bacteria. /1961/ Orv. Hetilap 102 : 1-13.
- 2./ TOMCSIK J.: Antibodies as indicators for bacterial surface structures. /1956/ Annual Rev.Microb. Vol. 10. p. 213-36.
- 3./ BUDÓ Á.: Kísérleti fizika. Tankönyv kiadó Bp. /1978/ 274-277
- 4./ BERGQUIST N.R.: The pulsed dye laser as a light source for the fluorescent antibody technique. /1973/ Scand. J. Immunol. 2. 37.
- 5./ GARDNER P.S., I.Mc.QUILLIN: Rapid virus diagnosis. Second edition Whitefrias Press Ltd. London /1980/ 6-38.
- 6./ GARDNER P.S., I.Mc.QUILLIN: Rapid Virus Diagnosis Fluorescens microscopy. Whitefrias Press Ltd. London /1980/ 11-19.
- 7./ WULF STRACH: Immunfluoreszenzfibel /1979/ VEB Gustav Fischer Verlag Jena. Gerätechnik und Befunddokumentation. /1979/ 56-63.
- 8./ COONS A.H., KAPLAN MH. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluoreszcent antibody. /1950/. J.Exp.Med. 91. 1-13.
- 9./ COONS A.H., GREECH J.J. and JONES R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group./1941/ Proc.Soc.Exper.Biol. /N.Y./ 47. 200-202.
- 10./ COONS A.H., GREECH H.J., JONES R.N. and BERLINER E.: The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. /1942/. J. Immunol. 45. 159-170.

- 11./ RIGGS J.L. et al.: Isothyocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum. /1958/. Amer.J.Path. 34. 1081-1097.
- 12./ CHADWICK C.S., Mc.ENTEGART M.G. and NAIRN R.C.: Fluorescent protein tracers: a trial new fluorochromes and the development of an alternative to fluorescein. /1958/ Immunology 1. 315-327
- 13./ FOTHERGILL J.E., NAIRN R.C.: Purification of fluorescent conjugates comparison of charcoal and sephadex. /1961/Nature /Lond./ 192. 1073-1074.
- 14./ BRADWELL A.R. and D. CATTY: Bench Manual of Techniques for Quality Control Test of Fluorochrome Conjugates to Human immunoglobulins G. and M. WHO. Geneva /1981/
- 15./ GARDNER P.S., J.McQUILLIN: Rapid Virus Diagnosis The Reagent. Whitefrias Press. Ltd. London. /1980/
- 16./ SATO K. Y., INABA Y. MIURA S. TOKUHISA and MATUMOTO: Isolation of Lapine Rotavirus in cell cultures. /1982/. Archives of Virology 71. 267-271
- 17./ HAIM GILON, JOHN W. SEDAT: Fluorescence Microscopy: Reduced Photobleaching of Rhodamine and Fluorescein Protein Conjugates by n-Propyl Gallate ./1982/ Science Vol. 217. 1952-1955.
18. G.D.JONSON R.S., DAVIDSON K.C. McNAMEE G., RUSSEL,D. GOODWIN and E.J.HOLBOROW: Fading of Immune fluorescence during microscopy: a Study of the Phenomenon and its Remedy. /1982/ Journal of Immunological Methods, 55/1982/231-242.
19. GARDNER P.S., J.McQUILLIN: Rapid Virus Diagnosis: Immuno-fluorescence techniques, control of specificity and non-specific fluorescence. Whitefrias. Press. Ltd. London. /1980/. 56-92.

20. FUDENBERG H.H., D.P. STITES, J.L.COLDWEL, J.V.WELLS:
Basic and clinical immunology: Clinical Laboratory
Methods for Detection of Antigens and Antibodies.
Daniel P. Stites M.D. Lange Medical Publications
/1978/ 363-366.
21. HEKKER A.C., B.BRAND-SOOTHOF, J.VIS and R.C. MEYERS: Indirekt
Immunfluorescence test for detection of IgM
antibody to CMV./1979/ The Journal of infections
Diseases Vol. 140 No 4.
22. WELLER T.H. and COONS A.H.: Fluorescent antibody studies
with reagent of varicella and Herpes zoster
propagated in vitro. /1954/ Proc.Soc.Exp.Biol.
Med. /N.Y./ 26. 789-794.
23. BAKÁCS T., FARKAS E.: Szerológiai módszerek a vírusdiag-
nosztikában. Orvosi Viroológia. MEDICINA Bp.
1966. 164-165.
24. BÉLÁDI-KÉTYI-NÁSZ-VÁCI: Orvosi Mikrobiológia, Immunitás, tan,
Parazitológia. Általános virológia. /1982/ Bp.
Medicina. 447-448.
25. LAPIS K.: Az orvosi virológia aktuális kérdései. A Cyto-
megalovirus. Medicina. Bp. /1948/ 241-250.
26. F.HARCDNICEANU and SUSAN MICHELSON: Assessment of HCMV
antibody detection techniques. /1980/ Archives of
Virology 64. 287-301.
27. GARDNER P.S., J.McQUILLIN: Rapid Virus Diagnosis: Miscel.
laneous viruses in the herpesvirus group.
Whitefriars Press. Ltd. London /1980/. 246-252.
28. HEIMER G.V. and W.D.CUBIT: Improved Immunofluorescence
techniques with mikrophotes for the detection of
M and G immunoglobulins against rotavirus./1983/
Journal of Virological Method 6 31-39.

29. WEISSFELD A.S. and Alex C. SONNENWIRTH: Rapid Detection and Identification of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides melaninogenicus* by Immunofluorescence. /1981/ J.Clin.Microb.Apr. Vol.13.4. 798-800.
30. BÉLÁDI-KÉTYI-NÁSZ-VÁCZI: Orvosi Mikrobiológia, Parazitológia, Immunitásstan. Parazitológia: Medicina. Bp. /1982/ 518-519.
31. In 2nd International Conference on Malaria and Babesiosis 19-22 September Annecy, France.
"Lunch-time Meeting on the Harmonization of Serological Techniques Applied in Malariology".
20. Sept. /1983/
32. In 2nd International Conference on Malaria and Babesiosis 19-22 September Annecy France.
"Protocol for a multicentre study on the standardization of the indirect immunofluorescent test /IIFT/ in malaria serology."
33. Public Health Service: Indirekt Fluorescent Antibody Test for Toxoplasmosis. Dan Palmer, Kenneth Walls. 1970.VI.
34. BÉLÁDI-KÉTYI-NÁSZ-VÁCZI: Orvosi Mikrobiológia, Immunitásstan, Parazitológia. Parazitológia. Medicina. Bp. 1980. 485-492.

Köszönetet mondok dr. Földes József egyetemi tanárnak, a SZOTE Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratórium vezetőjének a téma megválasztásában és a munka végzése során nyújtott elvi és gyakorlati útmutatásáért.

dr. Deák Judit tanársegédnőnek a Rota és Cytomegalovirusokkal kapcsolatos munkámban nyújtott segítségért.Értékes tanácsait örömmel fogadtam.

dr. Nagy Erzsébet adjunktusnőnek a B. fragilis-specifikus ellenanyag meghatározásokban nyújtott segítségért.

Matyi Anna gyógyszerésznőnek ez E. histolytika specifikus ellenanyagok kimutatásában való segítségért.

dr. Rózsa Józsefnek a Toxoplasma Gondii-val kapcsolatos részletvizsgálatban való szíves közreműködéséért.

Zsurka Ferencné és dr. Mezey Gézané aszisztenseknek az immunfluoreszcens vizsgálatokkal párhuzamosan végzett szerológiai reakciókban nyújtott segítségükért.

