

Get on board, Noah.
Forget the other
amoeba.

Handel

PATHOGEN ÉS APATHOGEN AMOEBÁK FILOGENETIKAI
VIZSGÁLATA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Matyi Anna

Készült a SZOTE Központi Klinikai Mikrobiológiai
Laboratóriumában

Szeged, 1985.



PATHEGEN ÉS ANTIGEN VÍRUSOK FÉLŐZETÉNEK

VIZSGALATA

DOKTORI TÉZIS

B 512



1958



E 2.460

Készült a Szegedi Központi Könyvtár Mikrobiológiai

laboratóriumában



Szeged, 1958.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldalszám
BEVEZETÉS	1.
1. TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS	2.
1.1. Entamoeba histolytica	2.
1.2. Szabadon-élő amőbák	11.
1.3. Rendszertani ismeretek	16.
2. PATHOGENITÁS	20.
2.1. Entamoeba histolytica	20.
2.2. Szabadon-élő amőbák	26.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33.
3.1. A vizsgált törzsek eredete	33.
3.2. Tenyésztés	33.
3.2.1. Monoxenikus és axenikus tenyésztési mód	33.
3.2.2. Táptalajok	36.
3.3. Antigének és immunsavók előállítása	43.
3.4. Szerológiai módszerek	46.
3.4.1. Indirekt haemagglutinációs teszt	46.
3.4.2. Indirekt immunofluoreszcencia /IIF/	48.
3.4.3. ELISA	50.
3.5. Elektroforetikus izoenzim vizsgálat	54.

	Oldalszám
4. KÍSÉRLETES EREDMÉNYEK	64.
4.1. Tenyésztési eredmények	64.
4.1.1. Entamoeba histolytica	64.
4.1.2. Szabadon-élő amőbák	66.
4.2. Az izolált szabadon-élő amőbák pathogenitásának vizsgálata	71.
4.3. Az antigének vizsgálata	74.
4.4. Immunizálási és szerológiai eredmények	78.
4.4.1. Epidemiológiai vizsgálatok a klárafalvai populációban	78.
4.4.2. Epidemiológiai vizsgálatok vízi- sportolók körében	80.
4.4.3. Kontroll csoport	81.
4.4.4. Amőbás meningoencephalitises eset ismertetése	81.
4.4.5. Állatimmunizálási eredmények	82.
4.5. Összehasonlító izoenzim vizsgálatok Entamoeba histolyticával és szabadon- élő amőbákkal	83.
MEGBESZÉLÉS	85.
IRODALOMJEGYZÉK	

BEVEZETÉS

A SZOTE Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratóriumában 1979. óta működő, a Magyar Tudományos Akadémia által támogatott munkacsoport témája: "Orvosi és környezetvédelmi protozoológiai kutatás".

Ennek keretében végeztem biológiai, diagnosztikai és epidemiológiai vizsgálatokat. Egyetemi doktori értekezésem témája a pathogén és apathogén amőbák filogenetikai kapcsolatainak vizsgálata, ezen belül a szabadon-élő amőbák lehetséges kórokozó szerepének tanulmányozása. Ezzel a kérdéskörrel hazánkban még nem foglalkoztak. Az ismeretlen eredetű, gyors lefolyású meningoencephalitisek és a granulomatosus encephalitisek kóroktanának vizsgálata gondot okoz a klinikusok és a diagnosztikai laboratóriumnak egyaránt.

Munkámban a protozoonok filogenezisének, elméleti kérdéseinek tárgyalása mellett, e betegségek klinikai és laboratóriumi vizsgálatához szeretnék néhány elméleti és gyakorlati támpontot adni.

1. TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS

1.1. Entamoeba histolytica

Az amőbiázis történetét B.M.Martinez /1975./ összefoglalója alapján tekinthetjük át.

A jelenkori civilizáció forrásául szolgáló Óvilág valamennyi országának orvosi dokumentumaiban - már sok évszázaddal ezelőtt - találunk feljegyzéseket dizentériás megbetegedésekről, elsősorban háborúkkal kapcsolatban. Ez esetek közül néhány amőbás eredetű is lehetett, de azonosításuk, az alapvető etiológiai tényezők ismeretének hiánya miatt, lehetetlen volt azokban az időkben. Azt már akkor is megfigyelték, és a "Corpus Hippocraticum" című műben fel is jegyezték, hogy a dizentéria járványszerűen nyáron fordul elő. Az "Airs, Waters and Places" című összefoglalóban pedig megállapították, hogy "azokon a helyeken, ahol az ivóvíz mesterséges tárolóból vagy mocsaras területről származik, a dizentéria a nyár során igen gyakran jelentkezik".

A nagy felfedezések, gyarmatosítások idején az Európától távoli országok lakosságát sújtó új betegségek váltak ismertté, és ezek között a dizentéria igen fontos helyet foglalt el.

A XVI. század közepén történt, hogy egy portugál pap tudomást szerzett néhány tudatlan brazil bennszülöttől az ipecacuanha-gyökér antidizentériás hatásáról.

A XIX. század elején a dizentériának Indiában való gyakori előfordulása készítette Annesley-t arra, hogy az indiai lakosság körében legtöbbször előforduló betegségekkel foglalkozó híres munkájában /1828./ részletesen tárgyalja a dizentériát is. Parkes, aki szintén Indiában dolgozott, lehetségesnek tartott bizonyos kapcsolatot a dizentéria és a hepatitis között.

1848-ban Morehead jegyezte fel az első májtályogos esetet, és nem sokkal később leírt egy másikat, melyet dizentériás megbetegedéssel hozott kapcsolatba.

Gyakorlatilag lehetetlen kideríteni, hogy a dizentéria létezett-e az Újvilágban, felfedezése előtt, vagy az Óvilágból hurcolták oda. Az ipecacuanha antidizentériás hatásának ismerete, melyet 1625-ben Samuel Purchas, majd 1648-ban Piso tett közzé, azt bizonyítja, hogy a dizentériát jól ismerték a nyugati féltekén, legalábbis ismert volt egy brazil népcsoport körében. Ezzel szemben az is nyilvánvaló, hogy a rabszolgakereskedelem útján sok, súlyos dizentériában szenvedő rabszolga érkezett a kontinensre, akik az őslakosságot is fertőzték.

Cooper a "Járványos megbetegedések Mexico City-ben 1718-1813" című művében leírja, hogy 1776-ban súlyos tífusz, dizentéria, pneumonia és influenza járvány söpört végig "Új-Spanyolország" fővárosán, és hogy don Joaquin Pio Equia y Lugo orvos szerint, "egy, a májat megtámadó betegség felelős az ezen évben előforduló nagyszámú halálesetért".

Az amőbákkal kapcsolatos történeti áttekintések általában nem említik az egysejtűek felfedezőjét, Anton van Leeuwenhoek-ot, pedig az amőbák megismerésének lehetősége az ő munkásságával kezdődött. Amőbákat először Rösel van Rosenhof látott, aki foglalkozását tekintve miniatúrafestő volt, s emellett amatőr lencse-csiszoló és mikroszkópkészítő. 1775-ben írt le egy alakját állandóan változtató mikroszkópikus lényt, melyet e képessége miatt felfedezője "kis Protusnak", majd 1785-ben Linneo Chaos proteusnak nevezett el. 1839-ben Ehrenberg alkotta meg rendszertanilag az Amoeba genust és 1849-ben egy orosz természettudós, Gros írta le az első amőbát - az Amoeba gingivalis-t -, mely az emberben parazitaként él, s mely később Entamoeba gingivalis-ként vált ismertté.

1875-ig semmit sem tudtak arról, hogy a humánparazita amőbafajok jelenlétével összefügghet a dizentéria jellegzetes tünetcsoportjának megjelenése. Ebben az évben írta le egy Szent-Pétervárott dolgozó orvos, Fiodor Alekszandrovics Lesh az "Archives of Pathologic Anatomy and Physiology and Internal Medicine" 65. számában egy krónikus dizentériás esettel kapcsolatos megfigyeléseit és kísérleteinek eredményeit. "A beteg, egy 24 éves férfi, rendkívül lesoványodott, sápadt és gyenge, amikor kórházba kerül. Étvágytalan és állandóan szomjas. Naponta kb. kilencszer ürít híg, bűzös, sárgás-vörös, gennyes székletet." Székletének mikroszkópos vizsgálata során sok, sajátos

gosan mozgó organizmust, amőbát talált. A beteg halála után - melyet tüdőgyulladás okozott - elvégzett szövettani vizsgálatok a vastagbél mucosájában gyulladásos beszűrődéseket mutatott ki, melyeket fehérvérsejt méretű sejtek vettek körül. A szerző a székletben és a fekélyes területeken talált amőbák méretét is megadta, leírta szabálytalan formájukat, a két részre osztott citoplazmát, a citoplazmában megfigyelhető vörösvértesteket, a sejtmag jellemzőit és a sajátos mozgást is. A leírást néhány rajzzal egészítette ki, és összevetve ezen organizmusok morfológiai jellemzőit az addig ismert amőbákéval, megállapította, hogy egy új fajtát izoláltak, melyet Amoeba coli-nak nevezett el.

Kísérletei során frissen ürített, amőbát tartalmazó székletet adagolt per os kutyáknak. Az állatoknál diarrhea, hányás és anorexia alakult ki. Székletükben sok élő amőbát mutattak ki. Az utolsó fertőzést követő 18. napon leölt állatok rectumában és az itt kialakult fekélyes területeken is nagy számban volt jelen amőba. Lesh ezt így foglalta össze: "E kísérlet bizonyította, hogy az amőbák, ha megfelelő nagy számot érnek el a bélben, a mucosát kifejezetten irritálják, mely irritáló hatás fokozódva fekélyesedést okoz". Befejezésül a következőket állapította meg: "az amőbák rendkívül fontos szerepet játszottak a betegség lefolyása szempontjából, de egy kérdést még tisztázni kell: vajon az amőbák okoz-

ták-e a megbetegedést vagy az más okokra vezethető vissza, és az amőbák később kerültek a bélcsatornába és csak fenn-tartották a betegséget."

Az amőbiázis történetének kezdetét - a betegség specifi-kus ágensének felfedezésével - Lesh-nek ez a közleménye jelenti /1875./.

Az ő nevéhez fűződik a Balantidium coli, a Lamblia intes-tinalis, a Trichomonas vaginalis és Blastocystis leírása is.

Több, mint tíz évvel később Stephanos Kartulis Alexandriában írt le 150 amőbás dizentériás megbetegedést.

1887-ben Robert Koch két - májtályoggal szövődő - di-zentériás esetről számolt be. A betegek székletében és a fekélyes bél szövettani metszetében ugyanazt az amőbát mutatta ki, melyet a májtályog körüli kapillárisok falá-ban is megtalált. Ily módon bizonyította a dizentéria és a májtályog közötti etiológiai kapcsolatot.

Szintén 1887-ben, Csehszlovákiában Hlava írt le amő-bás eseteket, hangsúlyozva, hogy a megfigyelt esetek nem trópusi országban fordultak elő.

Baltimore-ban Councilman és Lafleur /1891./ végzett egy vizsgálatsorozatot "az intestinalis és hepatikus" amőbiázissal kapcsolatban, melyet 150 oldalas monográfi-ában jelentettek meg. Részletesen leírták magát a para-zitát, a bekebelezett vörösvértesteket, mint jellemző-ket, és Entamoeba dysenteriae-nek nevezték el. Munkájuk-

ban a betegség valamennyi tünetét pontosan ismertették, felhívták a figyelmet a szövődményként jelentkező májtályogra és az esetleges tünetmentes hordozókra.

Részletesen tanulmányozták a bélrendszer lézióit és a májtályogot, megalkották az "amőbás dizentéria" és az "amőbás májtályog" kifejezéseket. Végül leírták egy másik - később Entamoeba coli-nak elnevezett - amőbafaj jelenlétét is az emberi bélcsatornában.

Quinke és Roos 1893-ban írta le először az amőba életciklusát, a trophozoita-, ciszta-formává alakulást.

Kruse és Pasquale májtályogból származó, bakteriummentes gennyel kísérletesen okozott dizentériát kölyökmacskákban, és ezzel bebizonyították, hogy az amőba egyedül is képes előidézni a dizentériát, egyúttal cáfolva azok állítását, akik szerint az amőba olyan "opportunist" mikroorganizmus, mely önmagában nem rendelkezik pathogén hatással.

Huber /1903./ az emberi bélcsatornában élő két amőbafajta cisztáinak megkülönböztető jellemzőit írta le. Ugyanebben az évben Schaudinn készített részletes tanulmányt erről a két fajtáról, és a pathogén fajtának az Entamoeba histolytica nevet adta. Ez a véglegesen elfogadott név utal a fajta ama képességére, hogy elpusztítja a szöveteket.

A pathogén hatással nem rendelkező fajta neve változatlanul Entamoeba coli maradt. Schaudinn - csupán fantá-

ziájára támaszkodva - leírta az amőbák életciklusát is. Elképzelése szerint vagy schizogóniával vagy az "érett" trophozoiták sarjadzásával szaporodnak.

Egy évvel később Mussgrave és Clegg elismerte, hogy az amőbák képesek előidézni a dizentériát, de tévesen azt állították, hogy az emberi bélcsatornában élő valamennyi amőbafaj pathogén, illetve lehet pathogén. Ők alkották az "amoebiasis" szót, az amőbás fertőzések valamennyi megjelenési formájának megjelölésére.

Rogers /1912./, aki az amőbiázissal kapcsolatos tapasztalatait Indiában szerezte, "Az emetin sói" címmel érdekes könyvet jelentetett meg. Ebben leírta az ipecacuanha használatának eredetét, a Pelletier által izolált alkaloidájának, az emetinnek felfedezését. Beszámolt az emetin subcutan injekció formájában való hatásosságának felismeréséről az amőbás dizentéria és a májtályog gyors gyógyításában. Ismertette a szubsztancia néhány olyan farmakológiai sajátosságát, melyek alapján az amőbiázis specifikus gyógyszerévé válhatott.

Walker és Sellards /1913./ "Kísérletes amőbás dizentéria" című cikkében igazolta, hogy az amőbák okozzák a dizentéria e speciális formáját. A kísérlet során önként jelentkező rabokat fertőztek szájon át az Entamoeba histolytica különböző törzseinek és az Entamoeba coli cisztáival. Így bizonyították be, hogy az Entamoeba



histolytica kórokozó mikroorganizmus, és hogy az Entamoeba coli ártalmatlan. Igazolták, hogy a dizentériás tünetektől mentes személyektől származó Entamoeba histolytica ciszták tünetmentes infekciókat és dizentériás tüneteket egyaránt előidézhetnek, ezzel szemben az Entamoeba coli cisztákkal való fertőzést soha nem követte megbetegedés. Ezen kívül kimutatták, hogy a klasszikus ipecacuanha kezelés nem mindig eredményes, a parazita végleges eltávolítása szempontjából.

Az ezt követő években sok dolgozat jelent meg az amőbiázis kezelésével kapcsolatban. Megállapították, hogy a Yatren-nek /jód-hidroxi-kinolin/ jelentős hatása van, és hogy néhány arzén-vegyület is hasonlóképpen hat a dizentériára.

Az antibiotikumok megjelenésekor többnek megvizsgálták az amőbiázisra kifejtett hatását, és nem is egy hatásosnak is bizonyult. Ennek ellenére az emetin megőrizte elsőbbségét, és több új vegyületét és gyógyszerkombinációját is kipróbálták.

Az első feljegyzett amőbiázis járványt, mely El-Pasóban /Texas/ tört ki, Craig írta le /1917./.

A Californiában működő Kessel az amőbiázis immunológiájának kutatásában és ennek a diagnosztikában való alkalmazásában ért el eredményeket.

Meg kell említeni Clifford Dobell /1919./ "Az emberben élő amőbák" című művét, a kérdés legátfogóbb össze-

foglalóját, melyet gondosan összeállított bibliográfia zár le.

Az 1933-ban Chicagóból induló nagy amőbiázis járvány tanulmányozása jó lehetőséget nyújtott az ilyen jellegű betegségek epidemiológiájának jobb megismeréséhez. Már ez és a későbbi hasonló járványok is segítettek e parazitózis hatékony profilaxisának kidolgozásában.

Az amőbiázis történetének eddig említett szakaszaiban az Entamoeba histolytican kívül számos más, az ember bélcsatornájában élő amőbát is leírtak és szerkezetüket, biológiai jellemzőjüket is meghatározták.

Így 1912-ben Prowazek a Jodamoeba butschlii-t, 1917-ben Wenyon és O'Connor az Endolimax nana-t, valamint Jepps és Dobell a Dientamoeba fragilis-t fedezte fel. Itt kell megemlíteni az 1912-ben Prowazek által meghatározott Entamoeba hartmanni-t, melyet néhány évig az Entamoeba histolytica minuta formájának tartottak.

Dbrohlay és Beck /1925./ dolgozta ki az első mesterséges táptalajt, mely alkalmas volt az Entamoeba histolytica tenyésztésére. Balamuth és munkatársai ezt a táptalajt tökéletesítették, és így vált lehetővé az amőba monoxenikus tenyésztése. Végül Louis S. Diamond-nak /1968./ sikerült kidolgozni azt a táptalajt és metodikát, mely megoldotta az Entamoeba histolytica axenikus tenyésztését. Az axenikusan tenyészthető amőbák a sejtbiológiai kutatások számára is egyszerű, az eukaryoták minden strukturális és

molekuláris elemével rendelkező, modellt szolgáltatnak.

1.2. Szabadon-élő amőbák történeti áttekintése

Amióta a szabadon-élő amőbák lehetséges pathogén volta nyilvánvalóvá vált, számtalan adat gyűlt össze az amőbáknak az emberi, illetve az állati pathológiában játszott szerepéről. Általános a kutatók véleménye, hogy ezek az amőbák önmagukban is pathogének, de baktériumok és vírusok vektoraiként is szerepelhetnek.

Dujardin /1841./ írt le először Amoeba limax néven egy amőbát, és ezt a nevet több szerző használta fel különböző amőbák megjelölésére /Page, 1969./. Ebben az időben ezeknek az amőbáknak egyáltalán nem tulajdonítottak kóroki szerepet.

Elsőként Schardinger /1899./ azonosította Nægleria gruberi néven egy amőbát, melyet egy dizentériában szenvedő beteg székletéből izolált. Ezzel egyidőben Indokínában és a Fülöp-szigeteken számos szerző: Lesage /1905./, Noc /1909./, Musgrave és Clegg /1906./ és Walker /1908./ mutattott ki székletből és májtályog gennyéből "limax" csoportba tartozó amőbát, és megfigyelték, hogy a dizentériás esetek megszorodnak az esős évszakban, amikor a városok vízvezetékében az amőbák száma megnövekszik.

Chatton és Lalung-Bonnaire 1912-ben Vahlkampfia néven írt le egy protozoont, amit egy Indokínából visszatért hasme-

néses beteg székletéből izoláltak. A széklet direkt vizsgálata során talált trophozoitákat sikeresen tartották fenn tenyészetben.

Közel ötven évig uralkodott Shaudinn megállapítása /1903./, mely szerint az egyetlen pathogén amőba az Entamoeba histolytica. Ez alapján fogadtatta el Wells /1911-ben/ azt az álláspontját, hogy a Saigonban és Manilában leírt amőbák a levegő porából származó mikrobák és nincs különösebb jelentőségük.

Ennek ellenére Whitemore /1911./, Hartmann /1916./, Hogue /1915./ és Pinto /1922./ több közleményben számolt be májtályogból izolált, általuk Vahlkampfiának tartott amőbáról.

Halpert és Ashley /1944./ hatvanegy Entamoeba histolyticának tulajdonított agytályogos esetet írt le, de megjegyezték, hogy csak öt esetben sikerült kimutatni a kórokozót. Ezért írta Robert Deschiens /1963./ az amőbiázisról szóló értekezésében azt, hogy helytelen volt dizentériát okozó amőbákról beszélni a fenti esetekben, mivel ezek a tályogok már akkor keletkeztek, amikor a máj, a tüdő vagy a bél korábbi léziói a gyógyulás útján voltak vagy már meg is gyógyultak.

Vakcina készítés céljából majomvese-szövetben tenyésztett poliomyelitis kultúrában Jahnes és Fullmer /1957./ olyan területeket talált, melyen - Acanthamoebaként meghatározott - amőbát azonosítottak.

Culbertson és munkatársai /1959./ a szövet-tenyészetek tápfolyadékát majmok és egerek agyába oltották: valameny-nyi állat elpusztult. A szerzők az agypreparátumokban nagy kariosomájú amőbákat találtak és súlyos meningoencephalitisre jellemző elváltozásokat észleltek. Ugyanezt tapasztalták, ha az állatokat intranasalisan oltották a tenyészetek tápfolyadékával.

Singh 1970-ben a Culbertson által izolált amőbákat Hartmannella culbertsoni néven írta le. Ezeknek az amőbáknak klinikai jelentőségét nagyban növelte Wang és Feldman /1961. és 1967./ felfedezése. Hartmannellákat találtak nasopharingeális váladékban, melyet eredetileg vírusizolálás céljából vizsgáltak. Acanthamoeba jelenlétét fedezték fel, hasonló körülmények között Armstrong és Pereira /1967./, Chang és munkatársai /1966./, valamint Little és Chang /1968./.

Culbertson és munkatársai feltételezték, hogy az ege-
reken és majmokon megfigyelt betegség előfordulhat embe-
ren is, ha az olyan vízzel kerül kontaktusba, melyet az
amőbák szennyeztek. Fowler már 1961-ben jelezte Ausztrá-
liában az első gyanús esetet, majd másfél évvel később
Butt fedez fel egy másikat az USA-ban. Az első leírást
Fowler és Carter adta 1965-ben, akik négy ausztráliai
esetet írtak le.

Patras és Andujar /1965., 1966./, valamint Butt /1966./
hasonló eseteket hamarosan közöltek az USA-ban, Butt

ezt a betegséget primer amőbás meningoencephalitisnek MEAP/ nevezte el. Csaknem egyidőben Ausztráliában és az USA-ban is izoláltak amőbákat a betegek liquorából /Butt, Baro és Knorr /1968./, Carter /1968./, Culbertson, Ensminger és Overton /1968./. Ez az amőba morfológiailag a Naeqleria gruberi-hez /Schardinger, 1899./ hasonlított. Később ezt az amőbafajt több országban izolálták: Csehszlovákiában Cerva és munkatársai /1969./, Új-Zélandban Mandal és munkatársai /1969./, Angliában Apley és munkatársai /1970./ és Belgiumban Jadin és munkatársai /1971-1978./. 1970-ben Carter javaslatára ezt a patogén amőbát Naeqleria fowleri-nek nevezték el, nem sokkal később Singh /1970./ a Naeqleria aerobia nevet ajánlotta a Butt és munkatársai /1968./ által izolált, valamint Culbertson és munkatársai /1968./ által tanulmányozott HB-1 amőbának. Ezután rövid időn belül bebizonyosodott, hogy a primer amőbás meningoencephalitis okozója a Naeqleria fowleri, és hogy a szövettani preparátumokban korábban talált és Acanthamoebának tartott nagy kariosomájú amőbák valójában Naeqleriák voltak. Megállapították, hogy a Naeqleri fowleri azonosításának feltétele, a tenyészetben való izolálásukon túlmenően, patogenitásuknak egerek vagy majmok intracerebrális oltásával való igazolása. Az esetleírások retrospektív tanulmányozásának eredményeként ezzel a kórokozóval hozták kapcsolatba egy, Derrick által 1948-ban tanulmányozott és Wenyon szerint Iodamoeba

butschlii-nek tulajdonított új-guineai esetet, valamint egy Kernohan által 1961-ben leírt arizoniai esetet.

Symmers /1969./ ugyanezeket az amőbákat találta meg azokban a szövettani metszetekben, melyek egy 1909-ben meghalt essex-i fiú és egy 1937-ben Belfast-ban meghalt leány vizsgálati anyagából származtak. Dos Santos /1971./ 5 esetet talált Virginiában, miután utólag megvizsgált 542 meningitises tüneteket mutató betegől származó anyagot.

Jelenleg általánosan elfogadott, hogy a Naegleria felfedezése előtt leírt, akkor Hartmannellidae által okozott fertőzésnek tartott megbetegedéseket is a Naegleriák okozhatták: Culbertson /1971./, Chang /1971./, Singh és Das /1970./, Carter /1972./.

Az akut meningoencephalitiszes esetek mellett Patras és Andujar /1966./ hívta fel a figyelmet az Acanthamoebák okozta krónikus megbetegedésre. 1968-ban Callicot és munkatársai ismertettek egy esetet, melynek során Acanthamoeba astronyxis tenyésztett ki.

A már korábban tanulmányozott humán meningoencephalitist és az izolált etiológiai faktorokat tanulmányozva, Duma 1972-ben három fő klinikai típusba sorolta a megbetegedéseket:

1. Az akut esetek, melyek hirtelen jelentkeznek, a kifejlődés fulmináns és gyorsan halálhoz vezet, a kórokozó egy Naegleria fajta.
2. A krónikus esetek, melyek enyhe tünetekkel jelent-

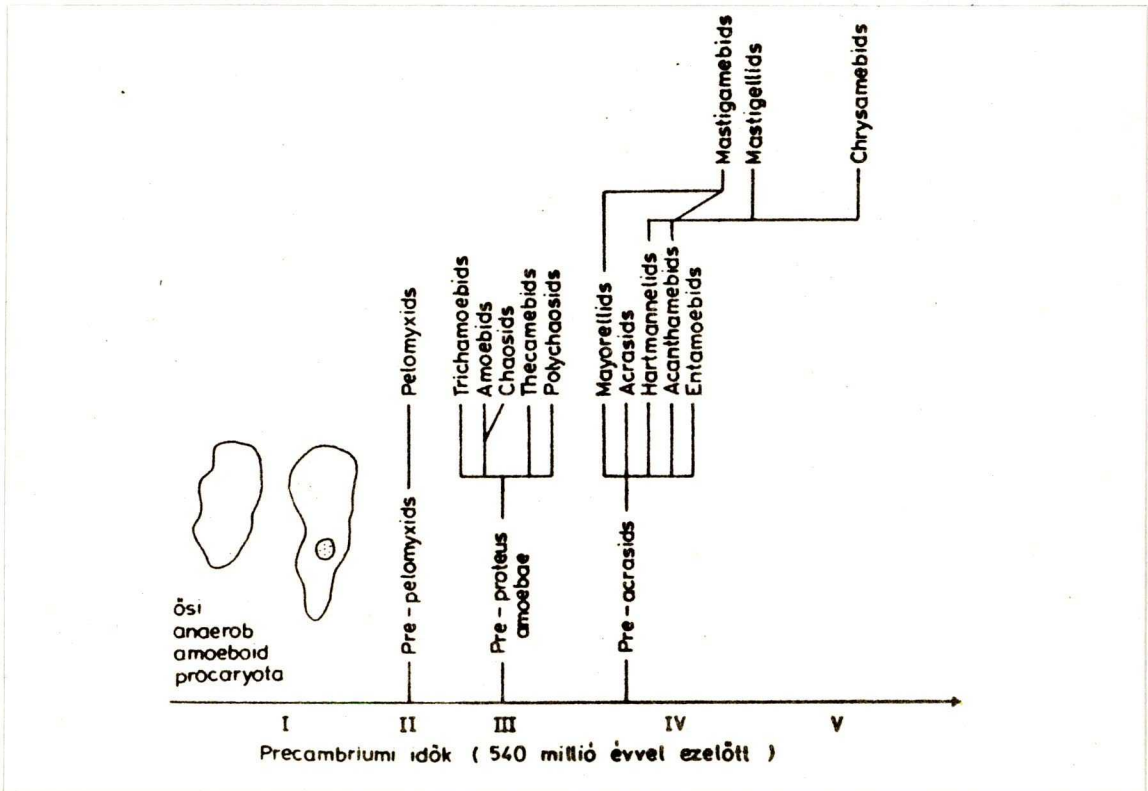
keznek és a kifejlődésük lassú /1-2 hónap/, a kórokozó Acanthamoeba vagy Hartmannella.

3. Azok az enyhe esetek, melyek tünetegyüttese a vírus-meningitisre emlékeztet, de a kórokozójuk valószínűleg amőba, vagy Acanthamoeba vagy Hartmannella, de a Naegleria eshetősége sem kizárt.

1.3. Rendszertani ismeretek

Dangeard /1910./ jegyezte meg, hogy nincs nehezebb dolog, mint egy amőbát meghatározni. Identifikálásuk során nem támaszkodhatunk csupán a morfológiai jegyek megfigyelésére, hanem a biológiai és immunkémiai tulajdonságokkal együtt értékelve tudjuk elkülöníteni az azonos nemhez tartozó organizmusokat.

A paleobiológiai kutatások szerint az első bonyolultabb felépítésű szervezetek amőba-szerű lények voltak. Az 1. sz. ábra az amőbák eredetének és fejlődésének folyamatát tünteti fel.



1. ábra

- I. A sejtmag kialakulásának folyamata
- II. Baktériumszerű mitokondrium nélküli szimbionták kialakulása
- III. Mitokondriummal rendelkező organizmusok kifejlődése. Orsóképződéssel és centriolum nélküli mitózissal történő szaporodás.
- IV. Centriolum és flagellum kialakulása
- V. Fotoszintézisre képes szervezetek megjelenése

A vízben és talajban élő amóbák osztályozása mindig is vitatott volt. Két rendszerezés áll szemben egymással.

Egyik Alexeieff-é /1912./, melyet Volkonsky /1931./ vett revízió alá és Page /1967./ dolgozott át. A másik a Singh-féle rendszerezés /1952./, mely az Amoebidák rendjét két családra osztja: a Hartmannellidák és a Schizopyrenidák családjára.

Singh elveti az Acanthamoeba rendet, ezeket Hartmannellák-nak tekinti, és a Hartmannellák családjába, - míg a Naeqliát a Schizopyrenidák családjába - sorolja. A besorolás alapjául az osztódás során bekövetkező változásokat tekintette, melyek megfigyelése igen körülményes.

Ezért a kutatók nagy része a Page-féle osztályozást fogadja el. Eszerint az Amoebidákat két családba soroljuk: a Vahlkampfiidae-k családjába, melyek promitózissal szaporodnak, és a mitózissal szaporodó Hartmannellidae-k családjába.

Az előbbi családban ostor nélküli Vahlkampfiákat és ostoros Naeqliákat különböztet meg.

A Hartmannellidae-k családjába az Acanthamoebák és a Hartmannellák tartoznak. Az Acanthamoebák pseudopodiumai tüskések /acanthopodák/, néha van egy lobopodiumuk és cisztájuk egy szabálytalan, vastag külső fallal, az esetek legnagyobb részében egy csillag alakú belső fallal rendelkezik.

Állatvilág: Protista /Haeckel, 1866./
Állatkör: Protozoa /Goldfuss, 1818., Siebold, 1845./
Törzs: Sarcomastigophora /Honigberg és Balamuth,
1963./
Altörzs: Sarcodina /Hertwig és Lesser, 1874./
Ágazat: Rhizopoda /Siebold, 1845./
Oszttály: Lobosea /Carpenter, 1861./
Alosztály: Gymnamoebia /Haeckel, 1862./
REND: Amoebida /Kent, 1880./
Alrend: Tubulina /Bovee és Jahn, 1966./
Család: Hartmannellidae /Volkonsky, 1931.,
Page, 1974./
Család: Entamoebidae /Chattoon, 1925./
Fajta: ENTAMOEBA HISTOLYTICA
IODAMOEBA BUTSCHLII
ENDOLIMAX NANA
Alrend: Acanthopodina /Page, 1976./
Család: Acanthamoebidae /Sawyer és
Griffin, 1975./
Fajta: ACANTHAMOEBA CASTELLANII
REND: Schizopyrenida /Singh, 1952./
Család: Vahlkampfiidae /Jollos, 1917.,
Zulueta, 1917./
Fajta: NAEGLERIA FOWLERI

2. PATHOGENITÁS

2.1. Entamoeba histolytica

Bár Lesch már 1875-ben leírta az Entamoeba histolytica okozta betegséget, és az azóta eltelt idő alatt számos kutató foglalkozott a kórokozóval, de még ma sincs kialakult, egységes elképzelés a pathogenitásról és a klinikai kép megítéléséről. Egyes kutatók véleménye szerint a pathogén törzsek csak trópusi klíma alatt fordulnak elő, míg a mérsékelt égöv alattiak apathogének. Ezzel szemben mások az Entamoeba histolyticát obligát pathogén szöveti parazitának tartják. A harmadik csoport véleménye szerint fakultatív pathogenitású kórokozóról van szó, mely bizonyos körülmények között akár a trópusokon, akár a mérsékelt égöv alatt súlyos megbetegedést hozhat létre.

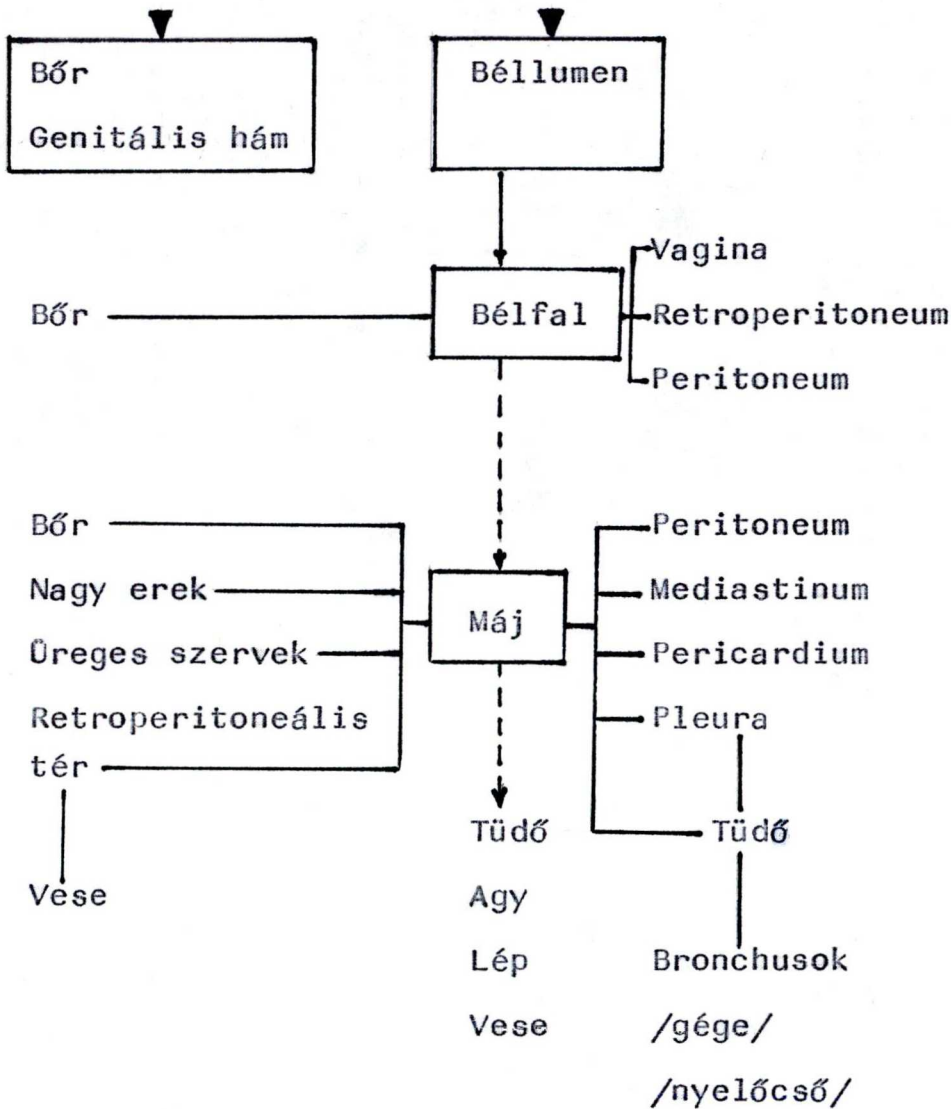
E szerzők szerint a pathogenitás függ a klímától, a bél baktérium-flórájának összetételétől, illetőleg az egyén általános állapotától, kondíciójától. Valószínűnek látszik, hogy mindezek a tényezők kedvezőtlen kapcsolata vezet megbetegedéshez. Lehetséges, hogy nemcsak a trópusi klíma befolyásolja rossz irányba a fertőzés kimenetelét, hanem esetlegesen a klímaváltozás is. E körülménynek tulajdonítható, hogy a trópusokról mérsékelt égövre érkező személyeken - odaérkezésük után - gyakran tör ki a megbetegedés.

Az anaerob viszonyok között szaporodó protozoon proteolitikus és amylolytikus enzimeket termelve extracellulárisan fejti ki szövetoldó hatását és hozza létre a belekben a jellegzetes fekélyeket. Táplálékul a szövetekből aminosavakat, glucosét, B- és C-vitamint, valamint cholesterint vesz magához.

A folyamat előrehaladásával egyre mélyül a necrosis és végül kialakul a jellegzetes amoebás fekély. Az esetek nagy részében a folyamat a bélre localizálódva marad, egyes esetekben azonban a vegetatív alakok a véráram útján a májba jutva, májgyulladást vagy májtályogot hoznak létre, de gyakran távolabbi szervekbe /tüdő, agy/ is adnak áttételeket.



Az *Entamoeba histolytica* migrációja:



2. sz. ábra

A betegség klinikai felosztását illetően több eltérő vélemény alakult ki. A legtöbb szerző két csoportot különböztet meg, úgymint 1. intesztinális és 2. extraintesztinális kórformát. Más szerzők, így elsősorban Craig a

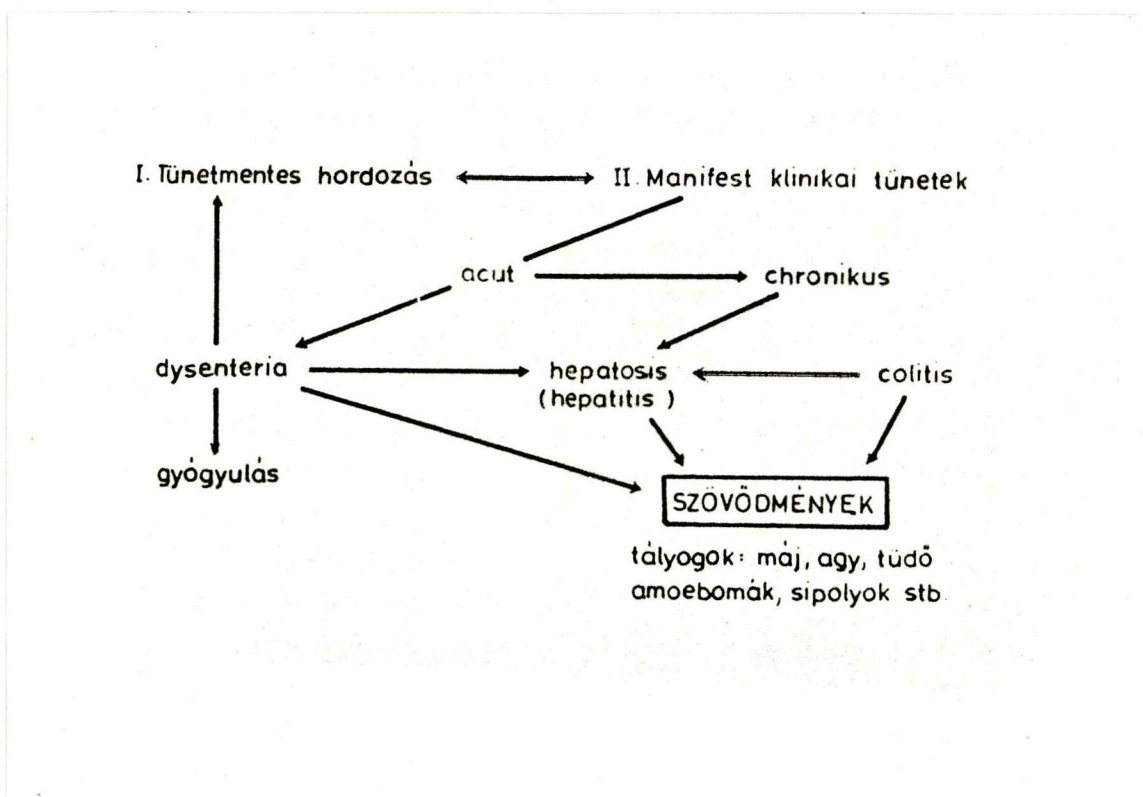
bél-amőbiázisokat osztályozza. A kórkép súlyossága szerint Craig négy csoportot különböztet meg:

1. tünetmentes hordozás, vagy gazdaság,
2. hordozás klinikai tünetekkel,
3. amőbás enteritis,
4. amőbás dizentéria.

A klinikai képet jobban megközelíti Mohr felosztása, mely a következő:

- | | |
|--|---|
| A. a bél lumenét minuta formák és ciszták fertőzik, | tünetmentes |
| B. a bél falát magna formák fertőzik: | |
| 1. akut forma, | véres-gennyes-nyálkás hasmenés, láz nélkül, |
| 2. krónikus forma | székrekedéssel váltakozó gennyes-nyálkás hasmenés, |
| C. fertőzéses-toxikus hepatozis /nem hepatitis!/
D. májtályog a magna formának a portális keringéssel történő elsodródása következtében | májduzzanat, nyomás a máj tájékán, ritkán láz
májtáji fájdalom, májnagyobbodás, leukocytosis, láz, gyorsult vörösvértest süllyedés |

Várnai kézikönyve szerint az amőbiázis egységes kór-
kép, amely nemcsak a belek megbetegedése. Fertőzés esetén
a tünetmentes hordozástól a manifest klinikai tüneteken
keresztül a súlyos vagy éppen halálos szövődményekig a
legváltozatosabb kórformákat hozhatja létre.



3. ábra

Az amőbás dizentéria inkubációs ideje változó, lehet
néhány nap, de általában hosszú, 20-90 nap. Kialakulása
lassú, lefolyása általában enyhe. Napi 3-5 híg, nyálkás,
véres székletürítéssel jár, de súlyos esetben eléri a

napi 10-15-öt. A hasi fájdalom többnyire jobboldalt, az appendix-tájon jelentkezik, ami miatt gyakran gondolnak akut appendicitisre.

Akut amőbiázis: kimenetele általában kedvező, bár a trópusokon 5-10 %-os letalitással jár. Megfelelő kezelés hatására általában gyógyul, de még gyógyszeres kezelés nélkül is bekövetkezhet gyógyulás, vagy spontán remissio. Ilyenkor a megbetegedés krónikus formába megy át.

Krónikus amőbiázis: rendszerint hasmenés nélkül, sőt inkább obstipatoval jár. Időnként előfordulnak kisebb hasmenésekkel kísért colitises formák is. A főbb tünetek: étvágytalanság, subfebrilitás, hipotonia, kisfokú microcyter anaemia. A kórképet rendszerint neurotikus tünetek kísérik. A beteg ingerlékeny, alvászavarról, fejfájásról, szédülésről panaszodik. E tünetek gyakran téves diagnosishoz vezetik az orvost. Ilyen beteg mondja, hogy "gyenge" a gyomra.

A krónikus formában gyakran kerülnek a májba kórokozók anélkül, hogy tályogképződésre sor kerülne, de természetesen könnyen kialakulhat májtályog is.

Amőbás májtályog: viszonylag ritka szövődménye az amőbiázisnak, azonban legtöbbször halálos kimenetelű. Tünetei: intermittáló láz, jobb vállba sugárzó, légzéskor fokozódó jobb bordaív alatti fájdalom. A laboratóriumi vizsgálatok közül erősen gyorsult vörösvértest-süllyedés, a szérumban

az alkalikus phosphatase értékének növekedését és bromsulphalein-retentiót találunk. A betegnek leukocytosisa van és a colloid-labilitási próbák is pozitivak.

Különleges formák: a krónikus amőbiázis egyik szövődménye az amőbás granulóma vagy amoeboma. A gyakori recidivák következtében a bélfal körülírtan megvastagodik, és a burjánzó kötőszövetben a gyulladáisos granulóma szöveti elemei dominálnak.

Bőr-amőbiázis lehet metastatikus vagy sipoly következménye. Leggyakrabban az anus körül látható, de előfordulhat bármely bőrfelületen, amikor sipolyképződés következtében áll elő.

Gyakoriak a generalizált bőrijelenségek, melyeknek fő tünetei a dermatitis, a pruritus és az urticaria.

Meg kell említeni a genitalis fertőzést, amely sokszor dysmenorrhoea vagy sterilitás háttérében állhat.

2.2. Szabadon-élő amőbák

Az a feltevés, hogy a mindenütt előforduló szabadon-élő kis amoebák pathogénné válhatnak, Culbertsontól származik, ezért az első, állatkísérlettel is igazolt pathogén képességgel rendelkező amoebafajtát, tiszteletére, Acanthamoeba culbertsoninak nevezték el.

A szabadon élő amoebák okozta humán megbetegedéseket Butt /1966./ nevezte először primér amoebás meningoencephalitisnek /PAME/.

Ezek az amoebák általában meningoencephalitist okozhatnak, és az általuk okozott betegség klinikai képe a fertőzést előidéző fajtától függően kétféle.

A "Naeqleramoebiasis"

A Naeqleria fajok közül csak egy, a Naeqleria fowleri-ről tudjuk, hogy meningoencephalitist idézhet elő. A naeqlierias meningoencephalitises esetek zöme egészséges gyermeknél vagy fiatal felnőttél fordult elő és szinte valamennyi megbetegedést vízzel, rendszerint közfürdővel való kontaktus előzött meg. A Naeqleria fowleri haemorrhagiás, nekrotizáló meningoencephalitist okoz, mely általában egy héten belül halálhoz vezet. A betegeknél frontális vagy parietális fejfájás, tarkómelegség, néha a szaglás gyengülése, kettőslátás alakul ki, ante mortem kóma fejlődik ki. A liquor gennyes, nagy számban - kb. 90 %-ban - tartalmaz polimorf magvú sejteket és néha kevés vörösvértestet is. A pseudopodiumokat is növesztő makrofág sejtektől nehéz elkülöníteni a mobilis protozoonokat, melyek néha "háztalan csigához" /limax/ hasonlóan elnyújtottak a liquor NaCl tartalma miatt /Culbertson 1972./.

Tény, hogy ezeknek az amóbáknak a mikroszkópos felismerése nem könnyű feladat, de néhány órával a liquor-vétel után már könnyebben elkülöníthetők az összetapadt leukocytáktól.

A boncolás során az agy ödémás, a szaglólebenyekben általában nekrotikus és vérzéses területeket találunk, melyekben számos amőba fedezhető fel.

A hisztológiai diagnózis felállítása sem egyszerű, mert csak igen vékony sorozat metszetben - gondos, hosszú fixálás után végzett Giemsa vagy Heidenhain-féle vas-hematoxin festéssel - lehet megtalálni a jellegzetes magmorfológiájú amőbákat.

Az "Acanthamoebiasis"

Az Acanthamoeba fajok közül többről, így az Acanthamoeba castellanii-ről, az Acanthamoeba polyphaga-ról és az Acanthamoeba astronyxis-ről is feltételezik, hogy humán megbetegedést okozhatnak.

Az Acanthamoeba fertőzés következtében megbetegedett emberek legtöbbször immunszuppresszált, diabeteses, vagy alkoholisták voltak, illetve sugárterápiában vagy tartós cortison kezelésben részesültek. Az Acanthamoebák és más, még meg nem határozott szabadon-élő amőbák cerebrális fertőzéseket, nekrotizáló, granulomatosus, subakut vagy krónikus amőbás meningoencephalitist /GAE/ okoznak. A betegség nyolc naptól pár hónapig is tarthat és halált is okozhat. A klinikai tünetek a behatolás helyének különböző fokú gyulladással kezdődnek, melyet viszonylag enyhe tünetek - hőemelkedés, torokfájás, nausea, hányás, szédülés és fejfájás - követnek. Jones és munkatársai /1975./ írták

le egy 7 éves fiú esetét, akinek halálos kimenetelű meningoencephalitisét keratitis, majd uveitis előzött meg. A boncolás során kimutatták, hogy a fertőzés kapuja a szem volt. A kórokozó Acanthamoeba castellanii-polyphagorhysodes komplex volt.

Witschel és munkatársai /1984./ egy kontaktlencsét viselő idős nő keratitiséről kimutatták, hogy azt Acanthamoeba sp. okozta.

Cullett és munkatársai /1979./ is leírtak egy hosszas előzmény után halálhoz vezető meningoencephalitist, mely egy évvel korábban történt harapás után fejlődött ki. Egy 24 éves mexicói nőt gyermeke a karján megharapott. A harapás helyén kb. fél év múlva gennyes kelés, majd fekély alakult ki. Újabb fél év múlva a betegnél meningeális tünetek jelentkeztek. A halál utáni vizsgálat során az agyból és a fertőzés kapujából /bőrlézió/ Acanthamoeba astronyxist mutattak ki.

Itt említem meg saját esetünket /közlés alatt/. Egy alkalommal 14 éves leány abakteriális meningitisének kórokozóját, a liquorból mikroszkópos vizsgálat során észleltük, állatoltás után visszaizoláltuk és Acanthamoeba castellanii-ként határoztunk meg.

1980-ban Dos Santos hívta fel a figyelmet arra, hogy az amőbáknak liquorból való direkt kimutatását megnehezíti az a körülmény, hogy a fehérvérsejt meghatározáshoz a liquort - a vörösvértetek oldása céljából - ecetsav

tartalmú Türk-oldattal keverik, mely ecetsav az amőbákat károsítja, elvesztik jellegzetes alakjukat, minek következtében könnyen összetéveszthetők degenerált makrofágokkal.

Az Acanthamoebák okozta léziók a kisagyban, a középagyban és az agytörzsben gyakoriak. A szaglólebenyek - szemben a Naeqleria okozta elváltozással - és az agyféltekék elülső régiója csak ritkán érintett. Az amőbák a granulomatosus gócokban találhatóak és jól jellemzi őket nagyobb méretük és világosan festődő nucleusuk és a feltűnően festődő nucleolusuk. A Naeqleriák okozta fertőzésekkel ellentétben ezekben a gócokban nagy számban találhatóak amőba ciszták is.

Valamennyi baktérium és vírusmentes meningitist amőba-gyanúnak kellene tekinteni. A mikroszkópos vizsgálaton kívül állatoltást és tenyésztést is célszerű végezni, amőba kimutatás céljából.

A kórokozó Naegleria és Acanthamoeba fajok sajátosságai

Jellemzők	Naegleria	Acanthamoeba
fajták	- Naegleria fowleri	- A. castellanii - A. culbertsoni - A. polyphaga - A. astronyxis - A. rhyodes
morfológia:		
trophozoita	- lobopodiumok 15-25 um	- acanthopodiumok /filiform/ 15-40 um
ostoros állapot	- létezik /deszt. víz/	- nincs
ciszta	- kerek	- dupla falú, a belső fal általánosan csillagalakú
szelektív izolálás	- 7-15 um	- 8-20 um
ökológia	- lehetséges	- csak ritkán lehetséges
klór-rezisztencia	- melegített /természetesen vagy mesterségesen/ vízben	- minden vízben
	- az amőba gyorsan elpusztul	- az amőba gyorsan elpusztul
	- a ciszták az uszodák szokásos klór-koncentrációjával elpusztíthatók	- a ciszták igen ellenállóak



Jellemzők	Naegleria	Acanthamoeba
pathogenitás	- primer amoebás meningoencephalitis /PAM/: akut és halálos	- amoebás meningoencephalitis /AM/: krónikus, de halált is okozhat
inkubációs idő	- 4-7 nap	- bizonytalan, 10 nap
fertőzés kapuja	- szaglóhám /neuroepithelium/	- tüdő, urogenitális traktus, szaglóhám, bőrhiány
epidemiológia	- általában úszás előzi meg - 100 PAM világszerte	- általában nem úszással kapcsolatos - 10 AM eset világszerte 6 szemfertőzéses eset világszerte /vízzel való kontaktus előzi meg/
szövetekben található formák	- amőba	- amőba és ciszta
terápia	- Amphotericin B	- sulfadiazin? /Debenal/ 5-fluorocitozin? /Ancotil/

1. tábla

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgált törzsek eredete

Az intézetünkben három éve axenikusan fenntartott Entamoeba histolytica NIH:200 törzset Gdyniából, az Institute of Marine Medicine parazitológiai részlegén dolgozó P. Myjak bocsátotta rendelkezésemre.

A szabadon-élő amőbák gyűjtését a Maros folyó Klárafalva melletti szakaszából, a partközélebről vett vízminta vizsgálatával kezdtem.

A Tisza vizét a Gyermekklinika magasságában beömlő szennyvízcsatorna közelébről merítettem.

A Holt-Tiszából az u.n. Hódtói csatorna torkolata mellől vettem vízmintát.

A Városi Egészségügyi és Gyógyfürdők 25°C-os medencéjébről, a fürdővíz leengedése után a fenék mélyedéseiben maradt vizet megvizsgáltam.

A szegedi Sportuszoda kb. 18-20°C-os vizét is felhasználtam kísérleteim során.

3.2. Tenyésztés

3.2.1. Monoxenikus és axenikus tenyésztési mód

Ogata /1938./ volt az első, akinek sikerült természetes körülmények között baktériumokkal és más élőlényekkel

együtt élő egysejtüeket baktériummentesen, tisztán kite-nyésztetni. A technikai nehézségek miatt azonban a 30-as évek végéig nem sokan hasznosították ezt az eljárást, de azóta rohamosan megnőtt a módszer alkalmazóinak és továbbfejlesztőinek a száma.

A tenyésztett protozoonokkal az élő anyaggal kapcsola-tos sok általános biológiai kérdés tanulmányozható cel-luláris szinten, tehát anélkül, hogy a soksejtű szerve-zet bonyolult sejtközötti kapcsolatai azokat befolyásol-nák. A tiszta egysejtű tenyészetek fizikai, kémiai és biológiai vizsgálatai vetették meg tulajdonképpen a mo-dern sejtbiológia alapjait, sőt a molekuláris biológia kutatásának lehetőségét.

A tiszta tenyészetek gyakorlati szempontból sem kö-zömbösek, ugyanis a protozoonok tápanyagigényeinek ismerete lehetővé tette felhasználásukat egyes biológiai anya-gok mennyiségi meghatározására /pl. *Crithidia luciliae* az autoimmunbetegségek diagnosztizálására, az *Euglena gracilis* a kobalamin titrálására, a *Tetrahymena pyriformis* új farmakológiai preparátumok toxicitásának gyors, tájé-kozódó vizsgálatára, stb.

A tenyészetek osztályozása Dougherty szerint /1953./:

Elnevezés	A kérdéses faj mellett a tenyészetben élő fajok
1. Gnotobiotikus	Nincsenek vagy mind ismertek
a./ Axenikus	nincsenek
b./ Synxenikus	egy vagy több ismert faj
Monoxenikus	egy ismert faj
Dixenikus	két ismert faj
Trixenikus	három ismert faj
Polyxenikus	több ismert faj
2. Agnotobiotikus	egy vagy több faj, közülük legalább egy ismeretlen

A gyakorlatban sokszor meg kell elégednünk azzal is, ha sikerül a fajta egyedét invitro fenntartani, bármilyen körülmények között történjék is ez. Az ideális cél azonban természetesen a fajta tiszta /axenikus/ tenyészetének kialakítása. Ha a protozoont valamilyen módon elkülönítjük a környezetében élő, esetleg a testfelszínéhez tapadt, vagy éppen a citoplasmájába bekebelezett baktériumtól vagy vírustól, akkor az ilyen axenikus egyedeket bármilyen - általunk jól ismert - egysejtűvel /baktériummal, esetleg algával/ táplálhatjuk. Ezek a tenyészetek már gnotobiotikus monoxenikus kultúrák. Francia kutatók az élő baktériummal táplált tenyészeteket "culture bacterienne"-nek nevezik.

Ha a vizsgálandó faj axenikus egyedeit sikerül nem élő vagy éppen a tápfolyadékban oldott anyagokkal fenn-tartani, akkor elértük az axenikus tenyészetet.

Az antibiotikumok felhasználása lehetővé tette, hogy a korábban alkalmazott igen munkaigényes és sokszor kétes értékű módszereket elhagyjuk /mosás, vándoroltatás, stb./. A szilárd táptalajokon való vándoroltatás még ma is használatos a gyorsan mozgó protozoonok tisztítására, de szinte általánossá vált a különböző antibiotikumok és kemoterapeutikumok ilyen célú felhasználása.

Az axenikus kultúrában való tenyésztés feltétele, hogy a tápoldat tartalmazza mindazokat az anyagokat, melyek a protozoon anyagcseréjéhez és szaporodásához szükségesek. Ilyen az Entamoeba histolytica axenikus tenyésztésére alkalmas - minden igényt kielégítő - tápfolyadék, a Louis S. Diamond /1968./ által kidolgozott TP-S-1 tápfolyadék.

3.2.2. Táptalajok

A./ Az Entamoeba histolytica tenyésztése:

Az NIH:200 törzs axenikus tenyészetét a L.S.Diamond által kidolgozott /1968./ TP-S-1 tápfolyadékon és ennek egy általa módosított változatán, a TYI-S-33 médiumon tartom fenn.

A TP-S-1 tápfolyadék összetétele

TP leves / <u>T</u> rypticase, <u>P</u> anmede/	
Trypticase /Bio-Trypcase/	1.00 g
Panmede /máj kivonat/ Paines and Byrne	2.00 g
Glükóz	0.50 g
L-cisztein-hidroklorid	0.10 g
L-aszkorbinsav	0.02 g
Nátrium-klorid	0.50 g
Kálium-dihidrogén-foszfát	0.06 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	
/vízmentes/	0.10 g
Bidesztillált víz	ad 87.50 g

A pH-t ln NaOH-dal pH=7-re állítom be.

Whatman no. 1. szűrőpapíron szűröm.

10 percig 121°C-on autoklávozom.

Fénytől védve tároljuk.

Felhasználás előtt ezt az alaplevest

1. 10 ml inaktivált /56°C-on, 30 perc/ lósavóval

2. 2.5 ml Vitamin mixture 10⁷-tel komplettálom.

Vitamin keverék 10⁷ /Evans és munkatársai 1956./

I. sz. törzsoldat: Vízoldékony B-vitaminok

1. Niacin 12.5 mg

p-aminobenzoe sav /H₁-vitamin/ 25.0 mg

Desztillált víz	ad	25.0 ml
/forró vízben oldjuk/		
2. Niacinamid /PP-vitamin/		12.5 mg
Piridoxin /B ₆ -vitamin/		12.5 mg
Piridoxal		12.5 mg
Tiamin /B ₁ -vitamin/		5.0 mg
Ca-pantotenat		5.0 mg
Izo-inozitol		25.0 mg
Kolin-klorid		250.0 mg
Desztillált víz	ad	25.0 ml
3. Riboflavin /B ₂ -vitamin/		10.0 mg
a./ 10 ml 0.075n HCl majd		
b./ 5 ml 0.2n NaOH hozzáadása		
után enyhe melegítéssel oldjuk		
Desztillált víz	ad	20.0 ml
1. oldat 25 ml		
2. oldat 25 ml		
3. oldat 10 ml		
Deszt.víz ad 100 ml		

II. sz. törzsoldat:

D-biotin /H-vitamin/		10.0 mg
Oldjuk 50 ml desztillált vízben, melyet		
1 ml 1n HCl-val savanyítottunk.		
Desztillált víz	ad	100.0 ml

III. sz. törzsoldat:

Fólsav /B _c -vitamin/	10.0 mg
Desztillált víz /80 ^o C/	ad 100.0 ml

IV. sz. Zsiroldékony vitaminok

10.0 mg D₂-vitamint /Ergocalciferol/ oldok fel egy 100 ml-es mérőlombikban lévő abszolút etanolban. A tinkturában 10.0 mg A-vitamint /alkoholos/ is feloldok. Egy külön csőben 10.0 mg K₃-vitamint /Menadion/ oldok 1.0 ml abszolút etanolban és 0.1 ml-t a mérőlombikban lévő D₃- és A-vitamin tinkturához adok. Hozzámerek 10.0 ml 5 %-os $\sqrt{\text{V}}/\sqrt{\text{V}}$ Tween 80 oldatot, a végtérfogatot pedig 100.0 ml-re állítom be desztillált vízzel.

V. sz. 10.0 mg E-vitamint /dinátrium-alfa-tokoferol-foszfát/ oldok kevés desztillált vízben, majd a térfogatot 100.0 ml-re egészítem ki.

A vitamin keveréket Seitz vagy Millipor szűrőn szűrjük. Tárolás -20^oC-on.

A komplettált tápfolyadékot csavaros tetővel zárható csövekbe fejtem és sterilitási próba céljából 24 órán át 37^oC-on inkubálok. Az inkubálás során eléri az átoltáshoz szükséges hőmérsékletet is.

A TP-S-1 tápfolyadék egyik legfontosabb komponense a Panmede néven forgalmazott, papainos emésztéssel nyert, marhamáj kivonat. Beszerzése világszerte problémát jelent.

Diamond és munkatársai 1978-ban kidolgoztak egy májkivonatmentes tápfolyadékot, mely szintén jól bevált az Entamoeba histolytica axenikus tenyésztésében.

A TYI-S-33 médiumban vassal, B₁₂- vitaminnal, tioctic savval és Tween 80-nal kiegészített élesztőkivonat helyettesíti a Panmede-t.

A TYI-S-33 tápfolyadék összetétele /Trypticase,
Yeast extract, Iron, Serum/

TYI-leves

Trypticase /Bio-Trypcase/	2.0 g
Élesztőkivonat	1.0 g
Glükóz	1.0 g
Nátrium-klorid	0.2 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	0.1 g
Kálium-dihidrogén-foszfát	0.06 g
L-cisztein-hidroklorid	0.1 g
L-aszkorbinsav	0.02 g
Ferri-ammónium-citrát /barna gyöngy/	2.28 mg
Bidesztillált víz	ad 87.0 ml

A pH-t ln NaOH-dal állítom be pH=6.8-ra.

Az oldatot Whatman no.1. szűrőpapíron szűröm.

15 percig 121⁰C-on autoklávozom.



Vitamin - Tween 80 keverék

A. törzsoldat

Vitamin mixtura 107

B. törzsoldat

B₁₂-vitamin 40.0 mg

Bidesztillált víz ad 100.0 ml

C. törzsoldat

DL-6,8 tioctic sav 100.0 mg

Abszolút etanol ad 100.0 ml

D. törzsoldat

Tween 80 50.0 g

Abszolút etanol ad 100.0 ml

A munkaoldat összemérése:

A. törzsoldat 1000 ml

B. törzsoldat 12 ml

C. törzsoldat 4 ml

D. törzsoldat 4 ml

Bideszt víz 180 ml

Az oldatot Seitz szűrőn sterilezzük.

Ampullákba adagolva -20°C-on tároljuk.

Borjú- vagy lósavó

Felhasználás előtt 56°C-on 30 percig inaktiválva.

A komplett tápfolyadék elkészítése:

TYI-leves	87 ml
Savó	10 ml
Vitamin-Tween 80 mixtura	3 ml

A komplettált médiumot +4^oC-on, sötét helyen, maximum 96 órán át tárolhatjuk.

B./ A szabadon-élő amőbák izolálásához és fenntartásához használt táptalajok:

Módosított Neff-féle sóoldat /Page, 1967./

/Amoeba saline/

Az alább felsorolt sókból /a megadott mennyiségekkel/ bidesztillált vízzel 100.0 ml térfogatú törzsoldatot készítenek.

NaCl	1.20 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04 g
Na ₂ HPO ₄	1.42 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g

A törzsoldatok 10-10 ml-ét összekeverem, majd bidesztillált vízzel 1000.0 ml-re kiegészítem.

BST agár /Buffered Sucrose Tryptose/ /S.L.Chang, 1958./

Sucrose	10.0 g
Tryptose	2.0 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát · 7H ₂ O	6.0 g

Kálium-dihidrogén-foszfát		0.4 g
Agár		15.0 g
Bidesztillált víz	ad	1000.0 g

pH=7.4-7.5

Sterilezés 15 percig 121^oC-on

Az agároldatból Petri-csészébe lemezeket öntök.

Tárolás +4^oC-on.

Felhasználás előtt a lemezekre 1 ml sűrűség:

McFarland=1 Enterobacter aerogenes szuszpenziót plétolok és a lemezeket 18 órán át 37^oC-on inkubálok.

PYG-leves /Drosanszky/

Acanthamoebák axenikus tenyészetének kialakításához:

Proteose pepton		15.0 g
Élesztőkivonat		5.0 g
D-glükóz		10.0 g
Vas ²⁺ -szulfát		3.0 mg
Neff-féle amoeba saline	ad	1000.0 g

A pH-t 1M KOH-dal pH=6.6-ra állítom be.

Sterilezés 15 percig 115^oC-on.

3.3. Antigének és immunsavók előállítása

A./ Antigének

Entamoeba histolytica antigént P.E. Thompson és munkatársai által leírt módon az NIH:200 törzsből állítottam elő.

A 48 órás, TP-S-1 tápfolyadékban fenntartott tenyészeteket 10 percre jeges vízfürdőbe mártottam. Ekkor a cső falára tapadt amőbák leválnak az üvegről. A szuszpenzióból 10 perces 1000 rpm-mel végzett centrifugálással ülepittem az amőbákat. Az üledéket háromszor mostam 50 ml 0.25M sucrose oldattal. A mosott amőbákat pH=7.2 PBS-ben reszuszpendáltam úgy, hogy a szuszpenzió 1×10^6 amőba/ml sűrűségű legyen /számlálás Bürker-kamrában/.

Az amőba-szuszpenciót MSE Ultrahang Desintegrátorral 1-2 percig kezeltem /20 kHz, 100 Watt/. A sejtszétetesést mikroszkóposan ellenőriztem. A preparátumot 10 percig 1000 rpm-mel centrifugáltam, hogy a durva, szét nem esett részeket eltávolítsam. Az így kapott, opaleszkáló felülúszót - az antigént - megfelelő adagokra osztva -20°C -on tároltam. Ezzel az antigénnel végeztem szerológiai - IHT, ELISA - vizsgálataimat.

Az IIF technikához Ambroise-Thomas szerint készítettem antigént. A kultúrákat 10 percig kis fordulatszámmal /800 rpm/ centrifugáltam, a parazitákat PBS-sel háromszor mostam /10 perc 1000 rpm/. A végső koncentrációt 20.000 amőba/ml-re állítottam be. Ebből a szuszpenzióból csepentettem a Bio-Merieux cég által készített szilikonozott lemez gyűrűibe. A lemezeket 37°C -on történő szárítás után becsomagolva -20°C -on tároltam.

Az előállított antigént a Behring cég által forgal-

mazott Cellognost^R Amoebiasis készítménnyel hasonlítottam össze. A fenti készítmény az invazív amoebiasis indirekt haemagglutinációs teszttel történő szerológiai diagnosztizálására készült.

Az összehasonlító vizsgálatokat a Behring cég reagenséhez mellékelt negatív és pozitív humán savókkal, valamint a később leírt módon készített nyúl immunsavóval végeztem. Ezen vizsgálat alapján antigén-preparátumomat megfelelőnek találtam szerológiai tesztek elvégzésére.

Hasonló módon készítettem antigént a Marosból izolált Acanthamoeba sp. monoxenikus kultúrájából, valamint a tenyésztéséhez használt Enterobacter aerogenesből is.

B./ Specifikus antiserumok előállítása

Az immunizálást a P. Myjak által leírtak szerint végeztem.

Fiatal, kb. 2.5-3 kg súlyú nyulakat intravénásan oltottam élő Entamoeba histolyticával. Az oltást öt alkalommal, öt naponként ismételttem meg. Egy oltás alkalmával 35 millió élő trophozoitát fecskendeztem be. Az utolsó oltást követő 7. napon az állatokat a vena jugularisba vezetett kanülön át elvéreztettem. A szerumot 1 ml-es ampullákba adagolva -20°C-on tároltam.

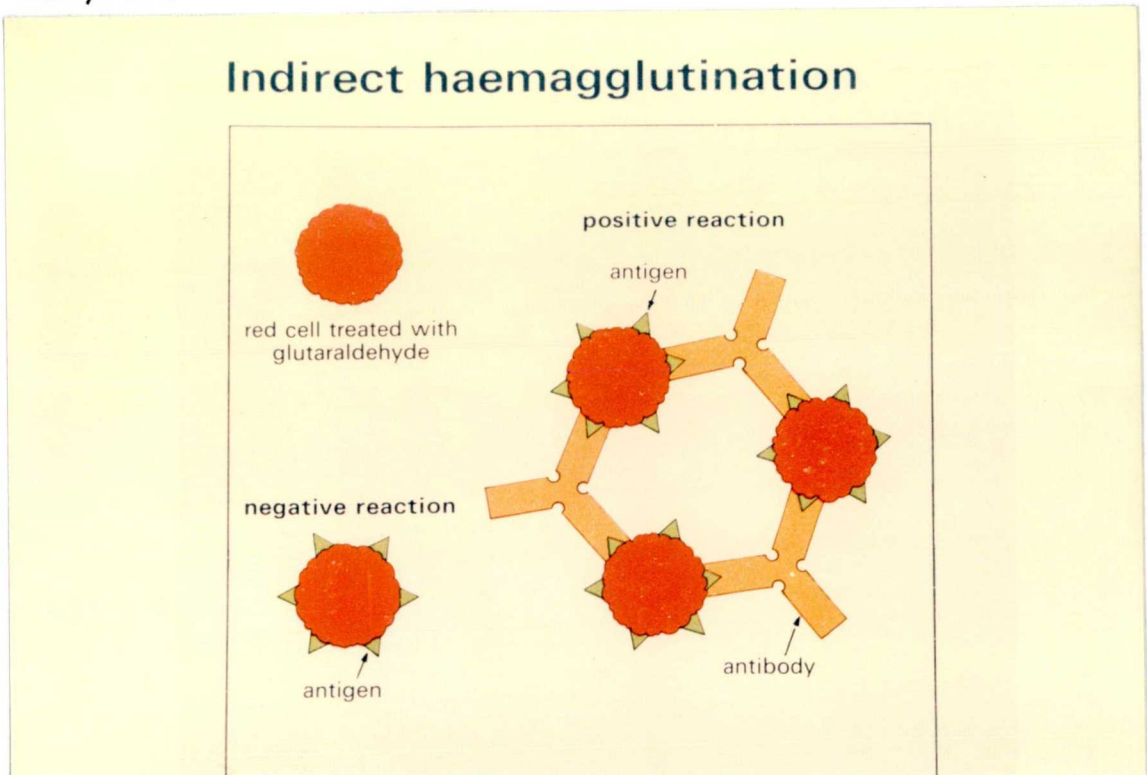
A Marosból izolált Acanthamoeba sp. tenyészetéből származó trophozoitákkal hasonló módszerrel immunizál-

tam állatot. Egy-egy oltás alkalmával 20 millió amőbát vittem be.

3.4. Szerológiai módszerek

3.4.1. Indirekt haemagglutinációs teszt /IHT/

A szerológiai módszer elve: glutáraldehiddel kezelt juh vörösvértest felszínére jórészt citoplasmátikus, kisebb részben exoantigént kötünk. Ha az antigénnel érzékenyített vörösvértest-szuszpenziót olyan szerumhígításokkal hozzuk össze, melyekben specifikus ellenanyag van, az antigén-antitest kapcsolódás láthatóvá válik azáltal, hogy a vörösvértestek lazán kapcsolódva agglutinálódnak. Az IHT igen érzékeny és specifikus az IgM és IgG tartományban.



4. ábra

A vörösvértetek glutáraldehides kezelése I.M.Krupp /1969./ leírása alapján az alábbiak szerint történt:

- A vért Alsever oldatban 1:1 arányban fogom fel.
- Az eritrocitákat kétszer mosom fiziológiás NaCl oldattal /5 perc 3000 rpm/.
- A mosást kétszer megismétlem pH=7.2 fiziológiás NaCl-TRIS puffer oldattal /5 perc 3000 rpm/.
- A vörösvérteteket 4 % glutáraldehid tartalmú TRIS-fiziológiás NaCl pufferrel pH=7.2 szuszpendálom.
- 6 órán át 37^oC-on rázással inkubálom.
- 12 órán át +4^oC-on tárolom.
- TRIS-fiziológiás NaCl oldattal tízszer mosom /5 perc 3000 rpm/.
- Az üledéket 1:20.000 Na₃N tartalmú TRIS-fiziológiás NaCl oldatban +4^oC-on tárolom.

A glutáraldehiddel kezelt vörösvértetek +4^oC-on több hónapig tárolhatók, ha hetenként pH=7.2 TRIS-fiziológiás NaCl oldattal mosom.

A glutáraldehiddel kezelt juh vvt érzékenyítése

- A tárolt vvt-szuszenziót kétszer mosom TRIS-fiziológiás NaCl oldattal /5 perc 3000 rpm/.
- A mosott vvt 10 %-os szuszpenzióját négyszeres mennyiségű antigénnel 2 órán át 37^oC-on rázatva inkubálom.
- Kétszer mosom TRIS-fiziológiás NaCl oldattal.
- Másnapig +4^oC-on pH=7.2 TRIS-fiziológiás NaCl oldatban tárolom.

Az IHT végrehajtása

/A MICROTITER Manual leírásának módosításával/

A Takátsy-féle mikrotitráló polisztirol lemez első vízszintes sorába üregenként 75 μ l Chicago kék 1^o/oo-es oldatával színezett pH=8.1 TRIS-puffert mérek.

A 2. sor üregeit üresen hagyom, a többi sorba pedig a pufferből 25 μ l-t mérek be. /A puffer összetétele: 33 g TRIS, 5.6 g NaCl, kb. 6.7 ml cc HCl, bidesztillált víz ad 1000 g, pH=8.1./

Az 1. sorba a vizsgálandó szerumok 25 μ l-ét mérem.

Egy 8 csatornás Finnpipette-vel 25 μ l-t mérek a 2. és 3. sorba, majd a 3. sortól kiindulva elvégzem a tovafutó hígítást.

Ezután a 2-8. sorba újabb 25 μ l pH=8.1 puffert mérek.

/1:8 \rightarrow 1:512/.

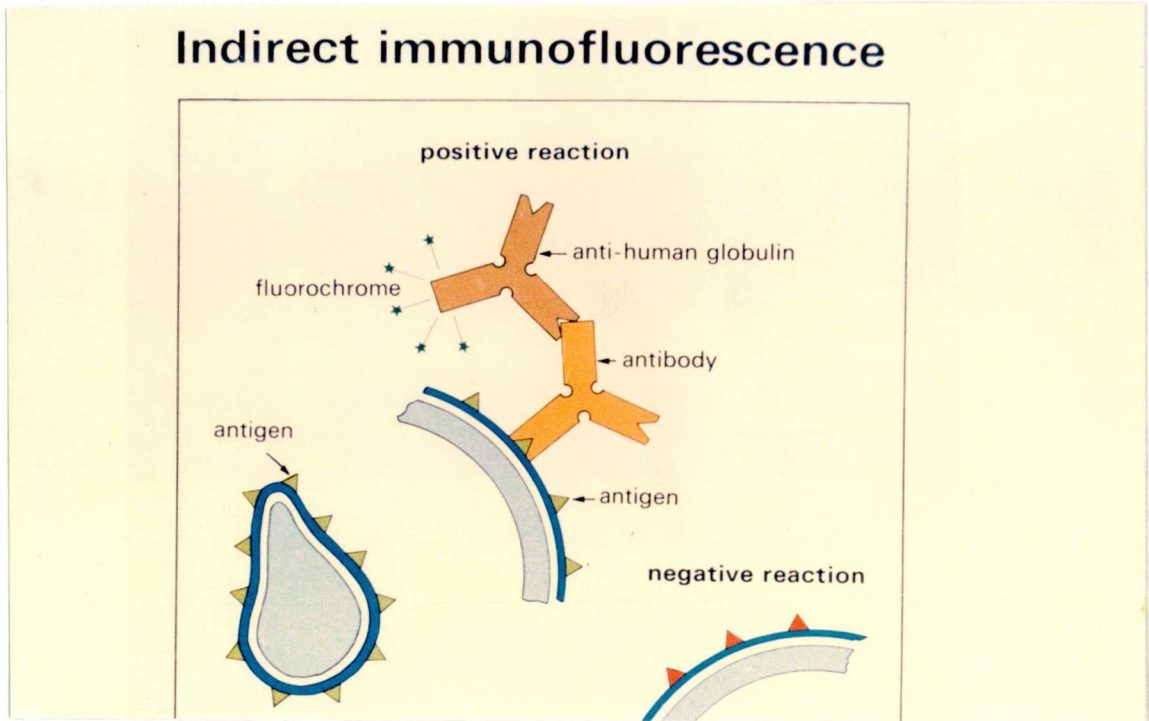
Végül a hígításokhoz 50 μ l 2 %-os érzékenyített vvt-szuszpenziót adok. A lemezeket lefedve 2 órán át szobahőmérsékleten inkubálom.

3.4.2. Indirekt immunofluoreszcencia /IIF/

A módszer elve: a fixált parazita felszínantigénjei megkötik a vizsgált szerumban lévő specifikus ellenanyagot /IgM és IgG/, és az immunkomplexet FITC-cel jelzett anti-IgM és/vagy IgG konjugátummal teszik láthatóvá.

A felszínhez kötődött konjugátum ultra-ibolya fényben

zöldes-sárga fluoreszcenciát mutat. Ellenanyagot nem tartalmazó savó esetén a protozoon vörös fényben látszik.



5. ábra

Az IIF teszt kivitelezése /P. Ambroise-Thomas 1972./

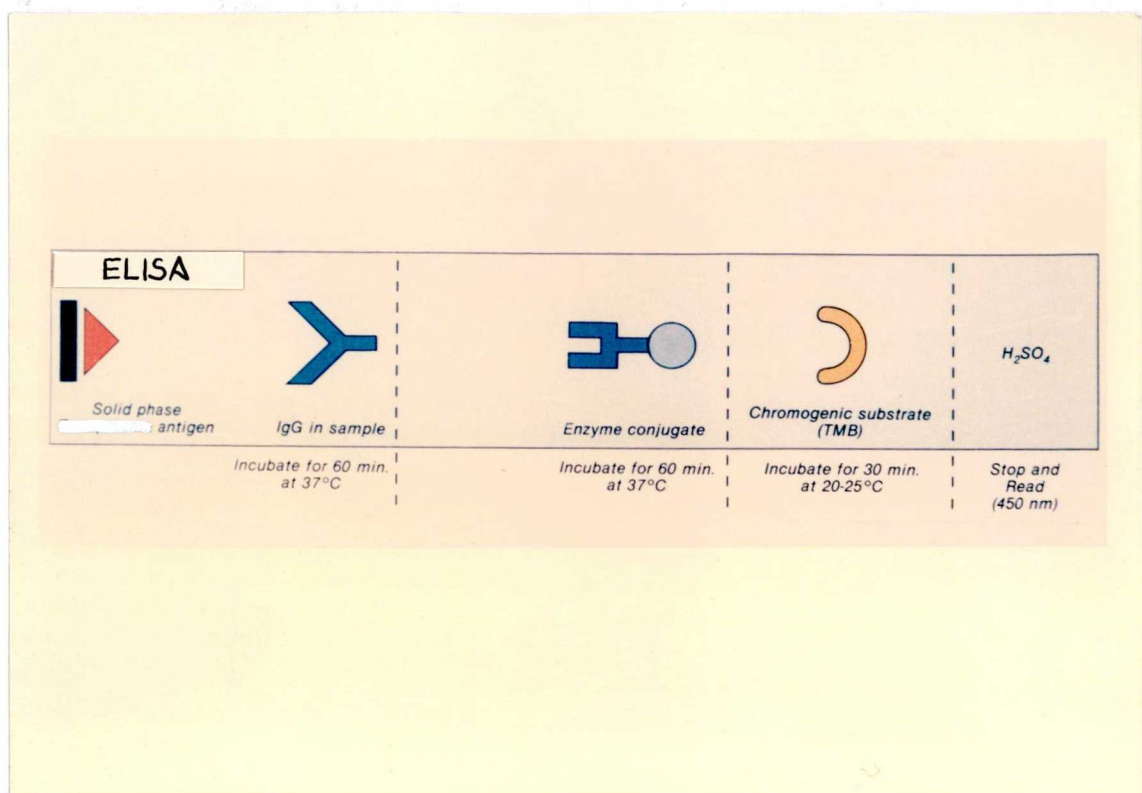
A pH=7.2 PBS-sel háromszor mosott amőbaszuszpenziót /20.000 amőba/ml/ szilikonozott tárgylemez /BIO-MERIUEX/ gyűrűibe cseppentem /0.02 ml/ és a lemezeket 37^oC-on szárítom, majd felhasználásig -20^oC-on tárolom.

- A lemezeket használat előtt gyorsan megszáritom és 10 percig tiszta acetonnal fixálom.

- A vizsgálandó szerumhígítások 0.01 ml-ét rácseppentem a fixált antigénnel fedett gyűrűre.
- 30 percig 37°C-on, nedves kamrában inkubálom.
- 10-10 percig pH=7.2 PBS-ben mosom háromszor.
- 37°C-on szárítom.
- 0.05 ml 1:20 hígítású, FITC-cel jelzett anti-humán IgM és/vagy IgG nyúlsavót cseppentek a gyűrűbe. /Az anti-humán nyúlsavót 1:200 Evans Blue-t tartalmazó pH=7.2 PBS-ben hígítom./
- 37°C-on 30 percig nedves kamrában inkubálom.
- Háromszor mosom PBS-ben.
- Desztillált vízzel leöblítem.
- 37°C-on szárítom.
- A lemezt 1 csepp pufferolt /pH=7.2/ glicerinnel fedem.
- Leolvasás NU-2 mikroszkóppal, 400x nagyítással.

3.4.3. ELISA

A módszer elve: a szilárd fázishoz kötött antigénhez a szerumhígításban lévő specifikus ellenanyag kötődik. Az így kialakult immunkomplexet enzimmel jelzett antihumán IgM vagy IgG-vel hozzuk össze. Az ily módon megkötött enzim - szubsztrátja hozzáadása után - színreakciót eredményez, melynek intenzitása a megkötött konjugátum mennyiségével arányos.



6. ábra

A reakció kivitelezése /Bos and von der Eyk 1975./

- Takátsy lemez valamennyi üregébe coating-pufferrel /pH=9.6/ hígított - előzetes vizsgálat során meghatározott arányban - antigént /170 ul/ mérek.
- Inkubálás +4⁰C-on egy éjszakán át vagy 37⁰C-on két órán át.
- A lemezt -20⁰C-on, becsomagolva hónapokig tárolhatjuk.
- Használat előtt három alkalommal 3 percig PBS-Tween 20 oldattal /pH=7.3/ mosom.

- 0.5 % BSA-t tartalmazó PBS-Tween 20 oldattal 37^oC-on 1.5-2 órán át kabátolom a lemezt.
- Mosás után PBS-Tween 20 oldattal készített szerumhígítások 150 ul-ét mérem az üregekbe.
- Nedves kamrában, 37^oC-on 1 órán át inkubálok.
- Három alkalommal 3 percig mosom PBS-Tween 20 oldattal.
- A konjugátum hozzáadása: anti-humán IgGAM-peroxidáz előzetesen meghatározott hígításából /0.5 % BSA-t tartalmazó PBS-Tween-nel hígítva/ 150 ul-t mérek az üregekbe.
- 37^oC-on történő 1 órás inkubálás vagy +4^oC-on egy éjszakán át tartó inkubálás következik.
- Három alkalommal 3 percig PBS-Tween 20 oldattal mosom a lemezt.
- A szubsztrát hozzáadása: pH=5 citromsav-dinátrium-hidrogénfoszfát pufferben oldott o-fenilén-diamin /OPD/ 0.034 %-os oldatából - melybe közvetlenül a felhasználás előtt 33 %-os H₂O₂-t mérek - 150 ul-t mérek az üregekbe.
- Sötét helyen 30 percig inkubálok.
- A reakciót 50-50 ul 4M H₂SO₄-val állítom le.
- Mérés 450 nm-en Spekol ZK.

Az ELISA módszer standardizálását /Szénási 1983./ hazai laboratóriumok közül elsőként végeztem el. A negatív savót nyúlserumnak Entamoeba histolytica szuszpenzióval

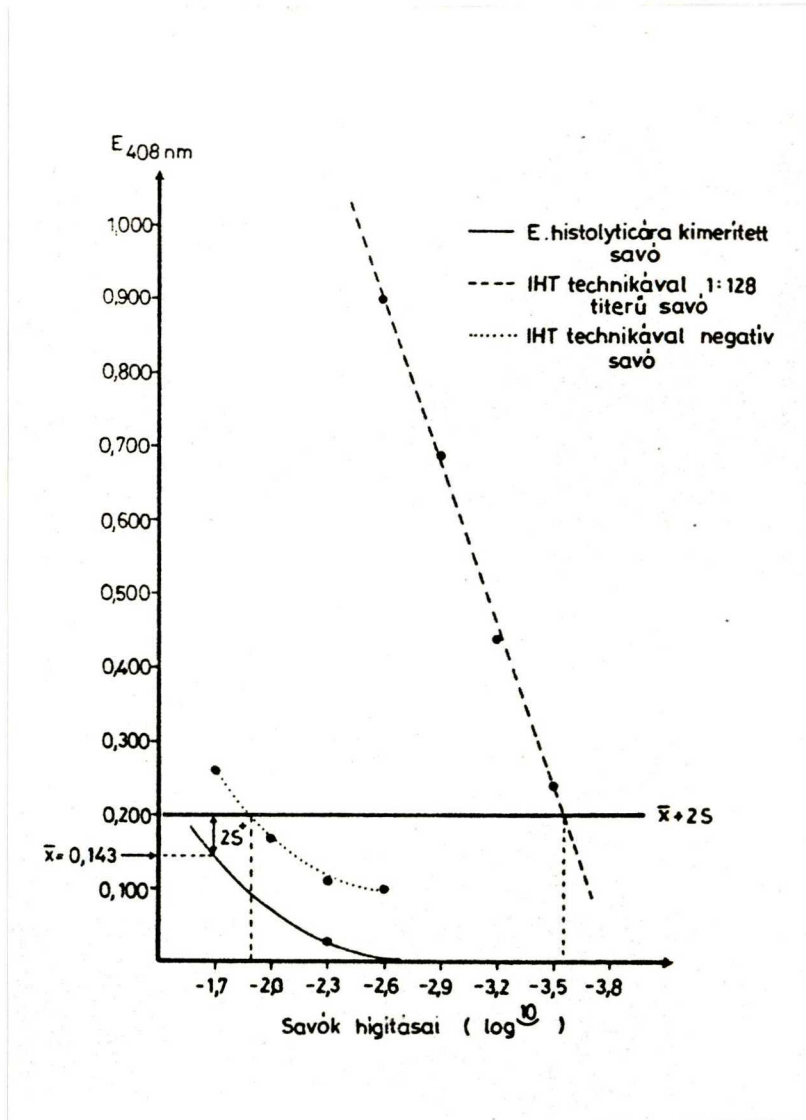
való kimerítésével nyertem. Két-három órán át szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át $+4^{\circ}\text{C}$ -on végzett inkubálás után a szérum+amőba szuszpenziót centrifugáltam. A kimerített savóból 10 párhuzamosban 50-100-200-400-szoros hígításokat készítettem. Kiszámítottam a párhuzamos hígítások extinkcióinak átlagát \bar{X} , majd a korrigált empirikus szórás S^+ értékét. Az átlag-extinkciók kétszeres szórással megemelt értékét tekintettem a szérumok titrálása során a titer értékét meghatározó extinkciónak.

A kimerített savó ötvenszeres hígításai 0.143 átlag-extinkciót adtak. A korrigált empirikus szórás az adott hígításban 0.030 volt, így a kétszeres szórással megemelt átlag-extinkció értéke 0.202.

Pozitív kontroll savóként IHT-val 1:128 feletti titerértékű nyúlsavót használtam.

A számítások grafikus ábrázolását a 7. ábrán mutatom be.





7. ábra

3.5. Elektroforetikus izoenzim vizsgálat

A protozoonok jellemzésére és biokémiai sajátásaik megállapítására egyetlen lehetőség áll rendelkezésünkre, ez pedig az izoenzimek vizsgálata. Az amőbák között feltételezett filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára is

izoenzimjeik tanulmányozása a legalkalmasabb módszer. Az azonos aktivitású, de eltérő szerkezetű izoenzimek analízise alapján határozzuk meg egy faj zymodemjeit. Ezek a primer szerkezetükben eltérő, de azonos aktivitású enzimek elektroforetikus futtatás során eltérő sebességgel vándorolnak, és így jól elválaszthatók. Az Entamoeba histolytica izoenzimjeinek poliakrilamid-gél elektroforézisével 19 zymodemet határoztak meg. Ezek közül négyet találtak humánpathogénnek. A zymogram felvételével így módon tájékozódhatunk a tenyésztéssel már diagnosztizált amőba pathogenitásáról is, melyre csupán morfológiai vizsgálat alapján nincs mód /Sargeant, 1978./.

Warhurst /1978./ megállapította, hogy a glükóz-foszfát-izomeráz /GPI/ elektroforetikus analízisével elkülöníthetők egymástól a síma és érdes falú cisztát képező *Naegleria* klonok. Különösen nagy jelentőségű ez a vizsgálat, ha a primer amoebás meningoencephalitis fertőző ágenseinek és a nem pathogén szabadon-élő amőbáknak elkülönítését tűzzük ki célul /Thomas, 1979./.

Hunter és Markert /1957./ alkalmaztak először hisztokémiai festési eljárást keményítő-gélen - elektroforetikus futtatást követően - enzimaktivitás *i n s i t u* kimutatására. Az enzim megjelenési helyét a gélben festéksáv jelzi. A gélben lévő enzimek láthatóvá tett képét nevezzük zymogramnak. A korábbi módszerekkel szemben e technika nagy előnye gyorsasága és a zónák finom fel-

bontása. A nagyfokú felbontóképesség következtében két minta migrációs sebessége közötti minimális különbség is könnyen észlelhető a gélen. A módszer érzékenységének köszönhető, hogy a zymogram-technika kedvelt eszköze számos biológiai és biokémiai területnek, és jelentősen hozzájárul ismereteink gazdagításához olyan területeken, mint az enzim-genetika, a fehérjék szerkezetkutatása, a klinikai kémia.

Az Entamoeba histolytica jellemzéséhez használt izoenzimek:

glükóz-foszfát-izomeráz /GPI/	E.C. 5.3.1.9
foszfo-glükomutáz /PGM/	E.C. 2.7.5.1
L-malat: NADP ⁺ oxidoreduktáz /ME/	E.C. 1.1.1.40
hexokináz /HK/	E.C. 2.7.1.2

Az Acanthamoeba castellanii jellemzéséhez használt izoenzimek: propionil-észteráz /PE/

foszfo-glükomutáz /PGM/
malic-enzim /ME/
malát-dehidrogenáz /MDH/
hexokináz /HK/

A Naegleria fajták jellemzésére használt izoenzimek:

propionil-észteráz /PE/
malát-dehidrogenáz /MDH/
alkalikus foszfatáz /ALP/
leucin-aminopeptidáz /LAP/

A felsorolásból kitűnik, hogy a három amőba genusban több azonos izoenzim található.

A poliakrilamid-gél elektroforézis kivitelezése:

Mathews, 1983./

Szeparáló gél /5 %-os/

29,2 % akrilamid 3,34 ml

0,8 % bisz-akrilamid

Mathews-puffer 16.65 ml

ammonium-perszulfát

/10 %-os/ 0.1 ml

TEMED 0.01 ml

Gyűjtő gél 3.75 %

29,2 % akrilamid 2.5 ml

0.8 % bisz-akrilamid

Mathews-puffer 16.65 ml

ammoniumperszulfát 0.1 ml

TEMED 0.02 ml

Az elkészített géllapot egy éjszakán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk.

Amőba-kivonat készítése:

A Neff-féle amőba-sóoldattal lemosott trophozoitákat 15 percig 800 rpm-mel centrifugáltam.

Az üledéket azonos térfogatú 1 mM di-tio-treitol

1 mM EDTA

1 mM 6-aminokapronsav tar-

talmú bidesztillált vízben szuszpendálom.

Másnapig -50°C -on tároltam.

A következő napon az üledéket 37°C -os vízfürdőben felolvasztottam, majd szárazjég-metanol keverékben újra fagyasztottam, és 37°C -on újra felolvasztottam. Ezt a procedúrát még egyszer megismételtem. Az így készített enzimkivonatot 30 percig 10.000 rpm-mel $+4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltam. A PAGE-t horizontális gélen végeztem.

Elektroforetikus előfuttatás 50 mA, 40 percen át.

Minták felvitele: 2-10 nl

Futtatás: 5 percig 60 V, majd 90 percig 175 V.

PUFFER RENDSZEREK

No.	Puffer	Elektród Komponensek /l			pH	Gél Komponensek /l			pH
		1	2	3		1	2	3	
I.	0.155 M Tris - 0.043 M citromsav /Tris-citrát/	Tris 16.35 g	Citromsav 9.04 g	-	7.0	Hígítsunk 66.7 ml elektród-puffert 1000 ml-re			7.0
II.	0.3 M borát	bórsav 18.55 g	NaOH 2 g	-	8.0	bórsav 1,86 g	NaOH 0.48 g	-	8.5
III.	0.5 M Tris-versene-borát	Tris 60.6 g	bórsav 40.0 g	Na ₂ EDTA 6.0 g	8.0	Tris 6.06 g	bórsav 6.00 g	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O 0.60 g	8.0
XX.	0.2 M foszfát	255 ml 0.2 M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	245 ml 0.2 M Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	-	6.8	Hígítsunk 65 ml elektród-puffert 1000 ml-re			7.0

2. tábla

Az elektroforézis befejeztével a gélt festettem /Shaw and Prasad, 1970., Siciliano and Shaw/.

Alkalikus foszfátáz:

I. vagy II. puffer rendszer

Festés: β -naftil-Na-foszfát	50 mg
Fast blue RR	50 mg
$MgSO_4 \times 7H_2O$	123 mg
H_2O	100 ml

Inkubálás 37°C-on a kék sávok megjelenéséig.

Leucin aminopeptidáz /LAP/:

II. puffer rendszer

Festés: Tris-malat puffer pH=6.0

A. Tris	24.2 g
Malein sav	23.2 g
B. 0.2 M NaOH	26.0 ml

Keverjünk össze 50 ml A. oldatot

26 ml B. oldatot

124 ml H_2O -t

Tris-malat puffer pH=6.0	50 ml
H_2O	50 ml
Black K só	50 mg
L-leucil β -naftilamin	20 mg

Inkubálás 37°C-on a kék sávok megjelenéséig.

Malát-dehidrogenáz /MDH/:

I. puffer rendszer

Festés: NAD ⁺	50 mg
NBT	30 mg
PMS	2 mg
1 M Na L-malat pH=7.0	10 ml
0.5 M Tris-HCl pH=7.1	15 ml
H ₂ O	70 ml
0.1 M NaCN	5 ml

Szubsztrát: 1M Na L-malat pH=7.0

L-malic sav	13.4 g
2M Na ₂ CO ₃ x H ₂ O	
/248 g/l/	49.0 ml
H ₂ O	1000.0 ml

Inkubálás 37⁰C-on 1 órán át.

Glükóz-foszfát-izomeráz /GPI/:

XX. puffer rendszer

Festés: 0.1M Tris-HCl pH=8.0	100 ml
NADP ⁺	10 mg
MgCl ₂	80 mg
PMS	1 mg
MTT	10 mg
Glükóz-6-foszfát de-	
hidrogenáz	5 ul
Fruktóz 6-foszfát	160 mg

Inkubálás 37⁰C-on kb. 1 órán át.

Hexokináz /HK/:

I. puffer rendszer

Festés: Glükóz	90 mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	21 mg
ATP	25 mg
NADP ⁺	25 mg
PMS	3 mg
NBT	20 mg
G6PD	80 egység
0.5M Tris-HCl pH=7.1	10 ml
H ₂ O	90 ml

Inkubálás 37^oC-on.

Foszfo-glükomutáz /PGM/:

I. puffer rendszer

Festés: Na ₂ glükóz 1-foszfát x	
4H ₂ O	600 mg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	200 mg
NADP ⁺	10 mg
Glükóz 6-foszfát de-	
hidrogenáz	80 egység
PMS	1 mg
NBT	20 mg
0.5M Tris-HCl pH=7.1	10 ml
H ₂ O	90 ml

Inkubálás 37^oC-on a sötétkék sávok megjelenéséig.

Malic enzim /ME/:

III. puffer rendszer + 20 mg NADP

/a gél-pufferben/

Festés: 1M Na-L-malát	pH=7.0	5 ml
NADP		15 mg
NBT		15 mg
PMS		1 mg
MgCl ₂		50 mg
0.2M Tris-HCl	pH=8.0	10 ml
H ₂ O		35 ml

Inkubálás 37⁰C-on a sötétkék sávok megjelenéséig.

A festés befejeztével a gélt desztillált vízzel leöblíttem, majd a megfelelő oldattal fixálom.

A. Alkoholos fixáló

Etanol	1000 ml
Ecetsav	400 ml
Glicerín p.a.	200 ml
Deszt.víz	800 ml

B. Glicerines fixáló

Glicerín	500 ml
Deszt.víz	500 ml

4. KÍSÉRLETES EREDMÉNYEK

4.1. Tenyésztési eredmények

4.1.1. Entamoeba histolytica

Az Entamoeba histolytica NIH:200 törzsének axenikus tenyésztését három éve tartom fenn.

Az axenikus tenyésztést /3.2.1. fejezet/ a Diamond-féle TP-S-1 tápfolyadékban /3.2.2. fejezet/ végzem. A tápfolyadék alapkomponensének, a Panmede nevű papainos emésztéssel nyert marhamáj-kivonatnak, világszerte problémát jelent a beszerzése. Ezért próbáltam meg az ezt helyettesítő májkivonat előállítását.

Irodalmi adatok szerint a marhamáj 70.9 % vizet, 19.8 % fehérjét, 4.2 % zsírt és 3.6 % szénhidrátot és epét tartalmaz.

A friss májat húsdarálóval kétszer ledaráltam, majd keses homogenizálóval pépesítettem. A papainos emésztés feltétele, hogy az enzim-fehérje arány 1:500 legyen, és a közeg pH-ját 7-7.5 között állítottam be. A kiszámított mennyiségű papaint /0.2 g/ 1000 g máj/ pH=7.2 PBS-ben feloldottam és a májpépet ezzel összekeverve egy éjszakan át +37⁰C-on inkubáltam. Másnap 20 percig 1500 rpm-mel centrifugáltam, a felülúszót pedig 121⁰C-on 15 percig steriliztem. Lehűlés után a tiszta folyadékot steril ampulláztam. A tárolás -20⁰C-on történt.

A saját készítésű májkivonat különböző mennyiségeivel készített Diamond-féle tápfolyadék használhatóságát összehasonlítottam az eredeti Panmede-t tartalmazó tápfolyadékkal és mint a 3. táblázatból kitűnik, már a 100 mg/ml koncentrációjú saját készítésű májkivonat az eredeti tápfolyadékkal azonos amőbáhozamot eredményezett.

Cső	TP-leves 20mg/ml PANMEDE	TP-leves + saját készítésű májkivonat koncentrációja			
		100mg/ml	200mg/ml	300mg/ml	400mg/ml
1.	++++	++++	++++	+++	++++
2.	++++	+++	++++	+++	+++
3.	++++	++++	++++	++++	+++

3. tábla



4.1.2. Szabadon-élő amőbák

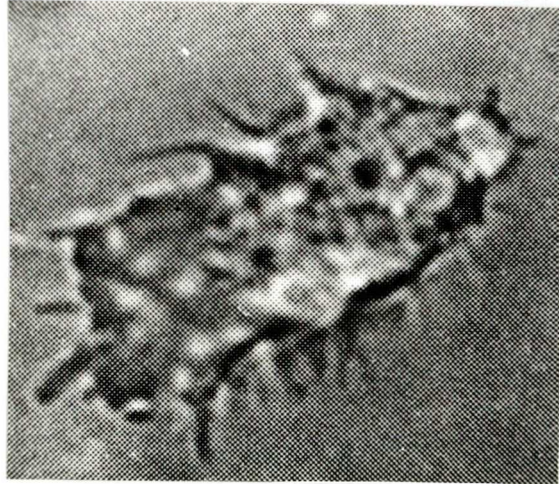
A mintavétel helyéről minden alkalommal - steril - edényben 500-500 ml vizet vittem be azonnali feldolgozásra a laboratóriumba.

A minta 200 ml-ét Gelman Metrice GA-1 5.0 um pórusnagyságú szűrőn szűrtem meg. A szűrőkorongot lefordítva - előzetesen Enterobacter aerogenesszel fedett - BST agárlemez közepére helyeztem. 37^oC-on inkubáltam és naponta ellenőriztem. Az amőbák vegetatív formái általában 5-6 nap múlva jelentek meg.

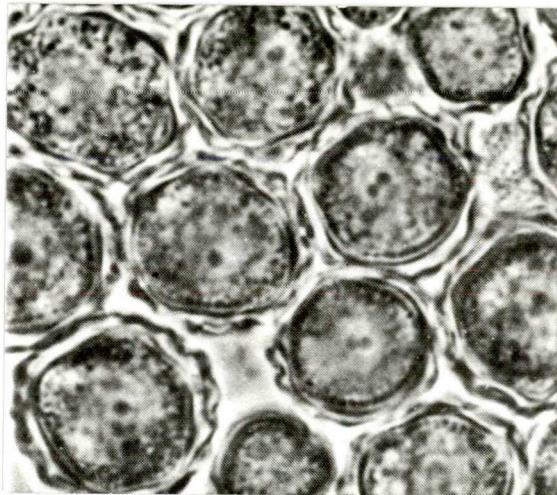
A minta 300 ml-ét 15 percig 800 rpm-mel centrifugáltam. Az üledéket 2 ml Neff-féle amoeba saline-ban szuszpendáltam és mikroszkópos ellenőrzés után a fent leírt tenyésztési módon 1 ml-ként BST agarlemez közepére öntöttem. A továbbiakban a fent leírtak szerint jártam el. Az így nyert tenyészetek természetesen további vizsgálatra még alkalmatlanok, a vízmintákból származó baktériumok és egyéb protozoonok miatt. Ezért monoxenikus kultúra előállításra volt szükséges.

Meghatároztam a tenyészetben található baktériumok antibiotikum-érzékenységét, majd ezen antibiotikumok minimális gátló koncentrációját /Benkő, 1982./. Az eredmények alapján adagolt antibiotikumokkal sikerült tenyészetemet a kísérő baktériumoktól megszabadítani.

A Marosból származó vízminta Acanthamoeba castellanii-t és egy pontosan meg nem határozott Naegleria sp-t tartalmazott.



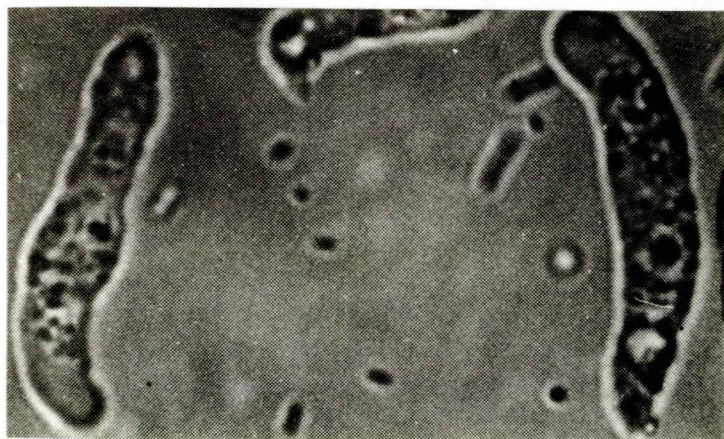
Acanthamoeba castellanii
trophozoita



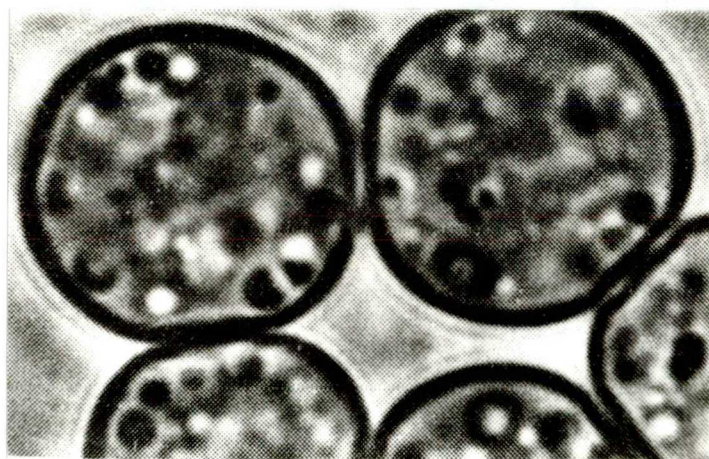
Acanthamoeba castellanii
ciszta

Az élő-Tiszából szintén egy Acanthamoeba speciest tudtam kitenyészteni.

A holt-Tiszából egy Hartmannella speciest izoláltam.

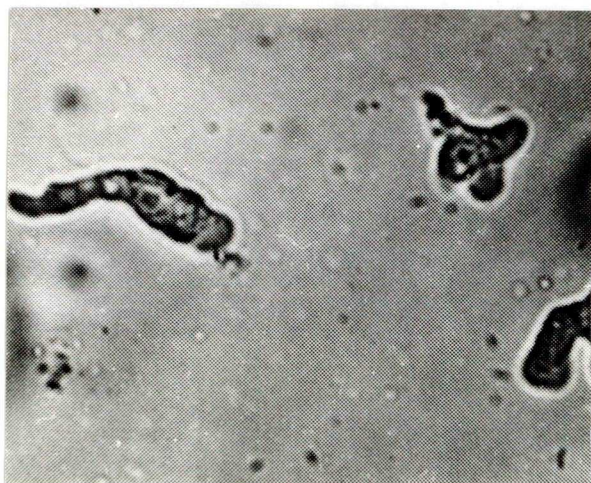


Hartmannella sp.
trophozoita

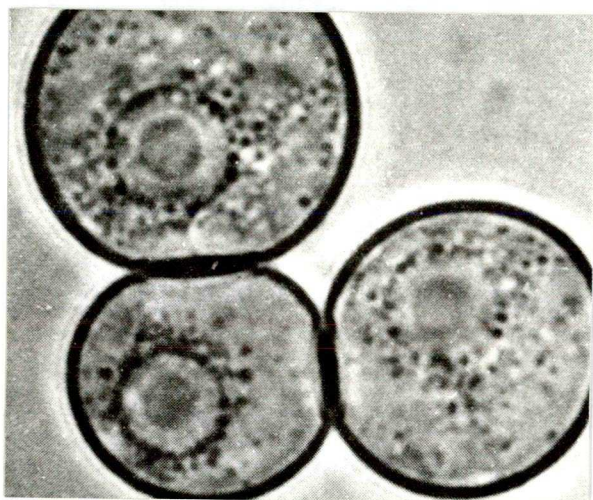


Hartmannella sp.
ciszta

A Szegedi Városi Egészségügyi- és Gyógyfürdők vizéből egy Naegleria speciest sikerült továbbtenyésztteni.



Naegleria sp.
trophozoita



Naegleria sp.
ciszta

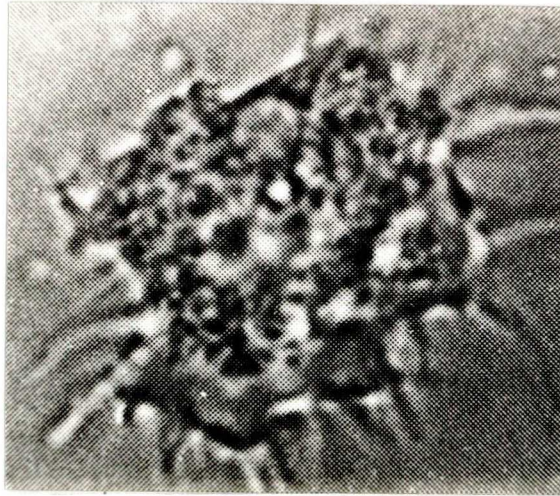
A Sportuszoda vizéből nem tudtam tenyészetet indítani. Itt jegyzem meg, hogy a mintákban természetesen egyéb amőba-fajokat is láttam mikroszkópos vizsgálataim során, azonban, mint ezt az irodalomban is sok szerző kiemeli, a limax-típusú amőbák nagy részét nem, vagy csak nagyon nehezen sikerül tenyészetben fenntartani, mert nem adaptálódnak a laboratóriumi körülményekhez.

A laboratóriumunkba meningitis gyanús betegektől érkező, bakteriológiai és virológiai vizsgálatok elvégzése után negatívnak talált liquorokat rutinszerűen mikroszkópos és tenyésztési vizsgálatoknak vetettem alá. Egy vizsgálat során egy meningeális tüneteket mutató 15 éves leány negatív liquorában számos Acanthamoeba trophozoitát találtam.

A liquort 10 percig 1000 rpm-mel centrifugáltam és az üledéket a felülúszó 0.8 ml-ében reszuszpendáltam. Ezzel a szuszpenzióval intranasalisan /150 ul 20 grammos egerenként/ 5 egeret fertőztem. Az egerek 40-56 nap múlva elhullottak. Agyukból szövettani metszet készült, melyben több, sötétben festődő Acanthamoeba cisztából álló góc látható.

A kisagy elpépesítése után lencsényi mennyiséget Enterobacter aerogenesszel fedett BST-lemez közepére oltottam és a szokásos módon inkubáltam. 24 órás inkubálás

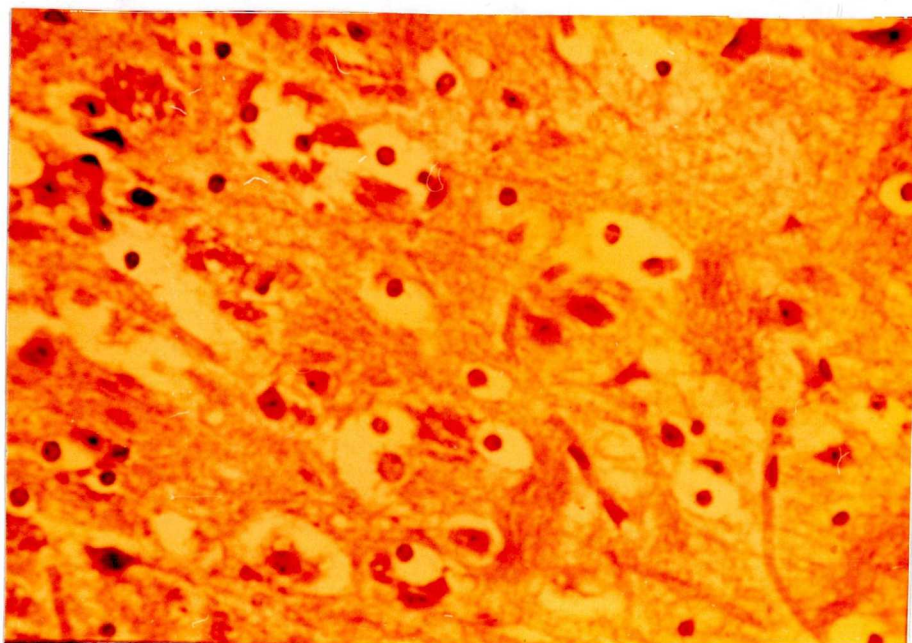
után a lemezen megjelentek az Acanthamoeba trophozoiták.



4.2. Az izolált szabadon-élő amőbák pathogenitásának vizsgálata

Az izolált amőbák lehetséges kórokozó képességét - a nemzetközileg is elfogadott módszerrel - egerek intranasalis oltásával vizsgáltam.

Egy-egy csoportban 5, egyenként 20 g súlyú egeret fertőztem. A Marosból izolált Acanthamoebával fertőzött állatok a harmadik héttől kezdődően, ataxiás tünetek jelentkezésével, elhullottak. Az agyukban /kisagy/ szövettani vizsgálattal sok Acanthamoeba cisztát és trophozoitát tartalmazó göcot találtam, amint a következő kép is mutatja.



Az egyéb eredetű amőbákkal fertőzött állatok 60 nap alatt sem betegedtek meg. Ezért a továbbiakban pathológiai vizsgálataimhoz csak a Marosból származó Acanthamoebát használtam.

Előlt Acanthamoebával immunizálási kísérleteket végeztem egereken /Rowan-Kelly, 1984./.

A monoxenikus tenyészetből származó Acanthamoebát fiziológiás sóoldattal háromszor mostam /10 perc, 800 rpm/. Ezután ultrahangos kezeléssel /háromszor 1 perc, 20 kHz, 100 Watt/ desintegráltam a trophozoitákat. A preparátumot -20°C -on tároltam.

Hasonló módon készítettem antigént az Enterobacter aerogenes BST-lemezről fiziológiás sóoldattal lemosott szuszpenziójából is.

Csoportonként 10-10, egyenként kb. 20 g-os egeret intraperitoneálisan 0.2 ml amőba, illetve baktérium antigénnel oltottam. Az amőba-antigén ml-ként 5×10^6 élő amőbát tartalmazott, így az egy alkalommal beoltott mennyiség 1×10^6 amőbának felelt meg.

Az oltásokat kéthetenként három alkalommal megismételtem.

Kontrollként 10 egeret ugyancsak három alkalommal 0.2 ml fiziológiás NaCl-oldattal oltottam.

Az utolsó oltást követő 7. napon valamennyi egeret intranasálisan 25 μ l, 1×10^6 élő Acanthamoeba tartalmazó szuszpenzióval fertőztem. A fertőzéstől számított 60 napig figyeltem az állatokat.

Az eredményeket az alábbi táblázatban foglaltam össze:

Immunizálás	Egerek száma az intranasális fertőzés napján	Az elhullás napja	Túlélők száma (60 nap után)
Acanthamoeba ag	8	9	7
Enterobact aerog	9	6, 6, 7, 9, 10, 10, 12, 15, 16,	0
0,9 % NaCl-oldat	10	6, 9, 9, 12, 14, 15, 16, 16, 19, 22,	0

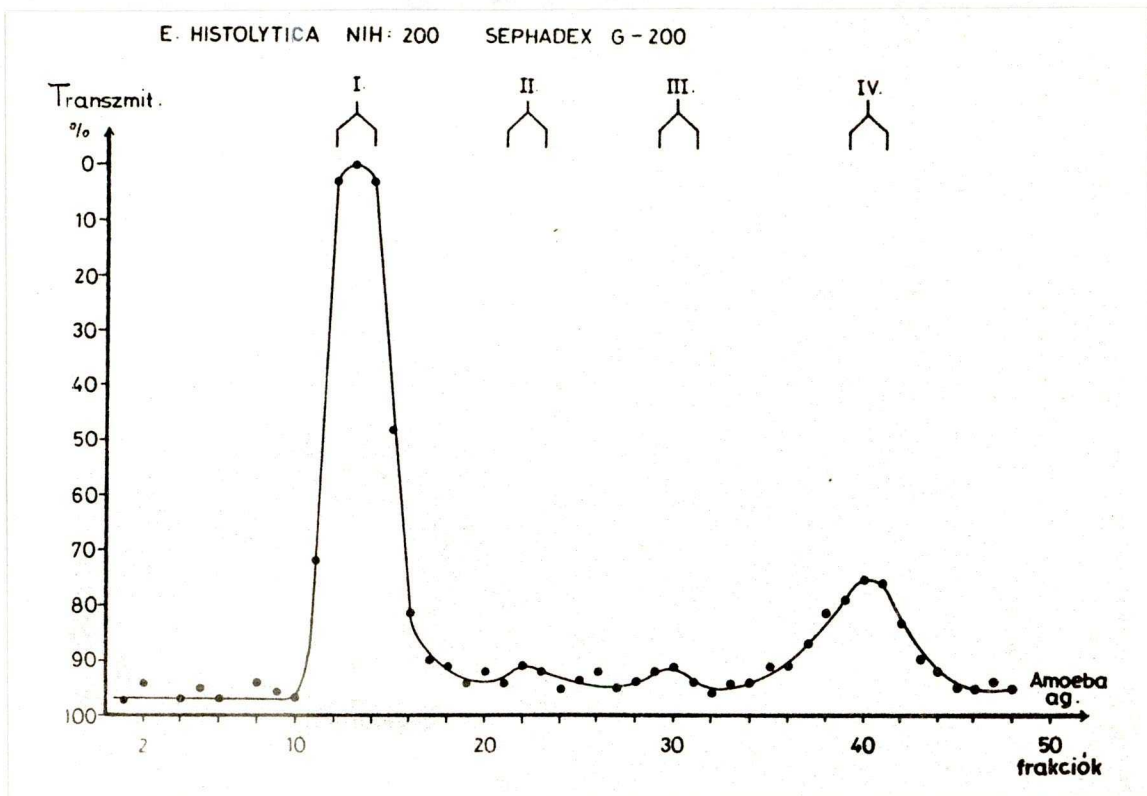
4. tábla

A kísérlet eredménye azt mutatja, hogy az általam készített antigén jó immunizáló képességgel rendelkezik, mert a vele immunizált egerek túléltek a különben halálos intranasalis fertőzést.

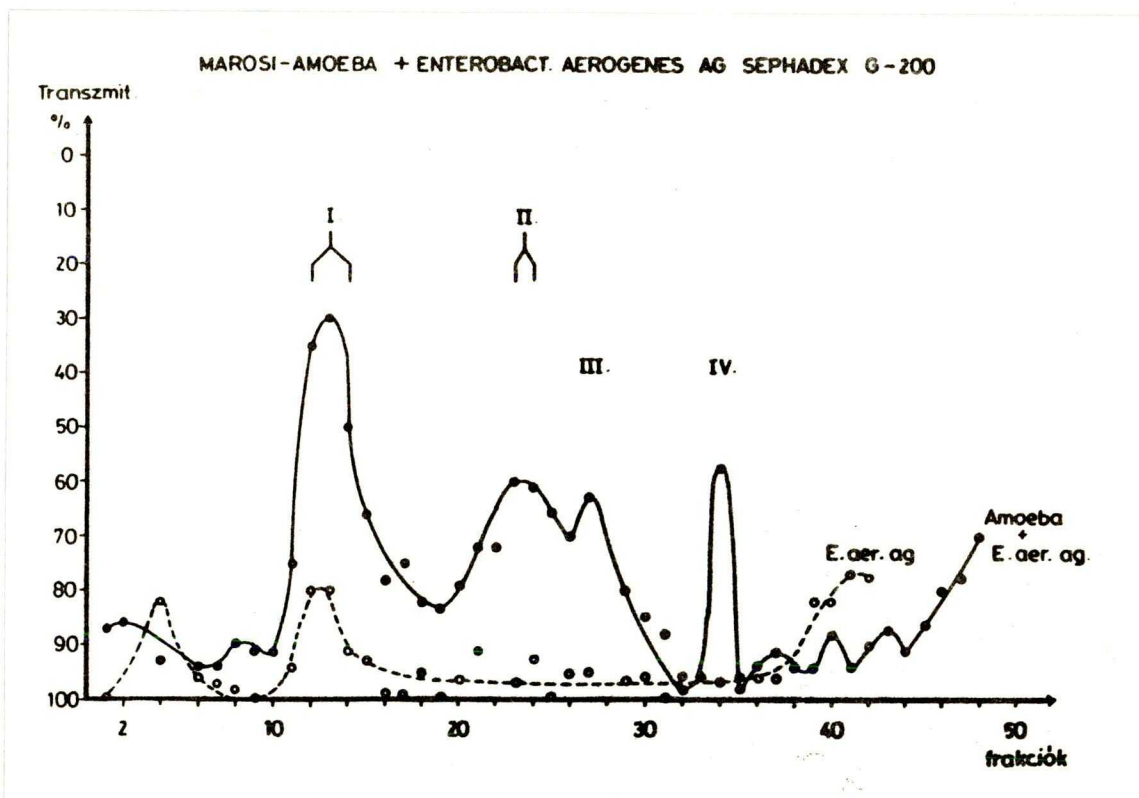
4.3. Az antigének vizsgálata

Az Entamoeba histolytica sikeres tömegtenyésztése axenikus kultúrában lehetővé tette a t i s z t a amőba antigén előállítását is. A 3.3. fejezetben leírt módon készített E. histolytica-antigént és az ugyanígy, de monoxenikus tenyészetből készült Acanthamoeba-antigént Sephadex G-200 oszlopon gélszűréssel frakcionáltam. Az eluálást 0.01 M foszfát-pufferrel /pH=7.4/ végeztem, az áramlási sebesség 24 ml/óra volt. Az abszorpciót 280 nm-en mértem. /Spektromom 195./ Az E. histolytica-antigén 1 ml-ét az Acanthamoeba 2 ml-ét az Enterobacter aerogenes-ből készült antigén szintén 1 ml-ét frakcionáltam. 2 ml térfogatú frakciókat szedtem le /30 csepp/cső/. A felvitt antigének fehérjetartalmát a vizsgálatok elvégzése előtt a Christian-Warburg módszerrel határoztam meg, mely a 260 és 280 nm-en mért extinkciós értékek felhasználásával az $E_{280} \times 1,55 - E_{260} \times 0,76 =$ = mg/ml képlet alapján adja meg a minta fehérjetartalmát:

E. histolytica - NIH:200	10.83 mg/ml
Acanthamoeba	1.66 mg/ml
Enterobacter aerogenes	1.17 mg/ml



8. ábra



9. ábra

Az E. histolytica-antigén vizsgálatokor két magas abszorpciós csúcsot kaptam: a 12-13-14 frakcióknál /I/, és a 39-40-41 frakcióknál /IV/. A két kisebb csúcs a 21-22-23 /II/ és a 29-30-31 /III/ frakcióknál jelentkezett. Az egyesített /I-től IV-ig/ frakciókkal érzékenyített vörösvértestekkel IHT-t végeztem anti-Entamoeba histolytica-nyúlsavóval szemben.

Az eredményeket a következő táblázatban foglaltam össze:

E. histolytica NIH : 200 antigén hígítások	SEPHADEX G-200 FRAKCIÓK				
	Teljes ag.	I.	II.	III.	IV.
hígítatlan	1 : 128	1 : 1024	1 : 512	1 : 256	1 : 16
1 : 10	1 : 128	1 : 1024	1 : 256	1 : 128	Negatív

5. tábla



A IV. frakció haemagglutinációs aktivitással nem rendelkezett.

Az I. frakció még 1:10 hígításban is jelentősen magasabb szérumszámokban agglutinált, mint a teljes antigén. Ennek oka, hogy a teljes antigén is, de főként az I. frakció magával a hígítószerrel /pH 8.1 TRIS puffer/ parciális agglutinációt adott. Ez, a szérumszámok magas hígításaiban is tapasztalt jelenség eredményezte a feltűnően magas titerértékeket. Ezzel szemben a II. és III. frakció nem idézett elő ilyen részleges agglutinációt, a teljes agglutináció végpontján túl sem. Vizsgálataim eredménye megegyezik P.E. Thompson és munkatársai /1968./ által közölt adatokkal.

Hasonló módszerrel az Acanthamoeba-antigén frakcionálása során is négy abszorpciós csúcsot kaptam: 12-13 /I/, 23-24 /II/, 27 /III/ és 34 /IV/ frakciókat.

Az E. histolytica megfelelő frakcióihoz hasonlóan a IV. frakció ebben az esetben sem agglutinált, az I. frakció pedig ugyancsak a teljes antigénnél jóval magasabb titerben adott pozitív eredményt.

A Sephadex G-200 gélszűréssel végzett antigén-tisztítás előnye, hogy a teljes antigén helyett egy parciális agglutináció mentes, ugyanakkor megfelelő specificitású frakcióval tudunk dolgozni.

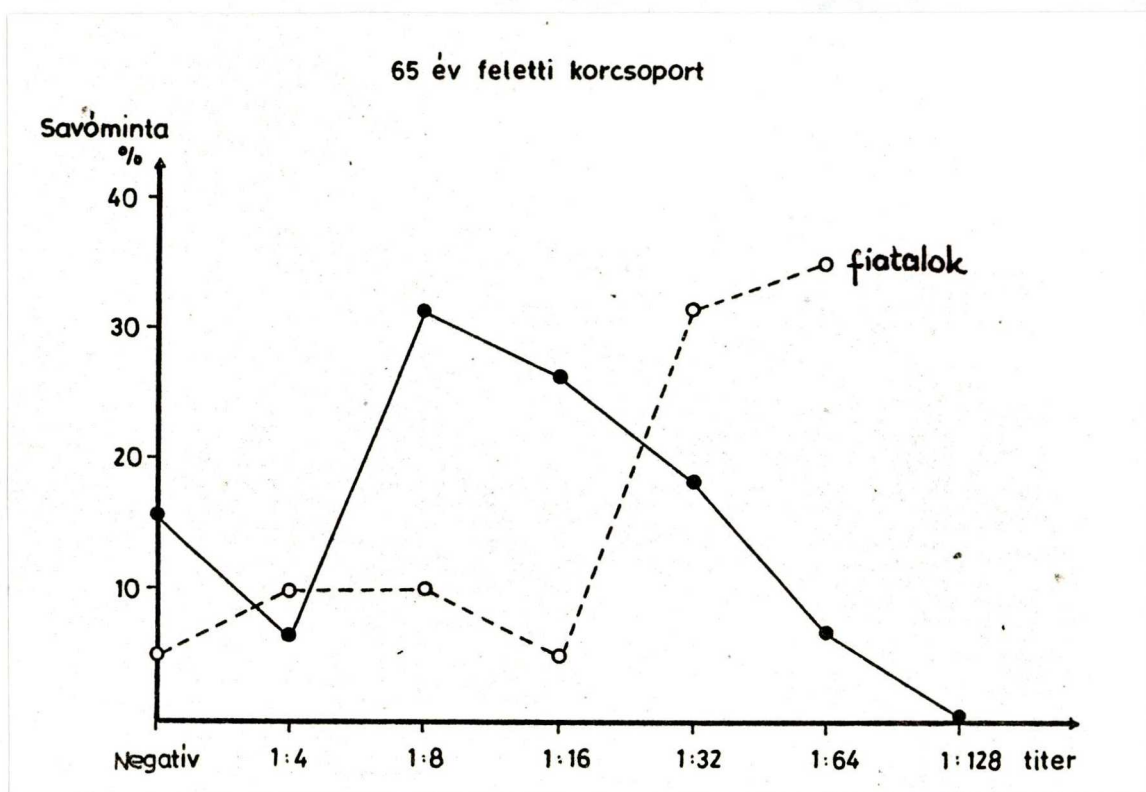
4.4. Immunizálási és szerológiai eredmények

4.4.1. Epidemiológiai vizsgálatok a klárafalvi populációban

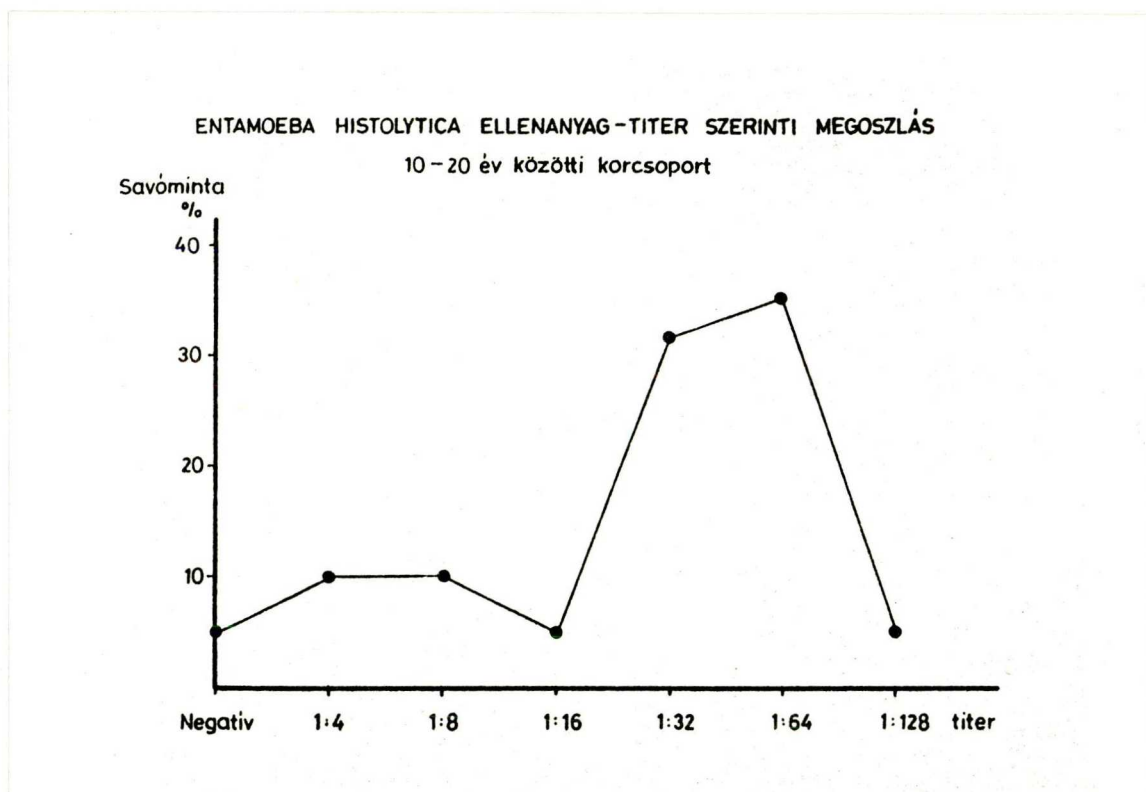
A szabadon-élő amőbák izolálás céljából való begyűjtése során a Maros folyó Klárafalva melletti lapályos ágából vett vízmintában Acanthamoeba castellanii-t és egy Naeqleria sp-t is találtunk.

Klárafalva teljes lakossága egyéb célból /Toxolpasmusis/ szerológiai vizsgálatban vett részt. Közülük a 65 év feletti valamennyi, azaz nyolcvan személy, és a 10-20 év közötti fiatalok közül 22 savómintáját amőba-antigénnel is megvizsgáltuk. Az idősek savóiban /10. ábra/ nem, vagy csak igen alacsony titerben volt ellenanyag, megjegyezve, hogy idős egyének immunreaktivitása gyengül. A fiatalok vizsgálati anyagában viszont /11. ábra/ hat savó 1:32, hét savó 1:64, és egy savó 1:128 titerben agglutinálta az E. histolytica antigénnel érzékenyített vvt-t.

Megállapítottuk, hogy az emelkedett ellenanyagszint azoknál a fiúknál volt található, akik rendszeresen fürödtek a Marosnak ebben az ágában.



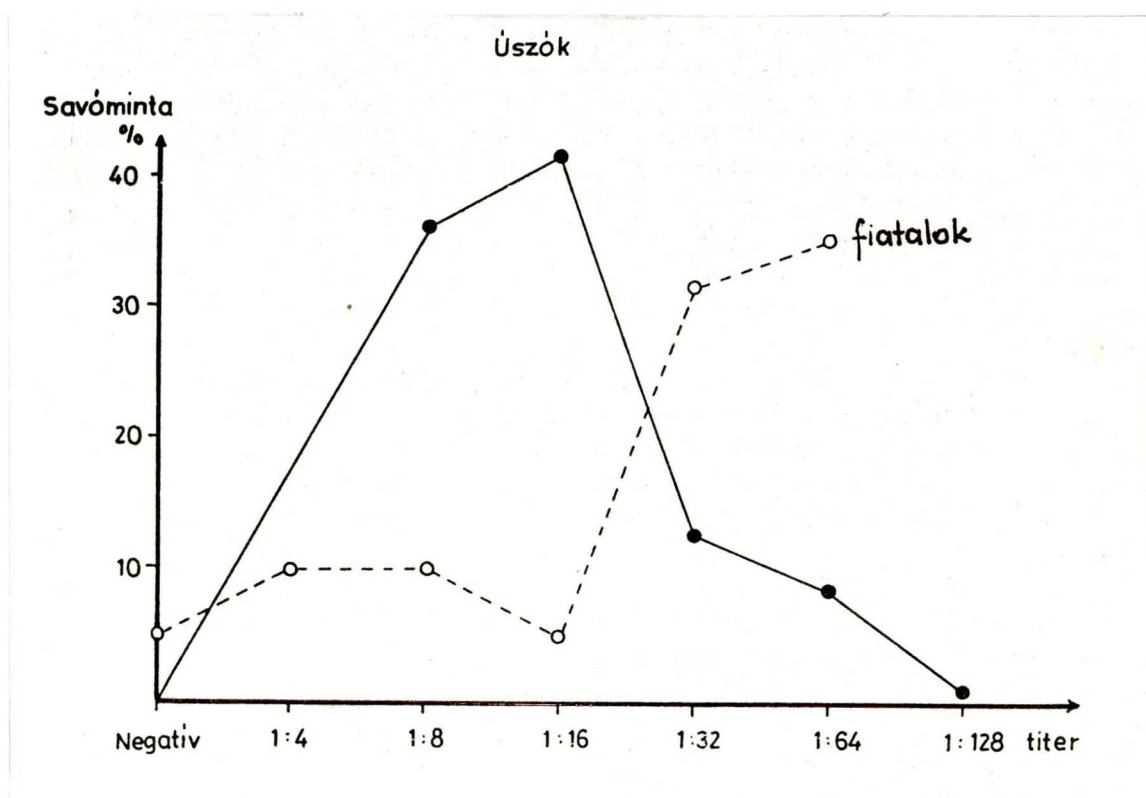
10. ábra



11. ábra

4.4.2. Epidemiológiai vizsgálatok vízisportolók körében

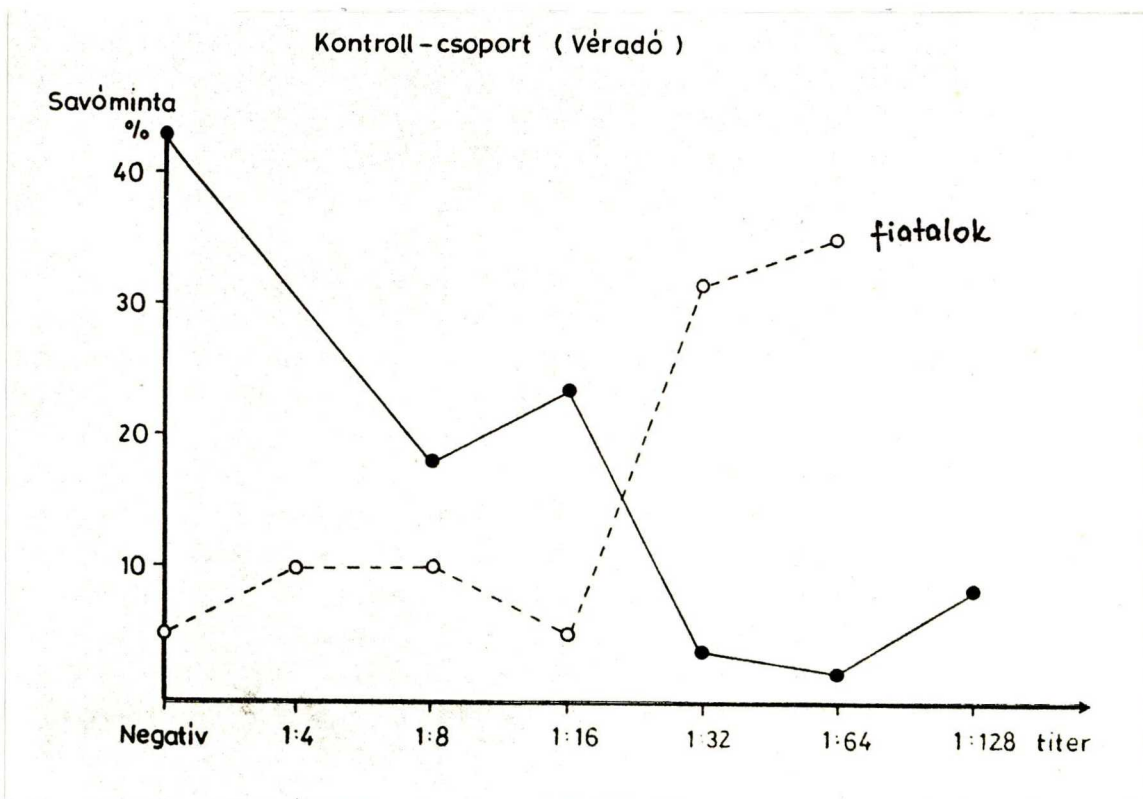
Megvizsgáltam a szegedi Sportuszodában rendszeresen edzésen résztvevő huszonként úszó savómintáit. Az uszoda vizének ismételt vizsgálata során a vízben Acanthamoeba sp-t nem találtam. Amint várható is volt, a sportolók savóinak ellenanyagszintje is határérték alatt volt /12. ábra/.



12. ábra

4.4.3. Kontroll csoport

A Csongrád megyei Véradó Állomás bankjából válogatás nélkül kapott ötven vérminta is hasonló eredményt mutatott /13. ábra/.



13. ábra

4.4.4. Amőbás meningoencephalitis eset ismertetése

A 4.1.2. fejezetben ismertetett PAME eset során a beteg ellenanyag szintjének változását is vizsgáltam.

Az Acanthamoeba liquorból történt kimutatása idején a savó ellenanyagtitere /IHT-val/ 1:8-ban negatív volt. Ez az érték 40 nap alatt 1:64 titerre emelkedett. A fenti szerológiai vizsgálatokat a 3.4.1. fejezetben ismertetett IHT-val, E. histolytica ellenanyaggal szemben végeztem.

4.4.5. Állatimmunizálási eredmények

A feltételezett antigénszerkezeti hasonlóság igazolására E. histolyticával és Acanthamoeba castellanii-val immunizált nyulak savójával IHT-t végeztem, E. histolytica tisztított antigénnel érzékenyített, glutáraldehiddel kezelt juh vvt-vel. Ugyancsak elvégeztem a KKT és IIFT technikával az immunsavók keresztreakcióit. Az egyértelmű eredmény leolvasható a 6. táblázaton.

	IHA	KKR	IIF
Anti - E. histolytica nyulsavó	1 : 128	1 : 256	1 : 256
Anti - Acanthamoeba nyulsavó	1 : 128	1 : 128	1 : 128
Kontroll nyulsavó	1 : 8	1 : 2	Negatív
Kontroll humánsavó	Negatív	Negatív	Negatív
Humánsavó I.	1 : 64	1 : 8	1 : 64
Humánsavó II.	1 : 64	1 : 4	1 : 64
Humánsavó III.	1 : 8	Negatív	Negatív

6. tábla

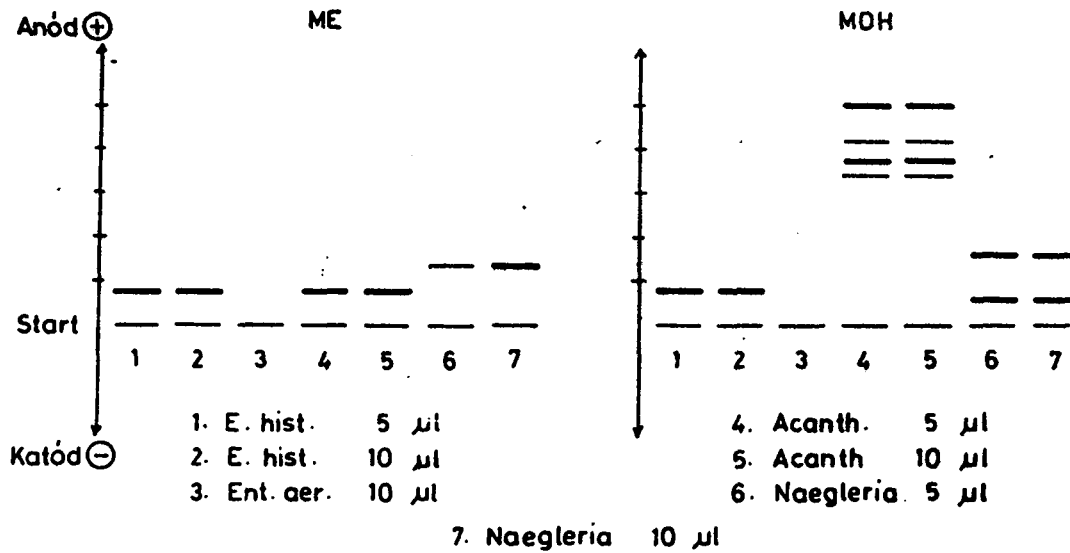
Az Entamoeba histolyticával és az Acanthamoeba sp-szel immunizált nyulak savójában mindhárom szerológiai módszerrel azonos titerértékeket kaptam. Ezek az eredmények is igazolni látszanak azt a feltevést, hogy a két amőbafaj antigénszerkezetében jelentős hasonlóság van. Ez arra is felhívja a figyelmet, hogy az Entamoeba histolytica antigénnel végzett szerológiai vizsgálatok specificitása megkérdőjelezhető, és mint sok szerológiai vizsgálat, csak alapos kliniko-pathológiai elemzés után értékelhető.

4.5. Összehasonlító izoenzim vizsgálatok Entamoeba histolyticával és szabadon-élő amőbákkal

A 3.5. fejezetben leírt módon E. histolytica NIH:200 axenikus tenyészetéből és a Marosból izolált Acanthamoeba castellanii-ből, valamint a Városi Egészségügyi és Gyógyfürdők vizéből izolált Naegleria sp-ből kivonatot készítettem. A két utóbbi amőba monoxenikus tenyészetében jelenlévő Enterobacter aerogenesből is hasonló eljárással készítettem kivonatot.

Az enzim-kivonatokkal MDH és ME izoenzim gél elektroforézist hajtottam végre.

A kivonatokból 5-10 nl mintát vittem fel a géltre. Az elektroforézist a leírt módon végeztem el. Futtatási idő 75 perc volt. Az eredményeket az alábbi zymogramokon tüntettem fel.



14. ábra

Az izoenzim vizsgálatok a protozoológiában egy viszonylag új vizsgálati módszer. Fajmeghatározásra, a fajon belül a pathogén és apathogén zymodémek elkülönítésére, a pathogén zymodémek gyógyszerérzékenységének meghatározásával a leghatékonyabb terápia kiválasztására alkalmas. Szem előtt kell tartani azonban, hogy csak több enzimrendszer vizsgálatával közelíthetjük meg a valódi összefüggéseket.

MEGBESZÉLÉS

Munkám során sikerült az Entamoeba histolytica NIH:200 törzsét axenikus tenyészetben az általam kis-mértékben módosított Diamond-féle TP-S-1 tápfolyadékban fenntartani. Továbbá a vizekben /folyók, uszodák/ talált szabadon-élő amőbafajták közül az Acanthamoeba castellanii és egy Naegleria sp. monoxenikus tenyészetét is beállítottam.

Az Entamoeba histolytica és az Acanthamoeba castellanii tenyészetből megfelelő tisztaságú, állatok immunizálására és szerológiai próbák végzéséhez alkalmas antigéneket állítottam elő. Az Entamoeba histolytica antigénnel standardizáltam az indirekt ELISA módszert.

A különböző amőbafajokkal immunizált nyulak savójával szerológiai reakciókat végeztem, és azt találtam, hogy a vizsgált immunsavók az Entamoeba histolytica antigénnel szemben azonos titerben adnak pozitív reakciót. Ezek alapján feltételeztem az antigénszerkezeti közeli rokonságukat.

Az előállított antigének felhasználásával végzett szerológiai próbákkal epidemiológiai felmérést is folytattam. Titeremelkedést találtam azoknál a fiataloknál, akik rendszeresen fürödtek a Maros folyónak abban az

ágában, melyből Acanthamoeba castellanii-t tudtam izolálni. A laboratóriumba érkező, bakteriológiailag és virológiailag negatív liquorokat rutinszerűen vizsgáltam, szabadon-élő amőbák felderítése céljából. Hazánkban először sikerült Acanthamoeba sp. okozta meningitises esetet igazolnom.

A pathogén és apathogén amőbák közötti filogenetikai kapcsolat vizsgálatához izoenzim vizsgálatokat is végeztem.

Köszönetet mondok dr. Földes Józsefnek, a SZOTE Központi Klinikai Mikrobiológiai Laboratórium vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra disszertációm elkészítését, valamint munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati segítségéért.

Megköszönöm dr. Biczók Ferencnek és dr. Rózsa Józsefnek dolgozatom írása közben adott értékes útmutatásaikat.

Szeretném megköszönni Tóth Zsigmondné és Kállay Eleonóra laboratóriumi asszisztenseknek, hogy munkámban segítségemre voltak.

IRODALOMJEGYZÉK

- Alexeieff, A., 1912. - Sur les caractères cytologiques de la systématique des amibes du groupe limax /Neogleria nov. gen. et Hartmannia nov. gen./ et des amibes parasites des vertébrates
Bull. Soc. Zool. France, 37, 55-75.
- Ambroise-Thomas, P., and Truong, T.K. 1972. - Fluorescent antibody test in amebiasis. Clinical applications. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24:907-912.
- Apley, S. et al, 1970. - Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. Brit. Med. J., 1, 596-599.
- Armstrong, J., and Pereira, M., 1967. - Identification of "Ryan virus" as an amoeba of the genus Hartmannella. Brit. Med. J., 1, 212-214.
- Bakács, T. 1966. - Általános és részletes járványtan.
Medicina Budapest
- Benkő M., 1982. - Gyors mikromódszer kidolgozása az antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának meghatározására, antibiogram készítése automatával
Doktori értekezés, SZOTE
- Biagi, F., 1981. - Amebiasis. Antibiotis Chemother, 30, 20-27.
- Bos, H. J., von der Eyk, A.A., 1975. - Application of ELISA in the serodiagnosis of amoebiasis. Trans. Rr. Soc. Trop. Med. Hyg. 69:440.

- Butt, C., 1966. - Primary amebic meningoencephalitis. New England J. Med., 274, 1473-1476.
- Butt, C. and Baro, C. and Knorr, R.W., 1968. - Pathologic progress in amebic encephalitis. Am. J. Clin. Path., 50, 568-574.
- Carter, R.F., 1968. - Primary amoebic meningo-encephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. J. Path. Bact., 96, 1-25.
- Carter, R.F., 1970. - Description of a Naegleria species isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. J. Path., 100, 217.
- Carter, R.F., 1972. - Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 66, 193-213.
- Callicott, J.H. et al 1968. - Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoeba. J.A.M.A., 206:579.
- Callicott, J. 1968. - Amebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the Hartmannella /Acantamoeba/ Naegleria group. Amer. J. Clin. Path., 49, 84-91.
- Chang, S., 1971. - Small, free-living amebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis and resistance. Curr. Topics. comp. pathobiol. 1, 201-254.

- Chang, S.L., 1974. - Etiological, pathological, epidemiological, and diagnostical considerations of primary amoebic meningoencephalitis. CRC Critical Review in Microbiology, 135-159.
- Cerva, L., Novak, K., 1968. - Amoebic meningoencephalitis: Sixteen fatalities. Science 160:92.
- Cerva, L., 1969. - Amoebic meningoencephalitis: Axenic cultures of Naegleria. Science, 163, 570.
- Chatton, E. and Lalung-Bonnaire, 1912. - Amoeba limax /Vahlkampfia n. gen./ dans l'intestin humain, etc. Bull. Soc. Path. Exot. Paris, 5, 135-143.
- Conrath, T.B., Coupe, N.B., 1978. - Handbook of Manual Microtiter Procedures, pp. 209-215.
- Costas, M., Griffiths, A.J., 1984. - The esterases and acid-phosphatases of Acanthamoeba /Amoebida, Acanthamoebidae/. Protistol., T.XX. fasc. 1, p. 33-41.
- Culbertson C.G. et al, 1959. - Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba. Amer. J. Pathol., 35, 185-187.
- Culbertson C.G. et al, 1968. - Pathogenic Naegleria sp. study of a strain isolated from human cerebrospinal fluid. J. Protozool., 15, 353-363.
- Culbertson C.G., 1971. - The pathogenicity of soil amebas. Ann. Rev. Microbiol., 25, 231-254.

- Culbertson, C.G., 1981. - Amebic Meningoencephalitis.
Antibiotics Chemother., Vol. 30, pp. 28-53.
- Daggett, P.M., Nerad, T.A., 1983. - The biochemical
identification of Vahlkampfiid amoebae.
J. Protozool., 30/1/, pp. 126-128.
- Daggett, P.M. et al, 1982. - Distribution and possible
interrelationships of pathogenic and nonpathogenic
Acanthamoeba from aquatic environments.
Microbiol. Ecol., 8:371-386.
- Dangeard, P., 1910. - Études sur le développement et la
structure des organismes inférieurs. Le Botaniste,
11. 1-311.
- Das S.R., 1971. - Chemotherapy of experimental amoebic
meningo-encephalitis in mice infected with Naeg-
leria aerobia. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.,
65, 106-107.
- Derrick, E., 1948. - A fatal case of generalized Amoe-
biasis due to a protozoan closely resembling if not
identical with Iodamoeba butschlii. Tr. Roy. Soc.
Trop. Med. and Hyg., 42, 191-198.
- Diamond, L.S., 1968. - Techniques of axenic cultivation
of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and Ent-
amoeba histolytica-like amebae. J. Parasitology,
54, 1047-1056.

- Diamond, L.S., 1978. - New medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72, 431-432.
- Dos Santos, J.G., 1970. - Fatal primary amebic meningoencephalitis. A retrospective study in Richmond, Virginia. *Am. J. Clin. Path.*, 54, 737-742.
- Duma, R.J. et al., 1971. - Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. *Ann. Intern. Med.*, 74, 923.
- Duma, R.J., 1972. - Primary amebic meningoencephalitis. *C.R. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 3, 163-192.
- Farshy, D.C., Healy, G.R., 1974. - Use a stable sensitized cells in indirect mikro hemagglutination test for amebiasis. *Applied Microbiology*, Vol. 27, No. 1. p. 11-15
- Fodor és Vedres, 1972. - A közegészségtan és járványtan alapjai. *Medicina*. Budapest
- Fowler, M. and Carter, R.F., 1965. - Acute pyrogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. *Brit. Med. J.*, 2, 740-742.
- Halpert, B. and Ashley, J.D., 1944. - Amoebic colitis complicated with abscess of brain. *Arch. Pathol.*, 38, 112.

- Hartmann, M., 1910. - Untersuchungen über parasitische Amoeben. Arch. F. Protisk., 18, 207-220.
- Jadin, J.B. et al, 1971. - Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés á Anvers /Belgique/. Ann. Soc. belge Méd. trop., 51, 255-266.
- Jadin, J.B., 1973. - De la méningo-encéphalite Amebienne et du pouvoir pathogène des amibes "Limax" Année Biologique, 305-342.
- Jahnes, W., Fullmer, H. and Li, C., 1957. - Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 96, 484-488.
- Jeon, K.W., 1973. - The Biology of Amoeba Academic Press, Chapter 2. Taxonomy and Phylogeny by Bovee. F.C. and Jahn, T.L., 38-82.
- Jonckheere, J.F., 1983. - Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus Acanthamoeba. J. Protozool., 30./4/, pp. 701-706.
- Kernohan, J. et al, 1960. - Granuloma of brain probably due to Endolimax williamsi /Iodamoeba butschlii/. A. M. A. Arch. Path., 70, 576-580.
- Kertai, P., 1984. - Közegészségtan. Medicina. Budapest

- Krupp, I., 1969. - Glutaraldehyde-treated cells in the indirect hemagglutination test for amebiasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 18:666-669.
- Lesage, A., 1905. - Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds. Ann. Inst. Pasteur, 19, 9-16.
- Little, J. and Chang, R., 1965. - Radiation-resistance in "Lipovirus"-altered human cells. Science, 148, 1746.
- Mandal, B.N. et al, 1970. - Acute meningo-encephalitis due to amoeba of the order Myxomycetale /slime mould/. New. Zel. Med. J., 71, 16-23.
- Martinez, B.M., 1975. - The history of amebiasis. International Conference on Amebiasis, Mexico-City, Oct 27-29.
- Mathews, H.M. et al, 1983. - Polyacrylamide gel electrophoresis of isoenzymes from Entamoeba species. J. Clin. Microbiol., 17:1009-1012.
- Michel, R., Just, H.M., 1984. - Acanthamoeben, Naeglerien und andere freilebende Amoeben in Kuehlund Spülwasser von Zahnbehandlungseinheiten Zbl. Bact. Hyg., I. Abt. Orig. B 179, 56-72.
- Mirelman, D. et al, 1984. - Entamoeba histolytica: Virulence enhancement of isoenzyme-stable parasites. Exper. Parasit., 57. 172-177.

- Momen, H., 1984. - Parasite characterization by zymodeme analysis. *Genes and Antigens of Parasites*, pp. 111-120.
- Musgrave, W.E. and Clegg, M.T., 1966. - The cultivation and pathogenesis of amoebae. *Phillipp. J. Sci.*, 1.
- Müller, M., 1959. - A protozoonok tiszta tenyészetének néhány kérdése. *Biológiai Közlemények* 7:83-96.
- Myjak, P., 1970. - Comparative studies of the antigenic properties of some indigenous and imported strains of *Entamoeba histolytica*. *Bulletin of the Institute of Marine Medicine in Gdansk* No 3/4., Vol. XXI.
- Nerad, T.A., Daggett, P.M., 1979. - Starch gel electrophoresis: An effective method for separation of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* strains. *J. Protozool.*, 26/4/, pp. 613-615.
- Noc, F., 1909. - Recherchessur la dysenteris amibienne en Cochinchine. *Ann. Inst. Pasteur*, 23, 177-204.
- Page, F., 1967. - Redefinition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of 3 species. *J. Protozool.*, 14, 709-724.
- Page, F., 1969. - *Hartmannella limax*: the original *limax amoeba*? *Amer. Microb. Soc.*, 88, 199-204.
- Page, F., 1976. - An illustrated key to freshwater and soil amoebae. *Scientific Publication* No. 34.

- Patras, D. and Andujar, J., 1966. - Meningoencephalitis due to Hartmannella /Acanthamoeba/. Amer. J. Clin. Pathol., 46, 226-233.
- Petrilla, 1961. - Részletes járványtan. Medicina. Budapest
- Rowan-Kelly, B., Ferrante, A., 1984. - Immunisation with killed Acanthamoeba culbertsoni antigen and amoeba culture supernatant antigen in experimental Acanthamoeba meningoencephalitis, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78, 179-182.
- Sargeant, P.G., Williams, J.E., 1978. - The differentiation of invasive and noninvasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 72:519-521.
- Sargeant, P.G. et al, 1980. - A comparative study of Entamoeba histolytica /NIH:200, HK-9, etc/, "Entamoeba histolytica-like" and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 74:469-474.
- Sargeant, P.G. et al, 1982. - Electrophoretic isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica and Entamoeba chattoni in a primate survey. J. Protozool., 29. pp. 136-139.

- Sargeant, P.G. et al, 1982. - A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. Arch. Invest. Méd. /mex./ 13 /Supl. 3/:89.
- Shaw, C.R. and Prasad, R., 1969. - Starch gel electrophoresis of enzymes - A complication of recipes. Biochemical Genetics, 4:297-320.
- Shumaker, J.B. et al, 1971. - *Naegleria gruberi*: Isolation for nasal swab of a healthy individual. Lancet, 2, 602.
- Singh, B., 1952. - Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B., 236, 406-461.
- Singh, B. and Das, S.R., 1970. - Studies on pathogenic and non pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order amoebida. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., 259, 435-476.
- Smith, I. - Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Chapter 8: Separation and visualization of enzymes on gels. William Heinemann Medical Books Ltd., London.

- Symmers, W.S.C., 1969. - Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.*, 4, 449-454.
- Szénási, Zs., Szöllősy E., Heszler E., 1983. - *Candida albicans* ellenanyag titrálása különböző szerológiai módszerekkel. *Laboratóriumi Diagnosztika*, X. évf. 3-4. sz. 115-117.
- Taylor, A.E.R., Baker, J.R., 1978. - *Methods of Cultivating Parasites in Vitro*, Academic Press, London, 2-37.
- Thompson, P.E. et al, 1968. - Preparation and evaluation of standardized amoeba antigen from axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39, 349-365.
- Thong, V.H. et al, 1977. - Growth inhibition of *Naegleria fowleri* by tetracyclin, rifamycin, and miconazole. *Lancet*, pp. 876.
- Várnai, F., 1973. - Trópusi betegségek, *Medicina*, Budapest, 213-221.
- Visvesvara, G.S., 1980. - The public health importance and diseases potential of small free-living amoebae. Invited Address, 2nd International Conference on the Biology and Pathogenicity of Small Free-Living Amoebae, March 23-25, Univ. of Florida, Gainesville, Florida

- Visvesvara, G.S. et al, 1983. - Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* 18:1405-1412.
- Volkonsky, M., 1931. - *Hartmannella castellanii* Douglas et classification des Hartmannelles. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 72, 317-329.
- Walker, E., 1908. - The parasitic amoebae of the intestinal tract of man and other animals. *J. Med. Res.*, 17, 379-459.
- Wang, S. and Feldman, H., 1967. - Isolation of *Hartmannella* species from human throats. *New. Eng. J. Med.* 277, 1174-1179.
- Warhurst, D.C. et al, 1970. - *Naegleria* sp. from cerebrospinal fluid. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Lond.*, 64, 19.
- Warhurst, D.C., Thomas, S.C., 1978. - An isoenzyme difference between a "smooth" /S/ and a "rough" /R/ strain of *Naegleria gruberi*. *Protistologica*, 14, 87-89.
- Wells, R., 1911. - Aerial contamination as a fallacy in the study of amebic infections. *Parasitology*, 4, 206.
- Whitemore, H., 1911. - Studien über Kulturamoeben aus Manila. *Arch. Protistenk.*, 23, 81-95.

Witschel, H. et al, 1984. - Amöben-keratitis. Ein klinisch histopathologischer Fallbericht. Klin. Mbl. Augenheilk., 185, 46-49.

