

––––––––––––––––––––––––––––––––––—–––––––––––––––––––––––––––––––––––––––

**BUDAPESTI MŰSZAKI EGYETEM**

**Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék**

**EGÉSZSÉGÜGYI MIKROBIOLÓGIA**

biomérnök szakos hallgatók számára

(egészségügyi szakirány)

**VII. FEJEZET**

**Járványtani mikrobiológia: diagnosztikai eljárások**

**Írta:**

**Sveiczer Ákos**

**Lektorálta:**

**dr. Novák Ervin**

1997

 A fertőző betegségek elleni megfelelő terápia megkezdéséhez szükséges a kóroki tényező ismerete, s ez a fejezet az e célt szolgáló diagnosztikai eljárások alapelveivel és megvalósításukkal foglalkozik. A panaszok és klinikai tünetek összessége (amit kórrajznak neveztünk, ld. korábban) általában csak a betegség megnevezéséhez elegendő (pl. tüdőgyulladás), de a kórokozó pontos azonosításához nem. Csak néhány betegség esetén fordul elő, hogy a típusos tünetek diagnosztikai értékűek, tehát a kórrajz tk. **klinikai diagnosztika** is egyben. Pl. az arcizmokon megjelenő, majd leszálló ágban terjedő merevgörcs a tetanusnak annyira típusos tünete, hogy a *Clostridium tetani* azonosítása szükségtelen, sőt a betegség gyors lezajlása és nagy letalitása miatt többnyire idő sincs rá.

 A betegségek zöme azonban klinikailag nem diagnosztizálható, hanem a beteg váladékából v. szövetéből mikrobiológiai módszerekkel kell a kórokozót azonosítani. A **mikrobiológiai diagnosztika** feladata a kórokozó faj- v. törzsszintű azonosítása, továbbá esetleg gyógyszer érzékenységének vizsgálata abból a célból, hogy a terápia minél gyorsabb és eredményesebb lehessen (ugyanakkor persze a terápia megkezdésével sokszor nem szabad a diagnosztika eredményét megvárni). A mikrobiológiai diagnosztika eljárásai lehetnek direktek v. indirektek: míg a **direkt** módszerek az ép mikroba kimutatására irányulnak, addig az **indirekt** módszerek a mikroba valamilyen jellegzetes szerkezeti anyagának, metabolitjának, toxinjának, antigénjének v. az utóbbi ellen termelt antitestnek az azonosítását jelentik.

**Direkt mikrobiológiai diagnosztika**

 A direkt (közvetlen) diagnosztikai eljárások két csoportját a **mikroszkópos** és a **tenyésztéses** vizsgálatok alkotják: az első esetben közvetlenül a betegből származó minta mikroszkópos megfigyelését végezzük el, míg a második esetben a mintában található mikrobákat *in vitro* ki is tenyésztjük. Általában elmondható, hogy a mikroszkópos vizsgálatok eredménye gyorsabb, a tenyésztéseseké pedig megbízhatóbb, ezért érdemes kombináltan alkalmazni őket: pl. a mikroszkópos diagnosztika alapján megkezdjük a terápiát, de közben a pontosabb azonosítás érdekében ki is tenyésztjük a kórokozót. Fontos szempont persze, hogy vannak olyan mikrobák is, amelyek táptalajon csak nehezen v. egyáltalán nem is szaporíthatók. Főleg az obligát intracelluláris parazitákra (pl. *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*, *Plasmodium malariae*, ill. az összes vírus) jellemző ez, s ezért e mikrobákat (legalább is közvetlenül) értelemszerűen csak mikroszkópos módszerekkel lehet kimutatni.

**Mikroszkópos vizsgálatok**

 A mikroszkópos vizsgálatok során a beteg váladékát v. szövetmetszetét tárgylemezen rögzítjük, s a legegyszerűbb esetben mikroszkópos megfigyeléssel próbáljuk a kórokozót kimutatni. Ez a módszer elsősorban az eukarióták (pl. a gombák közül a dimorfok és a dermatofitonok, a protozoonok közül pedig az *Entamoeba histolytica*, a *Trichomonas vaginalis* v. a *Pneumocystis carinii*) esetén alkalmazható sikerrel. Fénymikroszkóp helyett elektronmikroszkópban láthatók csak a vírusok, s így könnyen azonosíthatók pl. az Ebola-vírus, a HIV v. a ma már problémát nem jelentő variolavírus.

 A mikrobák láthatósága a mikroszkópban fokozható egyszerű **festési eljárások**kal (pl. metilénkék). A tokkal rendelkező mikrobák (pl. a *Streptococcus pneumoniae* virulens törzsei v. a *Cryptococcus neoformans*) esetén a tok kontraszt festéssel (tus) válik láthatóvá. Gyakran használt differenciáló festési eljárás a Gram-festés, amely elkülöníti a Gram-pozitív és
-negatív baktériumokat (pl. *Staphylococcus aureus* ill. *Neisseria gonorrhoeae*). A nehezen festhető *Mycobacterium*ok kimutatására a Ziehl-Neelsen-féle saválló festés alkalmazható; a *Corynebacterium diphtheriae* ún. Ernst-Babes szemcséinek festésére pedig a Neisser-eljárás. A *Treponema pallidum* is nehezen festődik, továbbá vékonysága és gyenge fénytörése miatt alig látszik a mikroszkópban; megfigyelésére sötétlátóteres eljárást lehet alkalmazni. Gombák és protozoonok esetén gyakran alkalmazott eljárás a diagnosztikában az ún. Giemsa-festés (pl. a *Histoplasma capsulatum* és a *Plasmodium malariae* színezésére alkalmas kék festék) v. a PAS-festés (tk. kémiai reakció gombák azonosítására, ld. később).

 A direkt mikroszkópos vizsgálatokat gyakran kombináljuk **immunológiai módszerek**kel azért, hogy a diagnózis precízebb és specifikusabb legyen. Ezekben az esetekben is az intakt mikrobát mutatjuk ki, de annak felszíni antigénjét speciális (ellene állatban termelt antitestet tartalmazó) immunsavóval reagáltatjuk. Az antitestekhez pedig valamilyen konjugátumot is kötünk, amelynek segítségével utána a mikroba láthatóvá tehető (ld. részletesebben alább az egyes eljárásoknál).

*I*mmun*f*luoreszcencia (IF)

 Ennél a módszernél az antitestet **fluoreszcens festék**kel (pl. FITC, fluoreszcein izotiocianát) konjugáljuk. Ha a betegből származó minta tartalmazta a kérdéses mikrobát, akkor az immunsavó hozzáadása után UV-fénnyel átvilágítva azt, a mikroba világítani fog (FITC esetén zöld színnel). Számos baktérium esetében (pl. *Chlamydia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Legionella pneumophila*) gyakran alkalmazott eljárás az IF.

*I*mmun-*e*lektron*m*ikroszkópia (IEM)

 Ha az immunsavóhoz **ferritin**t kötünk, akkor a mikroba felszínéhez kötődő konjugált antitest azt elektronszóróvá teszi, s ezért elektronmikroszkópban jól láthatóvá válik. Ezt az eljárást természetesen leginkább a vírusdiagnosztikában használjuk (pl. HAV, HCV, rotavírusok).

*I*mmun*t*us-*r*eakció (ITR)

 E roppant egyszerű eljárás (nincs szükség konjugátumra) során a specifikus immunsavó előtt egy csepp fekete **tus**t (koromszemcse szuszpenzió) kell a mintához adni, majd a felesleges tust híg sós vízzel lemosni. Az immunglobulinok nehéz láncának Fc régiójáról a tus nem mosódik le, s ezért a mikroba széle fekete marad. Pl. az *Escherichia coli* dyspepsia colit okozó (EPEC) törzsei megbízhatóan és gyorsan (a reakcióidő 5 perc!) azonosíthatók e módszerrel.

*E*nzyme *l*inked *i*mmuno *s*orbent *s*tain (ELISS)

 Ennél a módszernél a diagnosztikum olyan immunsavó, ahol az ellenanyaghoz egy **enzim**et konjugálunk, amely leggyakrabban torma peroxidáz v. “savas” foszfatáz. Ha a minta tartalmazza a kérdéses mikrobát, akkor a rögzült konjugátum (peroxidáz esetén) az alábbiak szerint hívható elő: H2O2-t és diamino-benzidint kell a rendszerhez adni, s a peroxidáz hatására egy sötét termék keletkezik, ami látható ill. fotométerrel is értékelhető. Az eljárás jelentősége, hogy a “gyenge” immunológiai reakciót az enzimes reakcióval sokszorosára erősíthetjük. A direkt ELISS eljárás “rokona” az indirekt ELISA módszer (ld. később).

**Tenyésztéses módszerek**

 E módszerek jelentősége, hogy a mikroszkópos megfigyelést, ha lehetséges, egy bár lassabb, de precízebb azonosítás követhesse. A mintában található mikroorganizmusokat valamilyen szilárd v. folyékony táptalajon, Petri-csészében v. kémcsőben próbáljuk meg elszaporítani (***in vitro* tenyésztés**).

 Olyan táptalaj nincs, amelyen minden mikroba telepet képezne, ezért előzetes információk is szükségesek általában, hogy a kitenyészteni kívánt kórokozó mi lehet (pl. a gombákat gyengén savas, a baktériumokat viszont általában semleges v. gyengén lúgos táptalajon tenyészthetjük ki). Jellemzően először egy **általános (széles spektrumú) táptalaj**on szaporítjuk a mikrobákat, amelyen a baktériumok ill. gombák zöme képes növekedni, majd pedig a kifejlődött telepeket továbboltjuk **szelektív (szűk spektrumú) táptalaj**ra. Utóbbi már preferál bizonyos mikrobákat, másokat pedig kizár (pl. olyan antibiotikumot tartalmaz, amely gátolja a Gram-pozitív baktériumokat, s ezért csak a Gram-negatívak szaporodhatnak rajta). A rokon mikrobák közötti elkülönítést segítik elő az ún. **differenciáló** táptalajok, segítségükkel pl. eldönthető, hogy egy szelektív táptalajon kitenyésztett enterobaktérium *E. coli*-e vagy sem.

 A kitenyésztett kórokozók telepeinek jellegzetes lehet a mérete, alakja, színe, szaga, sőt e jellemzők különböző táptalajokon eltérhetnek; ezen alapulnak az ún. **morfo-fiziológiai vizsgálatok** (az elnevezést az indokolja, hogy a tenyésztési körülmények változása először is a mikrobák élettani folyamatait változtatja meg, s ennek következményei a morfológiai jellemzőkben megfigyelhető eltérések). Pl. a *Staphylococcus aureus* szilárd táptalajon aerob körülmények között aranysárga telepeket képez (a pigment a táptalajba nem diffundál), míg anaerob viszonyok mellett nem képez pigmentet, ugyanakkor véres agaron pedig megfigyelhető a telepek körül a feltisztult udvar (-hemolízis). A -hemolitikus udvar véres agaron a *Streptococcus pyogenes* esetén is fontos diagnosztikai bélyeg, míg a *S. pneumoniae* és a *S. mutans (“S. viridans”)* telepei körül a zöld színű udvar számít annak (-hemolízis). A *Bacillus anthracis*t viszont azért tenyésztik véres agaron, mert nem hemolizál, szemben az apatogén szaprofiton *Bacillus*okkal. A *Neisseria gonorrhoeae* nehezen tenyészthető, s éppen ezért diagnosztikai jelentőségű, hogy csokoládéagaron (autoklávozott véres agar), 5-10% CO2-ot tartalmazó atmoszférában telepeket képez. A *Salmonella enteritidis* meghatározásában is fontos a szelektív dúsító, majd a differenciáló táptalajok használata, utóbbiakon a növekedés csak bizonyos elszíneződésekkel (biokémiai teszt is egyben!) együtt jelent pozitív eredményt. A kórokozó gombákat glükózt és peptont tartalmazó, enyhén savas általános táptalajon szokás tenyészteni, amely a baktériumok visszaszorítására klóramfenikolt, a gyorsan szaporodó penészek gátlása céljából pedig cikloheximidet v. Bengal Rose festéket tartalmazhat.

 Az eddig tárgyalt morfo-fiziológiai vizsgálatok közül néhány tk. egyben már biokémiai teszt is volt, mint pl. a hemolízis-próbák véres agaron. A **biokémiai tesztek**et széles körben használjuk pl. a kórokozó gombák v. az enterobaktériumok azonosításában. Ilyenek pl. a szénhidrát-asszimilációs és
-fermentációs eljárások, melyekben azt vizsgáljuk, hogy a kitenyésztett mikroba képes-e bizonyos szénhidrátokat egyedüli C- és E-forrásként hasznosítani, ill. anaerob körülmények mellett sav- és/vagy gázképződés megfigyelhető-e. Általában ún. **cukorsorok**at használunk, mint pl. a DGSMLR-sor (dextróz, galaktóz, szacharóz, maltóz, laktóz, raffinóz). Ebben az esetben mind a hat cukorral külön két-két (aerob/anaerob) kémcsőben elvégezzük a próbákat, s az eredményt adatbázisokkal összehasonlítva adhatjuk meg a diagnózist. Számos egyéb biokémiai teszt is létezik, mint pl. a nitrát-redukció (asszimilatív v. disszimilatív), a H2S-termelés, az ureáz-próba, a Voges-Proskauer-reakció (acetoin-termelés), stb.

 A kitenyésztett baktériumok esetén a **fágtipizálás** is fontos diagnosztikai módszer lehet, mindenek előtt a szalmonellák, a shigellák és az *Escherichia coli*, továbbá a *Staphylococcus aureus* törzsszintű azonosításában (ld. korábban). Ennél az eljárásnál a baktériumtelepeket az egyes fágokkal beoltjuk, s azt vizsgáljuk, hogy a telepek lizálnak-e, az eredményt itt is adatbázisokkal kell összevetni. A fágtipizálást általában szerotipizálás előzi meg, ld. indirekt módszerek.

 Mivel a vírusok táptalajon nem szaporíthatók, kitenyésztésük is csak sejttenyészetekben valósítható meg. Diagnosztikai jelentőséggel pl. az adeno-, herpesz- és orthomyxovírusok tenyésztése bír megfelelő permanens szövetkultúrákban, s ezekben az esetekben a citopatogén hatások következtében fellépő elváltozások is lehetnek specifikusak. Végezetül meg kell említeni, hogy az eddig tárgyalt *in vitro* eljárások mellett használatosak kisebb számban ***in vivo* tenyésztés**i módszerek is, főleg természetesen a vírusdiagnosztikában. Pl. a HSV-t és az influenzavírusokat csirkeembrióban, a flavivírusokat és a rubeolavírust egérben, az Ebola-vírust pedig tengerimalacban szokás kitenyészteni. Ritkán baktériumok és gombák azonosításában is használják az *in vivo* tenyésztési módszereket, s ezek az esetek egyúttal állatpatogenitási próbáknak is számítanak (pl. a *Bacillus anthracis*t tengerimalacba, a *Cryptococcus neoformans*t pedig fehér egérbe szokás oltani).

**Indirekt mikrobiológiai diagnosztika**

 Az indirekt eljárások során tehát nem az ép mikrobát mutatjuk ki, hanem annak csak egy részletét, ill. egyéb közvetett módon következtetünk a kórokozóra. Legfontosabbak közülük az ún. szerológiai próbák, de előbb röviden az egyéb lehetőségeket tárgyaljuk.

 **Kémiai** módszerekkel kimutatható pl. az élesztőgombák sejtfala (PAS-festés, periodic acid Schiff-base stain): a glükánok és mannánok perjódsavval oxidálhatók, a keletkező oxovegyületek színtelen leukofuchsinnal (a piros színű fuchsint előzetesen kénessavval színtelenítjük el) Schiff-bázist adnak, a reakció (ismét) piros színű terméke pedig diagnosztikai értékű. A gombák sejtfalkomponensei, továbbá bizonyos metabolitjai (pl. az arabinit) **kromatográfiás** (GC, LC) ill. **spektroszkópiai** (NMR) módszerekkel is azonosíthatók, akárcsak a *Clostridium perfringens* jellegzetes fermentációs termékei gázkromatográfiásan. Szintén a *C. perfringens*, továbbá a *C. botulinum* diagnosztikájában használatos a **toxin-neutralizációs próba** is: az alfa-toxint ill. botulinusztoxint ebben az esetben az ellene termeltetett specifikus antitoxinnal mutatjuk ki, ez tehát tk. egy szerológiai reakció, de a toxicitás elvesztését *in vivo* (pl. egéroltással) szokás eldönteni.

 A genom vagy egyes részeinek specifikus azonosítása általában **nukleinsav-hibridizációs** eljárásokkal történik: a diagnosztikum egy radioaktív izotóppal jelzett jellegzetes részlete a kérdéses mikroba genomjának, amely képes a minta feltárt és esetleg fragmentált genomjával hibridizálódni. Leggyakrabban vírusok (pl. adenovírusok, papillomavírusok, különböző hepatitis-vírusok) kimutatására használják, ill. baktériumok esetén a plazmidok azonosítására (pl. szalmonellák esetén). DNS és RNS (pl. Southern-blot ill. Northern-blot) egyaránt vizsgálható e hibridizációs módszerekkel. Mivel a mintában a kórokozó mennyisége nagyon kicsi is lehet, és a kimutatás sikere sokszor ilyenkor volna életmentő, a nukleinsavat ilyenkor amplifikálni kell. Erre szolgál az ún. **polimeráz lánc reakció** (**PCR** eljárás, polymerase chain reaction), amikor magas hőmérsékleten az egyszálúvá denaturált DNS-t hőstabil DNS-polimeráz alkalmazásával sokszorozzuk meg. RNS-vírusok esetén a genomot cDNS-re kell átírni reverz transzkriptáz segítségével, s utána azt már az előző módszerrel lehet amplifikálni (RT-PCR eljárás). A PCR alkalmazása a HIV, HAV és HBV diagnosztikájában egyaránt nagy jelentőséggel bír.

**Szerológiai módszerek**

 A **szerológiai módszerek** olyan indirekt diagnosztikai eljárások, amikor a **kórokozó antigénjé**t v. a **szervezetben ellene termelt antitest**et mutatjuk ki. Az immunológiai reakciók specifikussága miatt az eredmények megbízhatósága igen jó, de előfordulhatnak azért keresztreakciók is. Utóbbiakat néha a diagnosztika szolgálatába tudjuk állítani, mint pl. az antigénrokonság jelenségét a kiütéses tífusz v. a luesz diagnosztizálásában, ld. később. Bár elméletileg teljesen mindegy, hogy az antigént v. az antitestet mutatjuk-e ki, azért néhány megfontolást tenni kell ennél a pontnál. Először is, antitest csak immunkompetens egyénből mutatható ki, tehát immunszuppreszált (pl. AIDS-es) személy esetén csak az antigénre irányulhat az eljárás. Másodszor, az antitest kimutatása nem mindig kórjelző egyszerűen azért, mert az immunrendszer memóriája miatt egy ember szérumában számos ellenanyag kimutatható, melyek a korábban lezajlott fertőzések következményei (továbbá opportunista kórokozóknál eleve nem kórjelző sem az antigén, sem az antitest jelenléte önmagában). Ezért az antitesteknél roppant fontos a mennyiségi meghatározás, hiszen friss fertőzéskor sokkal több immunglobulint tartalmaz a vér, mint a rég lezajlott esetén, ill. két egymást néhány nappal követő mintavétel során az még nőhet is. Jelentősége lehet még az ellenanyagok osztálya meghatározásának is, pl. IgG/IgM vizsgálat terheseknél rubeolára (ld. korábban). Harmadszor, mivel a diagnosztikumnak tartalmaznia kell a kimutatni kívánt anyag reagáló partnerét (antigén esetén az antitestet, és viszont), ezért a diagnosztikumok előállításának problémái (ld. később) is befolyásolják, hogy mit is tudunk egyáltalán kimutatni.

 Az antitestek mennyiségi meghatározására szolgáló paraméter a **titer** (pl. AST-vizsgálat, anti-sztreptolizin titer, ld. korábban). Ha a szérumból egy adott ellenanyagot ki tudtunk mutatni, akkor utána egy kettes alapú hígítási sorozatot készítünk belőle, azaz felhígítjuk kétszeresére, négyszeresére, nyolcszorosára, stb., és megpróbáljuk kimutatni az antitestet a sorozat tagjaiból. A titer a még reagáló határhígítást jelenti; pl. a titer 32-es akkor, ha a 32-szeres hígításban még ki lehet mutatni az antitestet, de a 64-szeresben már nem. Ennek megfelelően ha valakinek a szérumából ki tudunk mutatni valamilyen immunglobulint, de csak hígítatlan állapotban (a titer 1), az biztosan nem friss fertőzést jelent, hanem csak egy korábban átvészeltet (normálérték), ezzel szemben ha pl. a titer értéke 64, az már friss fertőzésre utal.

 Az antigént v. az antitestet mindig a reagáló partnerével tudjuk csak kimutatni, tehát a **diagnosztikum**nak tartalmaznia kell az antitestet v. az antigént. Az **antitestek** a kérdéses kórokozóval mesterségesen immunizált állatokban (ló, kecske, juh, egér, patkány, nyúl, tengerimalac) termeltethetők, ill. elvéreztetésük után a szérumukból azok kinyerhetők v. maga a szérum használható (**immunsavó**). Probléma, hogy a szérum nemcsak a kérdéses ellenanyagokat tartalmazza, hanem megint csak az immunrendszer memóriája miatt az állat előélete során összeszedett fertőzések elleni ellenanyagokat is, s ezért az immunsavó keresztreakciókat adhat (álpozitív eredmények). A keresztreakciók veszélyét úgy lehet csökkenteni, ha az immunsavóból ún. **faktorsavó**t állítunk elő, azaz eltávolítjuk belőle ezeket a szükségtelen, sőt “káros” ellenanyagokat. Ehhez meg kell vizsgálni, hogy az immunsavó milyen antigénekkel ad keresztreakciót, majd éppen e keresztreagensekkel lehet “kimeríteni” az immunsavót: addig kell őket adagolni, míg a keresztreakciók meg nem szűnnek. Még jobb lehetőség, ha a szérumból genetikai módszerekkel elkülönítjük azokat a plazmasejteket, amelyek egy adott immunglobulint termelnek. Ezeket elszaporítva jutunk az ún. **monoklón ellenanyag**okhoz. Az **antigének** termelése pedig a kérdéses mikrobák szaporításából áll, ill. sok esetben kinyerik belőlük a diagnosztizálásra használt részleteket vagy azokat külön termelik (pl. rekombináns HBsAg gyártása élesztőben).

 Azt már tudjuk, hogy a baktériumok és a vírusok között egyaránt vannak stabil és változó antigénszerkezetű mikrobák. Alapvetően az egyes szerológiai reakciókat a kérdéses mikrobafajok stabil szerkezetű antigénjére lehet és érdemes kidolgozni. Ugyanakkor bizonyos kórokozók esetén a változatos törzsek, az ún. **szerotípusok** éppen immunológiai sajátságaik alapján különíthetők el egymástól, aminek pl. a szalmonellák esetén nagy a járványtani jelentősége (**szerotipizálás**). A már szintén tárgyalt **antigénrokonság** jelensége is felhasználható a diagnosztikában, pl. a *Proteus* OX19 antigénje reagál a *Rickettsia prowazekii* ellen termelődött antitesttel, s ezáltal a kiütéses tífusz diagnosztizálható úgy is, hogy a *Proteus* antigént használjuk reagensként (Weil-Felix reakció). A luesz kardiolipines diagnosztizálása (komplement kötési reakció) is többek között az antigénrokonságon alapul, ld. később.

 Szintén ismeretes már, hogy az antitestek az oldott antigéneket kicsapják (**precipitáció**), míg a sejtes antigének csomósan összetapadva kiválnak a szuszpenzióból (**agglutináció**), továbbá a reakció akkor a legerősebb, ha a partnerek aránya ekvimoláris. A legegyszerűbb szerológiai módszer az ún. **csőagglutináció**, amikor kémcsőben reagáltatjuk a páciensből származó mintát pl. mikózis gyanú esetén különböző gomba antigének elleni antitestet tartalmazó diagnosztikumokkal, s pozitív reakció esetén a gombasejtek kiválnak. Az eljárás megvalósítható oldott antigénekkel és Petri-csészében is, ugyanúgy mint pl. a vércsoport-meghatározások esetében. A korábban ismertetett nukleinsav-hibridizációs technikák analógjaként az antitestek kimutathatók izotóposan jelzett antigének segítségével (pl. **Western-blot**, v.ö. Southern- és Northern-blot), ezt a módszert pl. a HIV gyorsdiagnosztikájában használjuk. A továbbiakban részletesen ismertetjük a többi szerológiai eljárást, méghozzá többnyire az antitest kimutatását feltételezve, de ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy ellentétes módon ezek alkalmasak az antigén kimutatására is.

*I*mmun*d*iffúzió (ID)

 A fehérje v. esetleg szénhidrát természetű antigének és az immunglobulinok agargélben jól diffundálnak, ez az alapja az **immundiffúziós eljárások**nak. Ha egy kémcső aljára agarréteget helyezünk, amely tartalmazza az antigént (diagnosztikum), majd erre rárétegezzük a páciens antitest-tartalmú szérumát, szintén agarral megszilárdítva, akkor először a határzónán opálosodást figyelhetünk meg. Ezek után a mennyiségi viszonyok tükrében eme opálos zóna el fog mozdulni a határrétegtől: ha pl. az antigén volt túlsúlyban, akkor felfelé, és viszont. **Ekvivalencia-pont**nak nevezzük azt a helyet, ahol az opálos zóna végül megáll, s ez ott következik be, ahol a reagensek ekvimolárisak. Az ekvivalencia pont bizonyos mérvű kvantitativitást is ad tehát ennek a tesztnek. Az immundiffúzió egyaránt sikeresen alkalmazható pl. HBV, VZV és papillomavírusok kimutatására, az enterobaktériumok szerotipizálására v. a *Cryptococcus neoformans* tokanyagának liquorból történő azonosítására.

 Az eljárást sokszor Petri-csészében valósítjuk meg (**radiális immundiffúzió**) az alábbiak szerint. A lemezöntést követően az agarrétegbe lyukakat fúrunk, egyet középre, s hatot-nyolcat a szélére. A középső lyukba beletöltjük az antigént (diagnosztikum), a szélsőkbe pedig az egyes páciensek szérumait. A rádiuszra merőlegesen precipitációs csík keletkezik a diagnosztikum és azon minták között, amelyek tartalmazták a keresett antitestet, a többi pedig negatív. A pozitív esetekben a precipitációs csík (ekvivalencia-pont) elhelyezkedéséből lehet valamelyest mennyiségi következtetést is levonni.

*I*mmun-*e*lektroforézis (IE)

 Mivel a fehérjék töltéssel rendelkező molekulák, az előzőekben tárgyalt egyszerű diffúziójuk meggyorsítható, ha az agarréteg két végére elektromos áramot kapcsolunk. Az egyszerű **immun-elektroforézis**t (**IE**) leginkább a diagnosztikumok és oltóanyagok tisztaságának ellenőrzésére használjuk (az immunsavót megfuttatva az egyes sávok a megfelelő antigénekkel előhívhatók, s a keresztreakciók felderíthetők). Ha az antigén és az antitest töltésviszonya (eredendően v. mesterségesen létrehozva) olyan, hogy megfelelő polaritású áram esetén gyorsabban haladnak egymás irányába, mint egyszerű diffúzióval, akkor egy, a diagnosztikában gyakran használt eljárást alkalmazunk, melynek neve **counter immun-elektroforézis (CIE)**. Az ún. **rocket immun-elektroforézis (RIE)** során pedig egy antigénnel átitatott agarrétegbe futtatjuk bele az ellenanyagot tartalmazó mintákat: a keletkező opálos csúcs magassága (pontosabban a csúcs alatti terület) arányos a minta ellenanyag-tartalmával. A RIE is inkább a diagnosztikumok és oltóanyagok tisztasági vizsgálatának módszere, mint a kórokozók azonosításáé.

 Az IE módszerek mindazon esetekben alkalmazhatók, ahol az ID már bevált, s az ily módon gyorsíthatónak bizonyul. Használjuk opportunista kórokozó gombák (pl. *Candida* és *Aspergillus* fajok) azonosítására is, itt azonban a kiértékelés számos problémát jelent: önmagában sem a pozitív, sem a negatív eredményből sokszor nem lehet egyértelmű következtetésre jutni (ezek a gombák a természetben nagyon elterjedtek, és csak erősen legyengült szervezeteket támadnak meg).

*R*adio *i*mmuno *a*ssay (RIA)

 A **RIA** eljárás során a használt diagnosztikum egy hordozón (pl. kémcső fala v. polisztirol lap) rögzített antigén. Ha a páciens széruma tartalmazza az adott antigén elleni antitestet, az megkötődik a rögzített antigénen, azonban a reakció még nem látható. A harmadik reagens, amit a rendszerhez adunk, radioaktív izotóppal jelölt anti-humán globulin (amit úgy lehet előállítani, hogy pl. kecskét immunizálunk tetszőleges humán IgG-vel, s a kecske ellenanyagot termel a számára idegen humán fehérjével szemben). Ha az előző lépésben volt antitest kötődés (de csak akkor!), akkor most a kecske eredetű anti-humán globulin harmadik partnerként megkötődik a komplexen (**szendvics szerkezet**), majd mosás után a radioaktivitás mérésével lehet a szérum ellenanyag-tartalmát meghatározni. A RIA eljárást széles körben alkalmazzák pl. a különböző hepatitis-vírusok v. a *Clostridium botulinum* törzseinek ill. azok toxinjainak azonosítására.

*E*nzyme *l*inked *i*mmuno *s*orbent *a*ssay (ELISA)

 Az **ELISA** eljárás diagnosztikuma és első lépése azonos a RIA módszerével. A második lépés annyiban eltér, hogy az alkalmazott anti-humán globulin nem izotóposan jelölt, hanem az ELISS módszernél említett módon enzimet (többnyire szintén torma peroxidázt v. savas foszfatázt) konjugáltatunk vele. Itt is háromrétegű szendvics keletkezik, amelyet az ismert módon (H2O2 + diamino-benzidin, majd fotométer) lehet értékelni. Alkalmazása a gyors-diagnosztikában roppant széleskörű: gyakran használjuk pl. a *Chlamydia trachomatis*, a HBV, a HIV, a variolavírus, a rotavírusok, a rubeolavírus, valamint számos mikózis kórokozójának azonosításában.

 A RIA és ELISA módszerek során kidolgozott szendvics technikát alkalmazzuk máshol is, gazdaságossági megfontolásokból. Pl. a direkt mikroszkópos eljárások között tárgyaltuk az immunfluoreszcenciát. Az IF módszert is gyakran szendvicsszerűen végezzük el az alábbiak szerint: nem az első reagenst, a pl. nyúlban termeltetett ellenanyagot konjugáljuk fluoreszcens festékkel, hanem a második reagenst, ami lehet pl. kecskéből származó anti-nyúl globulin. Ennek az adja az értelmét, hogy nem kell a különbözőféle ellenanyagokat FITC-vel konjugálni és úgy tárolni, hanem csak önmagukban kell eltartani őket, s egyedül az anti-nyúl globulint kell festékkel konjugálni (ha az összes használt ellenanyag nyúlból származik).

*H*em*a*gglutináció (HA) és *l*atex-*a*gglutináció (LA)

 A **hemagglutináció**s eljárás során valamilyen állati eredetű (pl. birka) vörösvértestek felszínét megfelelő specifikus ellenanyagokkal érzékenyítjük, ez a diagnosztikum. Ha a minta tartalmazza az antigént (oldott v. sejtes formában), akkor annak hatására ezek a vörösvértestek szemmel láthatóan kicsapódnak (hasonlóan, mint a vércsoport-meghatározásnál is). A **latex-agglutináció** ezzel teljesen analóg, de ott vörösvértestek helyett pici latex-golyócskákat (tk. nyers gumi emulziója) használunk, azokat hasonlóképpen érzékenyítve, amelyek éppúgy kicsapódnak az antigén hatására, mint a vörösvértestek. Mindkét eljárás használható az antitest kimutatására is, ekkor természetesen az antigénnel kell érzékenyíteni a vörösvértesteket v. a latexet. A HA módszert főleg vírusok (pl. adenovírusok, flavivírusok, influenzavírusok, mumpsvírus, rubeolavírus), a LA eljárást pedig inkább gombák (pl. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*) azonosítására használjuk.

*K*omplement *k*ötési *r*eakció (KKR)

 A **komplement kötési reakció** lényege, hogy ha valamilyen antigénnel (diagnosztikum) a megfelelő antitestet a szérumban komplexbe visszük, akkor mivel a komplement faktorai (szérumfehérjék!) is jelen vannak a rendszerben, azok sorban megkötődnek az antigén-antitest komplexen, s a komplement aktíválódik. Pontosabban a vizsgálat precizitása megköveteli, hogy a vizsgálandó szérum komplementjét 60oC-os hőkezeléssel inaktíváljuk, majd titrált mennyiségű tisztított komplementet (pl. lószérumból eredőt) adagoljunk hozzá. Mivel azonban nincs lizálásra képes sejt jelen, ezért ennek semmilyen látható jele nincs, de a komplement lekötődik, “elfogy”. Következő “reagensként” birka vörösvértesteket adunk a rendszerhez és hemolizint (utóbbi ebben az esetben nem más, mint birka vörösvértesttel immunizált lóban termeltetett anti-birka antitest), de mivel a komplement az előbb elfogyott, ezért nincs hemolízis. Ugyanakkor ha a minta nem tartalmazta a keresett antitesteket, akkor a komplement nem fogy el az első lépésnél, hanem helyette a birka vörösvértestek felszínén kezd aktíválódni, s hemolizálja azokat. Azaz a látható hemolízis jelenti a vizsgálat negatív eredményét, míg a hemolízis hiánya igazolja, hogy a minta tartalmazta a kérdéses ellenanyagokat (pozitív).

 A KKR eljárást ma a legszélesebb körben a vírusdiagnosztikában alkalmazzuk (pl. adenovírusok, HSV, VZV, flavivírusok, influenzavírusok, poliovírusok, Ebola-vírus, rabiesvírus, rubeolavírus), továbbá a szisztémás mikózisok kórokozóinak (főleg *Coccidioides immitis* és egyéb dimorf gombák) azonosításában. Mind a mai napig használjuk a klasszikus luesz szerológiában is (Wassermann-reakció) ezt a módszert. Ennél az eljárásnál felhasználjuk, hogy a *Treponema pallidum* ellen termelődő humán immunglobulin, az ún. reagin keresztreakciót ad az alkoholos marhaszív-kivonat kardiolipin nevű komponensével (antigénrokonság). Ez a tény a diagnosztikát nagyon megkönnyíti, mivel a gyakorlatilag tenyészthetetlen spirochaeták helyett a diagnosztikum kardiolipint tartalmazhat; a dolog másik oldala viszont, hogy sok az álpozitív eredmény, utóbbiakat egy indirekt immunfluoreszcenciás eljárással lehet kiszűrni, ahol a reagens elölt *T. pallidum*.

Bőrpróbák

 Ezek az eljárások tk. nem szerológiai módszerek, de immunológiai reakció szolgál alapul hozzájuk. Bizonyos mikrobák esetén a (manifeszt v. tünetmentes) fertőzés eredményeképp az ember életre szóló hiperszenzitivitásra tesz szert. Ily módon a mikrobának v. inkább tisztított antigénjének perkután oltása a bőr gyulladását eredményezi, ha az illető személy élete során már fertőződött a kérdéses mikrobával. A **bőrpróbák** legjellegzetesebb példája az ún. **tuberkulin-teszt**, amikor is egy bizonyos *Mycobacterium tuberculosis*ból származó tisztított fehérjekivonattal elvégzett oltás segítségével el lehet dönteni, hogy az illető személy védett-e TBC ellen (a BCG-vakcina nem mindenkinél ad életre szóló immunitást). Ezért a tuberkulin-negatív személyeket újra oltani kell BCG-vel, csak arra kell vigyázni, hogy a tuberkulin-negativitás immunszuppresszió következménye is lehet.

 A bőrpróbákat hasonló céllal, de kevésbé elterjedten alkalmazzák a dimorf gombás betegségek és a candidosisokdiagnosztikájában is. Utóbbi esetben azonban a teszt megbízhatósága erősen kétes. Egyrészt a populáció egészséges tagjainak zöme e tesztre pozitív, mert az emberek életük során többször is immunizálódhatnak a *Candida albicans*szal való találkozás eredményeként. Másrészt pedig a negatív bőrteszt gyakran nem fertőzetlenségre, hanem immunszuppresszióra utal.