

Elmar RÕIGAS

## VÕIMALUSTEST *TRICHOMONAS VAGINALIS*'E LIIGISESTE ANTIGEENSETE OMADUSTE DIFERENTSEERIMISEKS IMMUNOFLUORESTSENTSMEETODIL

Mikroorganismide, sealhulgas ka algloomade liigisest antigeensete erinevuste määramisel tuginetakse tavaliselt Castellani absorptsiooni-aglutinatsiooni testile. Kahjuks on see klassikaline ja väga vajalik meetod siiski üsna töömahukas ja aeganõudev. Vastavad uurimised võiksid toimuda kahtlemata märksa operatiivsemalt, kui serotüüpe saaks vähemalt orienteeruvaltki määrata näiteks ägepreparaatides. Sellesuunaliste võimaluste otsingul on peetud silmas eelkõige immunofluorestsentsmeetodit (Coons, Kaplan, 1950).

Immunofluorestsentsmeetodi mitmesugustest variantidest hinnatakse otsest meetodit antigeensete omaduste määramisel võrdlemisi tundlikuks ja spetsiifiliseks (Cherry, Moody, 1965; Niel, Fribourg-Blanc, 1965), kuid selle ulatuslikumat rakendamist piirab ilmselt vajadus valmistada ja määrgistada iga uuritava mikroobiliigi või selle variandi *resp.* serotüübi jaoks eraldi spetsiifiline antiseerum. Kaudset meetodit kasutatakse märksa sagedamini, eriti raviastutuste laboratooriumides, ja seda eelkõige põhjustel, et ühe liigispetsiifilise konjugaadiga on võimalik uurida mitmeid mikroobiliike *resp.* antiseerumeid, pealegi saab vajalikke fluorestseeruvaid konjugaate toota tsentraliseeritult. Selle meetodi ühe eelisena otsega võrreldes märgitakse muu hulgas ka fluorestsentsi suuremat intensiivsust (Jentzsch, 1967). Immunofluorestsentsmeetodi inhibeerimis- ehk blokeerimisvariant on suhteliselt vähe kasutatav, sest mõningaid sel puhul saadavaid tulemusi ei osata veel ammendavalt interpreteerida. Näiteks Chadwik ning Slade (1960), rakendades *Pasteurella pestis*'e uurimisel blokeerimiseks homoloogilist antiseerumit ja värviva komponendina homoloogilist konjugaati, täheldasid vastu ootusi ka sel juhul fluorestsentsi. Absorbeerimismeetod, kus konjugaatide spetsiifilisuse tõstmiseks rakendatakse absorbeerimist heteroloogiliste mikroorganismidega, ei ole ennast samuti täiel määral õigustanud. Põhjuseks on fluorestsentsi intensiivsuse tugev langus pärast absorbeerimist, mistõttu on esinenud raskusi isegi liikide eristamisel (Goldman, Gleason, 1962).

Häirivaks faktoriks immunofluorestsentsmeetodi kõikide variantide puhul on aga peaaegu alati autofluorestsents (Звягинцев jt., 1967), mis muutub eriti segavaks konjugaatide madala spetsiifilise värvimisvõime puhul (Goldman, Gleason, 1962). Antigeensete omaduste uurimist sageli tõsiselt takistava spontaanse helenduse kõrvaldamiseks on soovitatud järelevärvimist mitmesuguste kontrastvärvidega (Fry, Wilkinson, 1964; Duxbury, Sadun, 1964; Goldman, 1966, jt.), muu hulgas lissamiinrodamiiniga (Kramář, Kučera, 1966) ja Evansi sinisega (Петров, 1969).

Vaatamata immunofluorestsentsmeetodi võrdlemisi laialdasele kasutatavusele on *Trichomonas vaginalis*'e antigeensete omaduste uurimisi selle meetodi abil teostatud siiski vaid üksikutel juhtudel. Seejuures neiski tööd kas lihtsalt kirjeldatakse *T. vaginalis*'e poolt indutseeritud antikehade demonstreerimise võimalust (Kramář, Kučera, 1966) või määratakse sama meetodi abil antikehade tiitrid (Петров, 1969). Ainult ühel juhul (McEntegart jt., 1958) on kirjeldatud *T. vaginalis*'e liigisestest variantide diferentseerimist fluorestseerivate konjugaatide abil, kuid seejuures ei kasutatud autofluorestsentsi kupeerimiseks kontrastvärvi, mistõttu eristamine tugines ainult sellele, kas täheldatud roheline helendumine oli särav või tuhm. Samuti vajab rõhutamist, et eelnimetatud katses piirduti kahe serotüübi diferentseerimisega, kuid *T. vaginalis*'el on identifitseeritud liigisestest antigeensid variante siiski arvukamalt (Kott, Adler, 1961; Tepac, 1959; Teras, 1963). Mitme variandi diferentseerimine, nagu on näidanud kogemused teiste mikroorganismidega, ei ole aga mõeldav ilma kontrastvärvideta (Fry, Wilkinson, 1964; Jentzsch, 1967, jt.).

Eeltoodust nähtub, et seni ei ole veel ammandatud kõiki võimalusi *T. vaginalis*'e liigisestest antigeensete variantide uurimiseks immunofluorestsentsmeetodi abil. Kahtlemata oleks aga see suhteliselt vähest ajakulu nõudev meetod väga väärtuslikuks täienduseks mitte ainult immunobioloogiliste reageeringute uurimisel üldse, vaid ka rakenduslikust aspektist lähtudes, eelkõige urogenitaaltrakti trihhomonoosi serodiagnostikas ja ravijärgse seroloogilise kontrolli teostamisel.

Eesmärgiga uurida täiendavalt *T. vaginalis*'e antigeenseid omadusi, kasutades seejuures ägepreparaate ning immunofluorestsentsmeetodit, pidasime vajalikuks: 1) selgitada, milline on *T. vaginalis*'e autofluorestsents ja leida sobiv kontrastvärv selle spontaanse helenduse kupeerimiseks, 2) hinnata immunofluorestsentsmeetodi mitmesuguste variantide sobivust *T. vaginalis*'e liigisestest antigeensete erinevuste sedastamisel.

### Uurimismaterjal ja meetodika

**Uurimismaterjal.** Käesolevas töös kasutasime ENSV TA Zooloogia ja Botaanika Instituudi protozoologia sektoris Castellani absorptsiooni-aglutinatsioonimeetodi abil identifitseeritud (Tepac, 1959; Teras, 1963) ja pidevatel passeerimistel TV-1 söötmes (Tepac, 1961a) säilitatud *T. vaginalis*'e nelja serotüüpi — TLR, TRT, TN ja TR. Kõikidest serotüüpidest olid spetsiaalse seadeldise ja meetodi abil isoleeritud kloonid (Rõigas, 1969). Samuti rakendasime eespool nimetatud neljale serotüübile vastavaid spetsiifilisi antiseerumeid ja viimastest valmistatud fluorestseeruvaid konjugaate.

**Antiseerumite saamine, fluorokroomiga märgistamine ja säilitamine.** Tüübispetsiifiliste antiseerumite saamiseks immuniseerime iga serotüübiga 8 küülikut, kasutades selleks TV-4 söötmes (Tepac, 1961b) 24...48 tundi 37 °C juures inkubeeritud *T. vaginalis*'e akseenilisi, isotoonilises NaCl-lahuses kolm korda pestud kultuure. Küülikuid immuniseerime kolm korda 10-päevaste vaheaegadega, süstides nende kõrvaveeni iga kord 1 ml algloomade suspensiooni isotoonilises NaCl-lahuses: esimesel immuniseerimisel 20, teisel 40 ja kolmandal 80 miljonit alglooma. Kümme päeva pärast viimast immuniseerimist avasime uretaaniga narkotiseeritud küülikutel rindkere ja aspireerime punktsooni teel vere südame vasakust vatsakesest ning eraldasime seerumi. Sama serotüüpi isenditega immuniseeritud 8 küüliku seerumid valasime kokku. Väike kogus sel teel saadud igast tüübispetsiifilisest antiseerumist jäi fluorokroomiga konjugeerimata, suurem osa aga märgistati Moskvas NSVL MTA Gamaleja nim. Mikrobioloogia ja Epidemioloogia Instituudis fluorestseinisotiotsüanaadiga, mis annab ultraviolettkiirguses fluorestseerumisel kollakasroheline särava helenduse. Niihästi märgistatud kui ka märgistamata antiseerumid jaotati ampullidesse à 1,0 ml ja lüofiliseeriti.

**Ettevalmistused immunofluorestsentsmeetodi rakendamiseks.** Nagu nähtus kirjanduse andmetest (Левина, Неймарк, 1960; Михайлов, 1961; deLavernge jt., 1966; Wilkinson, Rayner, 1966; Jentzsch, 1967) ja selgus ka meie eelkatsetest, sõltuvad uuringute tulemused väga suurel määral preparaatide ja lahuste ettevalmistamisest. Seepärast teostasime kõik ettevalmistused alati ühtsete, meie kogemuste põhjal sobivaiks osutunud skeemide järgi.

*T. vaginalis*'e TV-4 söötmes 24 tundi kultiveeritud ja kolm korda isotoonilises NaCl-lahuses pestud kloonist valmistasime suspensiooni tihedusega 3 000 000 isendit 1 ml-s ja viisime sellest ühe tilga rasvatustatud esemeklaasile. Saadud preparaadi fikseerisime pärast õhus kuivatamist atsetooniga, loputasime algul kraaniveega, siis destilleeritud veega ja seejärel kuivatasiime termostaadis 37° juures. Preparaadi värvisime kas kohe või säilitasime kuni värvimiseni 4° juures, kuid mitte üle kolme nädala.

Lüofiliseeritud konjugaadi ja samuti märgistamata antiseerumi algse kontsentratsiooni taastamiseks lisasiime lüofiliseeritud materjalile 1,0 ml destilleeritud vett. Saadud lahustest valmistasime töölahjendused (1:10 ja 1:20) iga kord *ex tempore* isotoonilise NaCl-lahuse abil. Juhul, kui lahustatud konjugaadist jäi osa kasutamata, säilitasime seda 4° juures maksimaalselt kuus päeva.

Pulbrilisest Evansi sinisest valmistasime destilleeritud vee abil põhilahjenduse 1:100, mida säilitasime valguse eest varjatult toatemperatuuril juures. Põhilahjendusest valmistasime mitte harvem kui kord nädalas töölahjenduse 1:5000, mida säilitasime nagu põhilahjendustki.

**Immunofluorestsentsmeetodi erinevate variantide tehniline teostus.** Kirjanduse andmete (Goldman, 1953, 1966; Михайлов, 1961; Мацелюх, 1966; Jentzsch, 1967) ja arvukate eelkatsete põhjal töötasime välja allpool toodud metoodilised skeemid *T. vaginalis*'e antigeensete omaduste uurimiseks ja järgisime neid rangelt.

**Otsene meetod.** Värvisime preparaati fluorestseeruva konjugaadiga niiskes kambris 37° juures 30 min., seejärel loputasime algul kraaniveega, siis fosfaatpuhvriga (pH 7,4) ja lõpuks destilleeritud veega. Pärast kuivatamist termostaadis 37° juures värvisime preparaati Evansi sinise vesilahusega (1:5000) 30 min. toatemperatuuril, loputasime jälle kraaniveega, fosfaatpuhvriga ja destilleeritud veega ning kuivatasiime termostaadis.

**Absorbeerimismeetod.** Tehniliselt teostuselt erines see meetod eelmisest vaid selle poolest, et värvimine toimus tüübispetsiifilise fluorestseeruva konjugaadiga, millest olid absorbeeritud heteroloogilisele serotüübile vastavad antikehad.

**Kaudne meetod.** Algul mõjustasime preparaati tüübispetsiifilise antiseerumiga (lahjenduses 1:10 või 1:20) 30...60 min. 37° juures niiskes kambris ja loputasime seejärel kraaniveega, fosfaatpuhvriga ja destilleeritud veega. Pärast preparaadi kuivatamist värvisime seda niiskes kambris 37° juures 30 min. küüliku  $\gamma$ -globuliini suhtes immuniseeritud eesli antiseerumiga, mis oli konjugeeritud fluoresteiinisotiotsüanaadiga. Nimeetatud konjugaat oli lahjendatud vastavalt töötiirile. Järgnevalt töötlesime preparaati täpselt samuti nagu otsesel meetodil esimese protseduuri järel, s. o. pärast värvimist tüübispetsiifilise fluorestseeruva konjugaadiga.

**Blockeerimismeetod.** Toimisine preparaadile heteroloogilise (*resp.* homoloogilise) tüübispetsiifilise antiseerumiga (lahjenduses 1:10) niiskes kambris 37° juures 30...60 min., seejärel loputasime kraaniveega, fosfaatpuhvriga ja destilleeritud veega, pärast seda kuivatasiime. Järgnev töötlus oli sama, mida rakendasime otsesel meetodil pärast tüübispetsiifilise fluorestseeruva konjugaadiga toimimist.

**Indutseeritud spetsiifilise fluorestsentsi hindamine.** Kõikide meetodite järgi töödeldud preparaate uurisime luminesentsmikroskoobi МЛ-2 abil, kasutades õliimmersiooni mitte-luminesentseeruva õliga, objektiivi МИ90X, okulaari 4X, filtreid ФС I-4 ja БС 8-2.

Fluoresteeruva konjugaadi toimel indutseeritud helenduse hindamiseks ja omavaheliseks võrdlemiseks võtsime aluseks kirjanduses leiduvad soovitused (Левина, Неймарк, 1960; Collins jt., 1966; Zweibaum jt., 1966) ja töötasime nende põhjal välja hinnangute skaala ulatusega 0 kuni + + + +, lähtudes seejuures allpool esitatud kriteeriumidest.

Hinnang 0: kogu rakk helendub ainult kontrastvärvile (Evansi sinisele) iseloomulikus intensiivselt punases toonis; hinnang +: katkematu, kuid kitsas kollakasrohelist helenduv ääris, raku keskosa punane; hinnang ++: kollakasroheline ääris pisut laiem ja helendavam kui eelmisel juhul, raku punases keskosas üksikuid väikseid kollakasrohelist helenduvaid täpikesi; hinnang +++: kollakasroheline ääris märksa laiem kui eelmistel juhtudel, raku keskosas rohkem ja suuremaid kollakasrohelist helenduvaid täpikesi; hinnang ++++: lai kollakasroheline ääris, keskosas samavärvilised täpid ja laigukesed, mis annavad kontrastvärvile telliskivipunase varjundi.

## Tulemused

### *T. vaginalis*'e autofluorestsents ja selle kupeerimine

Kõikidel meie poolt uuritud *T. vaginalis*'e serotüüpide isenditel täheldasime värvimata äigepreparaatide vaatlemisel luminesentsmikroskoobis spontaanset ehk autofluorestsentsi. See väljendus kogu alglooma keha võrdlemisi intensiivselt, kuid mitte kiirgavas, vaid tuhmis rohelises helenduses.

Visuaalsel hindamisel ei olnud võimalik nentida diferentse üksikute serotüüpide autofluorestsentsis, kuid ühe serotüübi piires ei olnud isendite spontaanse helendus alati konstantne. Näiteks oli 24-tunnisest kultuurist valmistatud äigepreparaadis rõhuv enamik trihhomoonastest tugeva spontaanse fluorestsentsiga, kuid 5-päevases, väheste elavate algloomadega kultuurist saadud preparaadis täheldasime peamiselt nõrka ja väga tuhmi helendust.

Väärrib märkimist, et nõrgalt helenduvates trihhomoonastes leidis sageli ümmargusi või kergelt ovaalseid varieeruva suurusega alasid, mis helendusid väga vähe või üldse mitte. Võrdlus paralleelselt valmistatud äigepreparaatidega kinnitas, et sellised moodustised vastavad vakuolidele, mida täheldatakse vanades ja degenereerunud rakkudes. Eespool toodud leide arvestades võib järeldada, et *T. vaginalis*'e isendite autofluorestsents sõltub nende vanusest, kuid mitte serotüübist. Kõige tugevam spontaanse fluorestsents esineb noortel rakkudel.

Ühtlasi selgus, et fluorestseiniisotiotsüanaadi abil indutseeritud spetsiifilise ja spontaanse fluorestsentsi paiknemine üksteisele väga lähedastes spektripiirkondades tingib kontrastvärvide obligatoorse kasutamise vajaduse *T. vaginalis*'e serotüüpide identifitseerimisel immunofluorestsentsmeetodi abil. Seejuures veendusime, et Evansi sinise (lahjenduses 1:5000) intensiivselt punane helendus on fluorestseiniisotiotsüanaadi kollakasroheline fluorestsentsi suhtes kontrastsem kui lissamiinrodamiini telliskivipunane helendus.

### *T. vaginalis*'e serotüüpide diferentseerimisest

Kaudset meetodit püüdsime rakendada esmajärjekorras, pidades silmas nimetatud meetodi eeliseid, mis annavad võimaluse kasutada kõikides uuringutes ainult üht standardset konjugaati, pealegi toodetakse seda tsentraliseeritult. Rakendades sellise konjugaadina küüliku  $\gamma$ -globuliiniga immuniseeritud eesli antiseerumit, mis oli märgistatud fluorestseiniisotiotsüanaadiga, saime kaudse meetodi abil fluorestsentsi, mis väljendus iga isendit ümbritseva võrdlemisi tugeva ja särava kollakasroheline äärisena. Kahjaks ei sõltunud aga nimetatud helendumise intensiivsus serotüüpidest ja oli kõikidel juhtudel praktiliselt ühesugune, vastates hinnangule ++. Ebaedu tõttu põhilise, üldtuntud printsiipe järgiva skeemi kasutamise kõrval (vt. «Uurimismaterjal ja meetodika») katsetasime

kaudse meetodi rakendamisel ka selle mitmeid modifikatsioone. Nii varieerisime fikseerimistehnikat, kasutasime erinevaid seerumilahjendusi, töötlesime preparaate seerumite ja konjugaatidega erineva temperatuuri ja pH juures ning erineva aja jooksul, mõjustasime preparaate korduvalt jne. Kahjuks ei olnud kõigele vaatamata liigisisest antigeenset erinevused küllaldasel määral sedastatavad, mistõttu kaudse meetodi abil ei osutunud võimalikuks diferentseerida *T. vaginalis*'e serotüüpe.

Absorbeerimismeetodit katsetasime järgmisena, kuna käesolevas töös uuritavad serotüübid olid algselt identifitseeritud Castellani absorptsiooni-aglutinatsiooni testi põhjal, mistõttu võtsimegi aluseks analoogia ja uurisime ka immunofluorestsentsmeetodi rakendatavust fluorestseerivate konjugaatide abil pärast ristuvaid absorbeerimisi. Tuginedes Castellani testist tulenevatele andmetele, kasutasime seejuures teineteisest suhteliselt tugevasti erinevaid serotüüpe TLR ja TRT ning neile vastavaid fluorestseeruvaid konjugaate.

Jälgisime, milliseid tulemusi annab ühe serotüübi värvimine homoloogilise konjugaadiga juhul, kui viimasest on absorbeeritud teisele serotüübile vastavad antikehad. Ilmnes, et trihhomoonaste helendumine osutus sel juhul enamasti üsna nõrgaks ega küündinud käesolevas töös aluseks võetud hinnanguskaala järgi isegi ühe plussini. Seega oli selge, et serotüüpide diferentseerimiseks sellisest minimaalsest erinevusest ei piisa.

Tabel 1

*T. vaginalis*'e nelja serotüübi diferentseerimine otsesel immunofluorestsentsmeetodil\*

Serotüüp	Fluorestseeruv konjugaat							
	1 : 10				1 : 20			
	TLR	TRT	TN	TR	TLR	TRT	TN	TR
TLR	+++	0	0	0	+++	0	0	0
TRT	0	++++	++	+++	0	++	0	0
TN	0	+++	++++	0	0	0	+++	0
TR	0	++	0	++++	0	0	0	++

\* Indutseeritud fluorestsentsi hindamise aluseid käesolevas ja järgnevas tabelis vt. «Uurimismaterjal ja meetodika».

Otsene meetod andis täiesti erinevaid tulemusi eelmisega võrreldes. Selle meetodi järgi tüübispetsiifiliste konjugaatidega ristuvalt värvitud nelja serotüüpi trihhomoonastel täheldasime helendumise intensiivsuse suuri erinevusi. Peale nende isendite, mis olid värvunud ainult kontrastvärv Evansi sinisega ja helendusid seetõttu intensiivselt punastena, leidis ka trihhomoonaseid kitsama või laiemal kollakasroheline kiirgava äärisega, mõnel juhul samavärviliste täpikestega kogu kehal.

Reeglipäraselt andis iga fluorestseeruv konjugaat otsesel meetodil kõige tugevama helenduse homoloogilise serotüübiga, samuti helendusid iga serotüübi isendid kõige intensiivsemalt pärast mõjustamist homoloogilise konjugaadiga (tab. 1). Tulemusi mõjustas muidugi ka konjugaadi kontsentratsioon. Nii andis lahjendus 1 : 10 üldiselt tugevama helenduse kui lahjendus 1 : 20.

Uhtlasi selgus, et serotüüpide eristatavus võib sõltuda ka märgistatud antiseerumite kontsentratsioonist. Nii täheldasime erinevusi serotüüpide diferentseerimise võimalustes sõltuvalt sellest, kas kasutasime 1 : 10 või 1 : 20 lahjendatud konjugaate. Näiteks värvimisel 1 : 10 lahjendatud TRT konjugaadiga erines serotüüp TRT fluorestseerumine (++++) vaid ühe

hinnanguühiku võrra serotüübi TN helendumisest (+++). Kui kasutasime TR konjugaati lahjenduses 1:10, värvusid serotüübid TR ja TRT samuti vastavalt hinnangutele ++++ ja +++. Seevastu 1:20 lahjendatud konjugaatide kasutamisel täheldasime mõlemal eespool kirjeldatud juhul märksa selgemaid diferentse. Hoolimata sellest, et helendumise intensiivsus seejuures langes, oli niihästi esimesel kui ka teisel juhul homoloogiliste konjugaatidega indutseeritud fluorestsents selgelt sedastatav (++), kõikidel heteroloogilistel serotüüpidel aga puudus (0).

Ka värvimisel TN konjugaadiga saime lahjenduse 1:20 kasutamisel paremaid resultate kui sama konjugaadiga tugevamas kontsentratsioonis (1:10). Viimasel juhul kajastasid serotüüpide TN ja TRT erinevust hinnangud ++++ ja ++, kuid lahjenduse 1:20 puhul vastavalt +++ ja 0.

Konjugaadi lahjendusmäärast ei sõltunud aga otsese meetodi järgi värvitud serotüübi TLR diferentseerimine teistest serotüüpidest. Seda serotüüpi isendid fluorestseerusid homoloogilise konjugaadi mõlemas lahjenduses (1:10 ja 1:20) ühtviisi (+++), kontrasteerides seega hästi teiste serotüüpide suhtes, sest viimastel puudus spetsiifiline helendumine täiesti (0).

Tuleb siiski märkida, et peale konjugaadi kontsentratsiooni oli ka teisi faktoreid, mis mõningal määral mõjustasid helendumise intensiivsust. Nii kogesime spetsiaalsete lisakatsete tulemuste põhjal, et ka ühtviisi töödeldud ja ühesugust serotüüpi isendite indutseeritud spetsiifilises fluorestsentsis esines teatud varieeruvusi. Ka siin nagu autofluorestsentsi puhulgi näis olevat oluline isendite vanus, kuid lisaks sellele ka preparaate ja konjugaatide värskus. Nii oli indutseeritud fluorestsents suhteliselt nõrk neis preparaatides, mis olid valmistatud vanadest, näiteks viiepäevastest kultuuridest. Samuti täheldasime nõrgemat helendumist juhul, kui preparaate oli hoitud enne värvimist mitu päeva toatemperatuuri juures. Peale selle võisime korduvalt veenduda, et *ex tempore* lahjendatud konjugaat indutseeris märksa tugevama helenduse kui näiteks lahjendatult nädal aega toatemperatuuris säilitatu.

Seoses sellega, et serotüüpide lõplikul omavahelisel võrdlemisel arvestasime alati eespool nimetatud häirivaid tegureid ja kasutasime eranditult 24-tunniseid kultuure ning värskest lahjendatud konjugaate, osutus trihhomoonaste indutseeritud helenduse intensiivsuse kujunemisel alati kõige määravamaks teguriks isendite tüübispetsiifilisus. Sellest tingituna olidki trihhomoonaste serotüübid otsese immunofluorestsentsmeetodi abil konjugaatide lahjenduste sobiva valiku puhul alati omavahel selgelt eristatavad.

Kuigi otsese meetodi rakendatavus *T. vaginalis*'e serotüüpide diferentseerimisel oli seega ilmne, püüdsime lisaks sellele selgitada ka blokeerimismeetodi kasutamise võimalusi samal eesmärgil.

Blokeerimismeetodi abil uurisime *T. vaginalis*'e serotüüpide identifitseerimise võimalust jällegi kõikide serotüüpide baasil, kasutades blokeerimiseks ristuvalt nelja antiseerumit ja kohe pärast seda samuti ristuvalt nelja fluorestseeruvat konjugaati (tab. 2).

Ilmnes, et blokeerimismeetod osutus niihästi tehnilise teostuse kui ka interpreteerimise poolest märksa komplitseeritumaks kui otsene meetod. Nii ei ole näiteks tabelis 2 esitatud andmetel serotüübid TRT ja TR teineteisest eristatavad, kui kasutada blokeerimiseks antiseerumit TRT ja värvimiseks konjugaati TR. Erinevus ilmneb küll siis, kui vastavateks komponentideks võtta antiseerum TR ja konjugaat TRT.

Taolisi näiteid leidub tabelis 2 esitatud andmete lähemal analüüsimisel veelgi. Nii jääb serotüüpide TN ja TR antigense struktuuri erinevus mär-

Tabel 2

*T. vaginalis*'e nelja serotüübi võrdlev uurimine  
immunofluorestsents testi blokeerimismeetodil

Blokeeriv antiseerum (1 : 10)	Fluoresteeruv konjugaat (1 : 10)	Serotüüp			
		TLR	TRT	TN	TR
TLR	TLR	+	0	0	0
	TRT	0	++	0	0
	TN	0	0	++	0
	TR	0	++	++	++
TRT	TLR	++	0	0	0
	TRT	0	+++	0	0
	TN	0	0	+++	0
	TR	0	++	++	++
TN	TLR	++	0	0	0
	TRT	0	+++	0	+
	TN	+	+	++	0
	TR	0	++	++	++
TR	TLR	++	0	0	0
	TRT	0	++	0	0
	TN	0	+	+++	0
	TR	0	++	+	++

kamatuks juhul, kui mõlemaid mõjustada algul antiseerumiga TN ja siis konjugaadiga TR. Erinevused ilmnevad selgelt alles siis, kui antiseerumiga TR töödeldud preparaate värvida konjugaadiga TN. Peale selle fluoresteeruvad serotüübid TN ja TR täiesti erinevalt ka sel juhul, kui neid töödelda algul mõlema suhtes heteroloogilise antiseerumiga TRT ja seejärel konjugaadiga TN.

Sellised tulemused, kus *T. vaginalis*'e kahe või isegi kolme serotüübi helendumine blokeerivate ja värvivate komponentide kasutamise mingi variandi järgi oli eristatamatult ühesugune, nõudsid seega täiendavaid uurimisi, mitme variandi üheaegset kasutamist. Kuigi sel viisil sai ka blokeerimismeetodi abil serotüüpe üksteisest eristada, ei ületanud tüüpidevahelised helendumise diferentsid ühelgi juhul otsesel meetodil saavutatavaid. Järelikult oli blokeerimismeetod küll tunduvalt tömahukam, kuid mitte mingil määral efektiivsem kui otsene meetod, pigem vastupidi.

Seoses blokeerimismeetodi rakendatavusega väärrib veel märkimist, et kõik homoloogilise antiseerumiga mõjustatud serotüübid andsid pärast värvimist homoloogilise konjugaadiga suhteliselt tugeva fluorestsentsi (tab. 2). Saadud helendus ei olnud enamasti nõrgem kui eelnevalt heteroloogilise antiseerumiga töödeldud ja hiljem homoloogilise konjugaadiga mõjustatud juhtudel. Piisava interpreteeringu puudumise tõttu väärriks kirjeldatud fenomen edaspidi lähemat selgitamist.

### Arutelu

Meie uurimistöo immunofluorestsentsmeetodi rakendatavusest *T. vaginalis*'e serotüüpide diferentseerimisel andis tulemusi, mis põhiliselt ühtisid kirjanduses esitatud tähelepanekutega mitmesuguste teiste mikroorganismide antigeensete omaduste uurimisel.

Näiteks otsene meetod, mis meie töös võimaldas kõige edukamalt diferentseerida *T. vaginalis*'e serotüüpe, on andnud häid tulemusi ka teiste mikroorganismide antigeensete variantide sedastamisel. Nii on otsese meetodi abil eristatud ka *Escherichia coli* (Coward, Thomason, 1965; Chadwick, 1966; Hebert jt., 1967) ja *Haemophilus influenzae* (Sell jt., 1963) serotüüpe.

Rõhutades otsese meetodi suurt tundlikkust antigeensete variantide diferentseerimisel, kinnitavad Cherry ning Moody (1965), et otsesel meetodil indutseeritud spetsiifiline fluorestsents võimaldab leida ka üheainsa uuritavat serotüüpi raku isegi siis, kui seda tüüpi isendeid esineks teiste rakkude hulgas tihedusega ainult 1:10<sup>7</sup>. Goldman (1966) märgib samuti, et immunofluorestsentsmeetodi otsene variant võimaldab uurida ja leida *Entamoeba histolytica* isendeid hoolimata sellest, et samal ajal esinevad uuritavas materjalis ka mitmesugused kaasnevad bakterid.

Hoopis teisiti tuleb aga meie töö tulemuste põhjal hinnata kaudse meetodi rakendatavust. See meetod ei võimaldanud *T. vaginalis*'e serotüüpe üksikesest eristada ega sobi nähtavasti üldse liigisestest antigeensete variantide diferentseerimiseks. Ka kirjanduse andmeil identifitseeritakse kaudse meetodi abil küll mikroorganismide liike (Jentzsch, 1967; Mahajan jt., 1973, jt.), kuid liigisestest antigeensete omaduste uurimiseks ei ole seda meetodit meile teada olevail andmeil seni soovitatud ega kasutatud.

Mõningaid tulemusi *T. vaginalis*'e serotüüpide diferentseerimisel andis blokeerimismeetod, kuid mitte paremaid kui otsene meetod. Pealegi oli immunofluorestsents testi sellel variandil häiriv iseärasus: pärast blokeerimist homoloogilise antiseerumiga tekkis homoloogilise konjugaadi toimele tugev fluorestsents. Sellise fenomeni esinemine ka teiste mikroorganismide, näiteks *Pasteurella pestis*'e uurimisel (Chadwick, Slade, 1960) kinnitab, et sel puhul saadavate tulemuste interpreteering vajab veel täpsustamist.

Ka absorbeerimismeetod, mis ei andnud häid tulemusi meie katsetes *T. vaginalis*'e serotüüpide eristamisel, ei ole ennast õigustanud teiste autorite töödes, isegi mitte interspetsiifiliste antigeensete erinevuste uurimisel. Nii kujunes Fry' ning Wilkinsoni (1964) andmeil absorptsiooni-meetodi abil väga raskeks omavahel diferentseerida näiteks *Neisseria gonorrhoeae*'d ja *Neisseria meningitidis*'t, Goldmani ning Gleasoni (1962) järgi aga *Entamoeba* mitmesuguseid liike.

Vaatamata sellele, millist immunofluorestsentsmeetodi varianti kasutasime, täheldasime kõigil juhtudel, et *T. vaginalis*'e ühte serotüüpi kuuluvad isendid ei helendunud ka ühes preparaadis ja ühesugusel töötlemisel kaugeltki võrdselt. Seejuures tundub teatud määral arusaamatuna, et taolise fenomeni ei juhita paljudes immunofluorestsentsi käsitlevates töödes alati vajalikku tähelepanu, isegi mitte fluoromeetrilistel uurimistel, kus üksikisendite helendumise diferentsid on määrava tähtsusega. Näiteks Goldman (1967), mõõtnud fluoromeetri abil väga suure täpsusega üksikute algloomade helendumise intensiivsust ja arvutanud saadud väärtuste keskmise, ei märgi, kas ja kuidas mõjustas uuringut isendite erinev helendumine. Ometi ühes oma varasemas töös, kus fluoromeetriat ei rakendatud, kinnitab ka Goldman (1966), et *Entamoeba histolytica* ja *Entamoeba coli* ühe tüve isendid annavad erineva intensiivsusega fluorestsentsi, vaatamata töötlemisele ühesugusel meetodil.

Kramář ning Kučera (1966), ühed vähestest, kes algloomade erineva intensiivsusega helendumise fenomeni fluorestseeruva konjugaadi toimele sama antigeense struktuuriga isenditel spetsiaalselt kirjeldavad, peavad vajalikuks selle nähu edaspidist detailsemat uurimist. Nimetatud autorid oletavad, et ülalmärgitud ilmingu üheks põhjuseks võib olla uuritavas populatsioonis sisalduvate isendite erinev vanus. Meie tähelepanekud näi-



vad kinnitavat seda arvamust, kuigi ei ole välistatud ka mingisuguste teiste, seni selgitamata faktorite osatähtsus.

Kahtlemata väärib käesolevas töös erilist rõhutamist fakt, et *T. vaginalis*'e neli serotüüpi, mis olid identifitseeritud Castellani absorptsiooni-aglutinatsiooni testi abil (Tepac, 1959, Teras, 1963), osutusid diferentseeritavateks ka immunofluorestsentsmeetodi otsese variandi rakendamisel. Kahe tehniliselt teostuselt täiesti erineva seroloogilise reaktsiooni tulemuste küllaltki märkimisväärne ühtivus võib teatud määral tuleneda sellest, et niihästi aglutinogeene (Johnson, 1967; Micol, Renoux, 1967; Boyse jt., 1971; Seed, 1972; Brown, Phillips, 1973) kui ka immunofluorestsentsitestides reageerivaid antigene (Cruchaud, 1964; Chadwick, 1966; Jentzsch, 1967) käsitatakse pinnaantigeenidena.

*T. vaginalis*'e intraspetsiifiliste variatsioonide antigeenise struktuuri detailsemal uurimisel tuleb siiski Castellani absorptsiooni-aglutinatsiooni testi pidada nähtavasti sobivamaks, sest pärast absorbeerimisi ei võimaldanud fluorokroomiga märgistatud antiseerumid serotüüpe enam küllaldase selgusega üksteisest eristada. Teisest küljest on aga immunofluorestsentsmeetodil, eriti selle otsesel variandil Castellani testiga võrreldes ka mõningaid eeliseid, mis väljenduvad eelkõige tunduvalt väiksemas materjali- ja ajakulus. Nende iseärasuste tõttu võib otsest immunofluorestsentsmeetodit pidada omalaadseks ekspresmeetodiks, mille rakendamisel saab suhteliselt kiiresti ja spetsiifiliste konjugaatide väheste hulkade abil *T. vaginalis*'e intraspetsiifilisi antigeeniseid variante omavahel eristada. Ühtlasi on alust arvata, et sama meetod on rakendatav ka trihhomoonaste teiste liikide analoogilistel uurimistel.

### Järeldused

1. *T. vaginalis*'e isenditele on iseloomulik tuhmroheline, aga võrdlemisi intensiivne autofluorestsents, mis ei sõltu serotüübist, kuid on tugevam värsketest ja nõrgem vanematest kultuuridest pärinevatel isenditel.

2. Evans'i sinine, fluorestseerudes intensiivselt punases toonis ja kontrasteerides seega hästi fluoresteiinisiotsüünaadi kollakasroheline helen-dusega, kupeerib täielikult *T. vaginalis*'e isendite rohelise autofluorestsentsi ega mõjusta indutseeritud spetsiifilist fluorestsentsi.

3. *T. vaginalis*'e liigisiseseid antigeeniseid erinevusi saab diferentseerida otsesel immunofluorestsentsmeetodil, kasutades fluoresteiinisiotsüünaadiga märgistatud tüübispetsiifilisi antiseerumeid, kusjuures kõige määravamaks teguriks fluoresteeruva konjugaadiga indutseeritud helen-duse kujunemisel on isendite serotüüp. Iga fluoresteeruv konjugaat annab otsesel meetodil kõige tugevama helen-duse homoloogiliste isenditega, samuti helen-duvad iga serotüüpi trihhomoonased üldreeglina kõige intensiivsemalt pärast töötlemist homoloogilise konjugaadiga. Seejuures langeb indutseeritud helen-duse intensiivsus lahjendatud ja pikemat aega säilitatud konjugaatide kasutamisel.

4. Fluoresteeruvate konjugaatide kasutamine kaudse ja absorbeerimismeetodi järgi ei võimalda *T. vaginalis*'e serotüüpide diferentseerimist. Ka immunofluorestsentsmeetodi blokeerimisvariant ei anna serotüüpide diferentseerimisel nii häid tulemusi kui otsene meetod ning on viimasega võrreldes pealegi tunduvalt töömahukam. Lisaks sellele võib blokeerimis-meetodi abil saadud tulemuste interpreteerimist häirida tugeva fluorestsentsi teke homoloogilise konjugaadi toimet pärast blokeerimist homoloogilise antiseerumiga.

5. Vanematest kultuuridest pärinevad ja seega nõrga autofluorestsentsiga *T. vaginalis*'e isendid helen-duvad ka pärast fluorokroomiga

konjugeeritud antikehadega mõjustamist nõrgemalt kui suhteliselt värske-  
matest kultuuridest saadud trihhomoonased. Seetõttu peavad immuno-  
fluoretsentsmeetodi abil antigeense struktuuri suhtes uuritavad *T. vagi-*  
*nalis*'e preparaadid olema valmistatud värsketest kultuuridest. TV-4  
söötme kasutamisel sobib umbes 24-tunnine inkubeerimine 37° juures.

## KIRJANDUS

- Boyse E. A., Old L. J., Scheid M., 1971. Selective gene action in the specification of cell surface structure. *Amer. J. Pathol.* 65 (11) : 439—450.
- Brown K. N., Phillips R. S., 1973. Antigenic Variation by Malaria Parasites and Babesias. Progress in Protozoology. Abstracts of papers Fourth Internat. Congr. Protozool. Clermont-Ferrand, 2—9 Sept. 1973. Clermont-Ferrand: 65.
- Chadwick P., 1966. The relative sensitivity of fluorescent antibody and cultural methods in detection of small numbers of pathogenic serotypes of *Escherichia coli*. *Amer. J. Epidemiol.* 84 (1) : 150—155.
- Chadwick P., Slade J. H. R., 1960. Identification of bacteria by specific antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate. *J. Hyg. (Camb.)*. 58 (2) : 147—156.
- Cherry W. B., Moody M. D., 1965. Fluorescent-antibody techniques in diagnostic bacteriology. *Bacteriol. Revs.* 29 (2) : 222—250.
- Collins W. E., Jeffery G. M., Guinn E., Skinner J. C., 1966. Fluorescent antibody studies in human malaria. IV. Cross-reactions between human and simian malaria. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15 (1) : 11—15.
- Coons A. H., Kaplan M. H., 1950. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exptl Med.* 91 (1) : 1—13.
- Cowart G. S., Thomaso N. B. M., 1965. Immunofluorescent detection of *Escherichia coli*. *Amer. J. Dis. Childr.* 110 (2) : 131—136.
- Cruchaud A., 1964. L'immunofluorescence. Son origine, ses possibilités, ses limites. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 94 (34) : 1153—1157.
- Duxbury R. E., Sadun E. H., 1964. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 13 (4) : 525—529.
- Fry C. S., Wilkinson H. E., 1964. Immunofluorescence techniques as an aid to the diagnosis of gonorrhoea. *Brit. J. Venereal Diseases* 40 (2) : 125—128.
- Goldman M., 1953. Cytochemical differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli* by means of fluorescent antibody. *Amer. J. Hyg.* 58 : 319—328.
- Goldman M., 1966. Evaluation of a fluorescent antibody test for amoebiasis using two widely differing ameba strains as antigen. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15 (5) : 694—700.
- Goldman M., 1967. An improved microfluorimeter for measuring brightness of fluorescent antibody reactions. *J. Histochem. Cytochem.* 15 (1) : 38—45.
- Goldman M., Gleason N. N., 1962. Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. IV. Relationship of two strains of *E. histolytica* and one of *E. hartmanni* demonstrated by cross absorption techniques. *J. Parasitol.* 48 (5) 778—783.
- Hebert G. A., Pittman B., Cherry W. B., 1967. Factors affecting the degree of nonspecific staining given by fluorescein isothiocyanate labelled globulins. *J. Immunol.* 98 (6) : 1204—1212.
- Jentzsch K. D., 1967. Immunofluoreszenz in der medizinischen Mikrobiologie (Technik und Anwendung). Leipzig.
- Johnson A. E., 1967. Comparison of six strains of *Trichomonas foetus*. I. Serum agglutination reactions. *Exptl Parasitol.* 21 : 287—291.
- Kott H., Adler S., 1961. A serological study of *Trichomonas* sp. parasitic in man. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 55 (4) : 333—344.
- Kramář J., Kučera K., 1966. Immunofluorescence demonstration of antibodies in urogenital trichomoniasis. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 10 : 85—88.
- deLavergne E., Schaack F., Dupnis J., Georges J. C., Olive D., 1966. Étude par la technique d'immuno-fluorescence du virus ourlien en culture de cellules thyroïdiennes humaines. *Ann. Inst. Pasteur* 110 (2) : 290—297.
- Mahajan R. C., Chitkara N. L., Chhuttani, 1973. IMF in Serodiagnosis and Prognosis on Amoebiasis. Progress in Protozoology. Abstracts of papers Fourth Intern. Congr. Protozool. Clermont-Ferrand, 2—9 Sept. 1973. Clermont-Ferrand: 266.
- McEntegart M. G., Chadwick C. S., Nairn R. C., 1958. Fluorescent antisera in the detection of serological varieties of *Trichomonas vaginalis*. *Brit. J. Venereal Diseases* 34 (1) : 1—3.

- Micol C., Renoux M., 1967. Réactions d'agglutination. Presse med. 75 (1) : 21—24.
- Niel G., Fribourg-Blanc, 1965. Immuno-fluorescence quantitative et sérologie de la syphilis. Bull. Org. Mond. Santé 33 (1) : 89—105.
- Rõigas E., 1969. A Method for Obtaining Clones of Trichomonads. Progress in Protozoology. Abstracts of papers IIIrd Internat. Congr. Protozool. Leningrad, 2—10 July 1969. Leningrad: 314.
- Seed J. R., 1972. *Trypanosoma gambiense* and *T. equiperdum*: Characterization of variant specific antigens. Exptl Parasitol. 31 : 98—108.
- Sell S. H. W., Chetam W. J., Young B., Welch K., 1963. *Haemophilus influenzae* in respiratory infections. I. Amer. J. Dis. Childr. 105 (5) : 466—469.
- Teras J., 1963. On the Question of the Types of *Trichomonas vaginalis*. Progress in Protozoology. Proc. First Internat. Congr. Protozool. Prague, August, 22—31, 1961. Prague : 572—576.
- Zweibaum A., Halpern B., Palou R. O., Veyre C., 1966. Mise en évidence d'un phénomène de prozone en immunofluorescence. C. R. Acad. Sci. Paris, 262, ser. D. (19) : 2108—2112.
- Wilkinson A. E., Rayner C. F. A., 1966. Studies on the fluorescent treponemal antibody (FTA) test. Brit. J. Venereal Diseases 42 : 8—15.
- Звягинцев А. Г., Виноградова К. А., Полторац В. А., 1967. Собственная (первичная) флюоресценция микроорганизмов. Научн. докл. высш. школы. Биол. науки 7 : 102—110.
- Левина Е. Н., Неймарк Ф. И., 1960. Выявление коклюшных бактерий методом люминесцирующих антител. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. (5) : 3—7.
- Мацелюх Б. П., 1966. Применение иммунофлюоресцентной микроскопии для выявления ядерных элементов у актиномицетов. Генетика (5) : 135—139.
- Михайлов И. Ф., 1961. Изучение свойств комплексов антиген—антитело методом флюоресцирующих антител. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. (3) : 28—35.
- Петров П. П., 1969. Серологическое изучение мочевого трихомонадоза. Автореф. канд. мед. н. М.
- Терас Ю. Х., 1959. Некоторые вопросы изучения трихомониаза урогенитального тракта. Десятое совещ. по паразитол. пробл. и природноочагов. болезням. М.-Л. (2) : 262—263.
- Терас Ю. Х., 1961a. О защитном действии сыворотки крови больных трихомониазом урогенитального тракта на белых мышей, внутрибрюшинно инфицированных культурами *Trichomonas vaginalis*. Изв. АН Эст. ССР. Сер. биол. 10 (1) : 19—26.
- Терас Ю. Х., 1961b. О содержании в сыворотке крови здоровых людей и кроликов антител, агглютинирующих, иммобилизирующих и лизирующих *Trichomonas vaginalis*. Сб. научн. трудов по микробиол. Ин-та эксперим. и клинич. мед. АН Эст. ССР : 43—53.

ENSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetuse saanud  
15. IV 1974

Эльмар РЫИГАС

## ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИВИДОВЫХ АНТИГЕННЫХ РАЗЛИЧИЙ *TRICHOMONAS VAGINALIS* ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Резюме

Исследовалась применимость иммунофлюоресцентного метода для определения внутривидовых антигенных различий *Trichomonas vaginalis*, а также возможность устранения автофлюоресценции этих жгутиковых.

Выяснилось, что для особей *T. vaginalis* характерна матово-зеленая относительно сильная автофлюоресценция, независимая от серотипа простейшего, но более интенсивная у особей из свежих культур. Синька Эванса, имеющая интенсивную красную флюоресценцию, полностью устраняет зеленую автофлюоресценцию *T. vaginalis*, не влияя на индуцированную специфическую флюоресценцию.

Дифференцирование серотипов *T. vaginalis* можно провести при помощи прямого метода иммунофлюоресценции, используя типоспецифические антисыворотки, меченные флюоресцен-изотиоцианатом. Решающим фактором, определяющим степень индуцированной флюоресценции, является серотип простейшего.

Непрямой и абсорбционный тесты иммунофлюоресцентного метода непригодны для дифференциации серотипов *T. vaginalis*. Блокадный вариант этого метода также не позволяет получить результаты, достигнутые прямым методом, который в то же время

и наиболее прост. Кроме того, интерпретации результатов, полученных блокадным методом, может мешать и то обстоятельство, что гомологичный конъюгат вызывает сильную флюоресценцию, несмотря на то, что блокирование проводилось гомологичной антисывороткой.

Особь *T. vaginalis* из более старых культур и имеющие, как правило, слабую автофлюоресценцию светятся и после воздействия флюоресцирующими конъюгатами слабее, нежели трихомонады из более свежих культур. Таким образом, препараты *T. vaginalis* для исследования антигенных свойств этих простейших при помощи иммунофлюоресцентного метода, необходимо готовить из свежих культур. При использовании среды TV-4 оптимальной является инкубация в течение 24 ч при 37 °C.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
15/IV 1974

Elmar RÕIGAS

## POSSIBILITIES FOR TESTING THE INTRASPECIFIC ANTIGENIC DIFFERENCES OF *TRICHOMONAS VAGINALIS* BY THE IMMUNOFLOUORESCENCE METHOD

### Summary

We investigated the suitability of the immunofluorescence method for testing the intraspecific antigenic differences of *Trichomonas vaginalis* and also the possibilities for eliminating the autofluorescence of these flagellates.

It was elucidated that a characteristic of the individuals of *T. vaginalis* is a dull green, relatively strong autofluorescence, not depending on the serotypes of the protozoan, but being more intensive in individuals collected from young cultures. Evans blue, which has an intensive red fluorescence, totally eliminates the green autofluorescence of *T. vaginalis* and does not influence the induced specific fluorescence.

It is possible to differentiate the serotypes of *T. vaginalis* by the direct immunofluorescence method using the type-specific antisera labelled with fluorescein-isothiocyanate. The most decisive factor in expressing the degree of induced fluorescence is the serotype of the protozoan.

The indirect and absorption tests of the immunofluorescence method are not suitable for differentiating the serotypes of *T. vaginalis*. Neither did the results obtained with the inhibition or blockade test of the immunofluorescence method reveal such distinct differences between the serotypes as was demonstrated by the direct method, which is also a simpler one. An additional disadvantage of the blockade method is an intensive fluorescence which occurs through treating the specimen with homologous conjugate after blocking with homologous antiserum, thus confusing the interpretation of the results.

After treatment of the trichomonads with antibodies conjugated by fluorochromes, the individuals obtained from old cultures, and possessing a weak autofluorescence, do not show such an intensive induced fluorescence as the trichomonads collected from young cultures. Therefore, the specimens used for studying the antigenic properties of *T. vaginalis* by the immunofluorescence method must be prepared from young cultures, for instance from those incubated for 24 hours in TV-4 medium at 37 °C.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Zoology and Botany

Received  
April 15, 1974