

Biológiai ágensek direkt és indirekt kimutatásának módszerei

Írta: **Geck Péter** dr. állatorvos-alezredes

A biológiai ágensek elleni védekezés megszervezését csak praeventive megtervezett és jól begyakorolt komplex rendszabályok, valamint jól egybehangolt jelzőrendszer alkalmazásával lehet biztosítani. A jelzőrendszer elsődleges feladata azonnal jelezni a támadás bekövetkezését, lehetőleg a fertőzött terület hozzátétőleges megjelölésével és a riasztás végrehajtását, másrészt a leg-rövidebb időn belül identifikálni az alkalmazott kórokozókat. Ezen elveken alapszik a biológiai támadás elhárításának a következményei gyors felszámolásának modern szemlélete. További feladatok, egyrészt a jelzőkészülékek technikai tökéletesítése és a jelzőrendszer sokoldalú kiépítése, másrészt a gyorsdiagnosztikus mikrobiológiai módszerek szemléletileg is új elvek szerinti tökéletesítése. A biológiai ágensek kimutatására szolgáló eszközöket és módszereket elvileg két nagy csoportra osztjuk:

1. indirekt, vagy fizikai jelző módszerek a támadás bekövetkezésének tényét jelzik;
2. direkt, vagy biológiai módszerek segítségével identifikálható az alkalmazott kórokozó.

Indirekt jelzési módszerek.

A legegyszerűbb és leggyorsabb, de ugyanakkor a legkevésbé pontos a vizuális, vagy a figyelés módszere. Ennek tárgya lehet a robbanás nyomán keletkező aerosol-felhő, ennek vonulása, vagy a folyadékból képezett aerosol-permet felfedezése a tereptárgyakon. Hasonlóképpen megfigyelhetők a speciálisan jelzett fel nem robbant lövedékek, vagy fel nem robbant porcellánbomba-részek, valamint az aerosolt képező kisméretű generátorok, rágszálók, ízelt-lábú rovarok, vagy ezek célbajuttatására alkalmas eszközök.

A figyelési módszer értékét az biztosítja, ha országos viszonylatban szervezik meg, de mindenképpen a fontosabb ipari, mezőgazdasági és közlekedési csomópontokon. Természetesen éjszaka, vagy bizonyos meteorológiai viszonyok között a vizuális módszer nem alkalmazható. A vizuális figyelő módszer meglehetősen szubjektív, ezért a támadás gyanúja esetén objektív módszerekkel ellenőrizni kell a jelzett megfigyelést s addig is, amíg nem specifikus jelző-eszközök eredményei nem ismeretesek, célszerű a gázalarc, a védőöltözet és az óvóhely használata.

Annak eldöntése, hogy biológiai ágenssel való támadás történt-e, számos eszközzel állapítható meg, amelyek működési elveik szerint különbözőek, de

egyöntetűen az egy időegység alatt mérhető aerosol-részecske-számot és ezek mikron nagyságrendjét határozzák meg. Ilyen eszközök a különböző impaktorok, amelyekkel, fotoelektromos megoldás és automatikus jelzés esetén a támadás perceiben, koniometerrel ellátott mikroszkópos vizsgálattal 20—30 percen belül igen nagy valószínűséggel állapítható meg biológiai ágens jelenléte a levegőben.

Az impaktorok működési elvének lényege az, hogy a különböző, mikron nagyságrendű, aerosol-részecskék mechanikus ütközéssel tapadnak a különböző szögekben elhelyezett felfogó tárgylemezre. Ilyen módon biztosítható, hogy a körököző, aerosol-részecskék egy meghatározott tárgylemezre ütközzenek. A fénymikroszkóp alá helyezett ezen tárgylemezen található részecskék számából és nagyságrendjéből nagy valószínűséggel lehet következtetni a biológiai támadásra azon terület levegőjének normál csíraszám-tartalma ismeretében. Az első készüléket, amely hasonló elveken alapszik, *Hagemann* (1) szerkesztette. Ebben a cirkuláló légáram részecskéi csak egy ütköztető tárgylemezre tapadtak. Hátránya, hogy minden nagyságrendű részecske egy lemezen található, baktériumok és levegőszennyeződések együtt. Tökéletesebb volt az 1945-ben *May* (2) által szerkesztett cascade-impaktor, amelyben már négylépcsős megoldással, a levegőáramban lévő részecskék négy lemezre ütköztek ezáltal a különböző részecske nagyságok más-más tárgylemezen tapadtak meg. Ebben a megoldásban újrendszerű az, hogy négy egyre szűkülő nyílással szemben helyezkedik el a négy felfogó lemez, így az utolsó nyílásban a legintenzívebb az áramlás, ezért a legnagyobb részecskék az első, a legkisebbek az utolsó lemezre ütköznek.

A May-rendszerű cascade-impaktor előnye, hogy hordozható, súlya 280 gr, így táborigényű körülmények között használható felfüggesztett állapotban is. A negyedik ütköztető lemezen egy mikron nagyságrendű aerosol-részecskék is mérhetők. Az optimálisan átszívott levegő mennyisége 17,5 liter percenként és alkalmas minden típusú aerosol mérésére.

Az ütköztető lemezeket ricinus és tisztított gyanta keverékével vonják be vékony rétegben azért, hogy az aerosol-részecskék tökéletesen megtapadjanak. A tárgylemezt koniometerrel ellátott mikroszkóp alá helyezve, megállapítható az aerosol-szemcsék nagysága és az ismert mennyiségű átszívott levegőben lévő aerosol-szemcsék száma.

Hasonló célokat szolgál, de más elveken alapszik a *Guyton* és *Truhanov*-féle elektropraecipitátor. Az egyik megoldás szerint az aerosol-kamrának két oldalán egy-egy elektrosztatikus lemez van elhelyezve s maga a kamra ultramikroszkópba van beépítve. Váltóáram hatására a különböző töltésű aerosol-részecskék a pozitív, illetve a negatív pólus között végzett rezgő mozgása lefényképezhető, megállapítható a szemcsék nagysága.

Egy másik megoldás szerint a részecskék magasfeszültségű áram hatására ionizálódnak és az ellentétes töltésű fémpólusokra tapadnak a pólusokkal azonos irányban ható légáramban, úgyhogy külön tapadnak meg a nagy és más helyen a kisméretű aerosol részecskék. Minthogy a fémpóluson nem mérhető részecske-nagyság, sem a részecskék száma, *Guyton* (3) szerkesztett a készülékhez egy elektromos berendezést, amelyben egy rézrudacsákára ütköző aerosol-szemcsék elektromos impulzusváltozást okoznak. A felerősített elektromos impulzusokat egy elektromágneses mechanikus számláló berendezés rögzíti.

Guyton szerint 0,3 mikron nagyságrendű részecskék is mérhetők, 1947-ben *Gucker* és *Mtsai* egy fotoelektropraecipitátort szerkesztettek. A készülék kizárólagos rendeltetése az aerosol-részecskék számlálása, függetlenül a részecske nagyságától, amely az aerosol-részecskék által okozott fényszóródás elvén

alapszik. A keskeny résen gyorsan áramló aerosolt intenzíven megvilágítják ötét alapon, úgyhogy fotoelemek érzékelik az aerosol-szemcsék által okozott lényesszóródást, általában a 0,6 mikronnál nagyobb részecskék is kimutathatók. Ezek a fényimpulzusok elektromos impulzust indikálnak, amelyeket felerősítve automatikus számláló berendezésen olvasnak le.

Ismeretes még a Tornszkoj-féle *thermopraecipitátor*, amely azon az elven alapszik, hogy szilárd aerosol-részecskék meleg hatására lecsapódnak. Camp Detrickben kidolgozták az *aeroszkópot*, amely egyesíti magában a fent leírt eszközök legjobb tulajdonságait és alkalmas minden típusú aerosollal végrehajtott biológiai támadás azonnali jelzésére. Az aeroszkóp méri az időegység alatt átszívott aerosol-részecskék számát és nagyságát. Igen nagy előnye, hogy jelzi a levegőben lévő radioaktív aerosol-részecskék jelenlétét is.

Az indirekt jelzőkészülékek továbbfejlesztésének célja és útja összekapcsolni az indirekt jelzési módszert a specifikus gyorsdiagnosztikus és mikromethodikái identifikálási eljárásokkal olyan módon, hogy a biológiai támadás tényét és a felhasznált kórokozót egy-két órán belül identifikálni lehessen.

Mínthogy a biológiai támadás végrehajtásának legvalószínűbb eszköze aerosol, azért foglalkoztam kissé részletesebben azokkal az eszközökkel, amelyek alkalmasnak látszanak szilárd és folyékony halmazállapotú aerosol-részecskék, elsősorban baktériumok kimutatására.

Vírusok és általában szövettenyészetben szaporított mikroorganizmusok indirekt módon való jelzésére az *indikátorcső* látszik alkalmasnak. Ez egy középen szelesebb, két végén elkeskenyedő, nyitott végű, hegyalakú üvegcső, amelyben fehér színű, speciális kémiai reagens van. Az indikátorcső működési elve azon alapszik, hogyha állati vagy emberi fehérjét tartalmazó levegőt szívunk vagy fújunk át az indikátorcsővön, az eredetileg fehér anyag világoskék színű lesz. A jelzőanyag színe nem a vírus hatására változik meg, hanem azon szövetfeleségek hatására, amelyekben a vírus egyáltalán tenyészthető. Biológiai támadás esetében az történik, hogy a vírusok csak a tenyésztő szövetfeleséggel együtt kerülhetnek aerosol formában felhasználásra, tehát emberi vagy állati fehérje jelenlétére utal az elszíneződés. Legalább 10 liter levegő átszívása esetén 0.00014 mg fehérje jelenlétét már jelzi az indikátorcső, tehát nem egy bizonyos vírusfeleség kimutatására alkalmas, hanem azt jelzi indirekt módon, hogy egyáltalán valamilyen vírusfeleség került bevetésre biológiai fegyverként.

Sajnos, baktériumok kimutatására a jelzőcső nem alkalmas.

A levegőn kívül minden bizonnyal a víz látszik igen alkalmasnak biológiai ágensek terjesztésére, elsősorban az olyan vizek, amelyeket felhasználás előtt nem vetnek alá semmiféle kémiai kezelésnek. A szokásos colititer és baktérium-összecsírás szám meghatározása nem vehető figyelembe indirekt módszerként, mert a meghatározás elvégzése hosszadalmas. Külön problémát jelentenek a toxinok, amelyeket alacsony koncentráció mellett igen nehéz a vízből kimutatni. Alkalmas módszernek látszik a klórozott vízvezetéki vizekben biológiai ágensek indirekt módon való kimutatására a maradék klór koncentrációjának meghatározása, amely művelet elvégzése folyamatos ellenőrzést igényel. Bár a víz maradék klórtartalma hirtelen csökkenhet egyéb okoknál fogva is (pl. szűrőberendezések sérülése stb.), a vízellátást ilyen körülmények között azonnal meg kell szüntetni, amíg véglegesen nem tisztázódik a víz maradék klórtartalma hirtelen csökkenésének oka.

Collins és *Kipling* (4) módszert dolgoztak ki a vízben található baktériumok indirekt módon való számlására. Ezzel a módszerrel két órán belül eredmény kapható a vízmintavétel után. A módszer lényege az, hogy a vizet, amely baktériumokat tartalmaz, 0,1%-os gentiana-ibolya és desztillált vízben

elegyített glicerinnel hozzák össze, majd az egész keveréket bepárologatják. A glicerinben festett állapotban megmaradt baktériumokat mikroszkóp alatt vizsgálják. Ismerve a felhasználást víz mennyiségét és 10 látótérben megszámlálva a baktériumokat, viszonylag rövid időn belül lehet következtetni az összcsíraszámra. A levegőben található baktériumok jelenlétére következtethetünk egyrészt az aeroszol-szemcsék számából és méret nagyságából, másrészt a levegőben és vízben található fehérje koncentrációjából, mivel ezek az esetek legnagyobb részében a jelenlévő mikroorganizmusokkal kapcsolatosak.

Stickland (5) javasolja e célból a biuret-reakció alkalmazását. Műszerének lényege az, hogy a mikroorganizmust tartalmazó vízhez nátrium-hydroxidot és rézszulfátot ad, aminek következtében a fehérjetartalmú vízben bíborvörös elszíneződés alakul ki. Ezután fotoelektromos abszorpció segítségével megállapítható a baktériumok hozzávetőleges száma a vizes közegben. A módszer nem túlságosan érzékeny, mert legalább 0.5 mg fehérjének kell az oldatban lenni ahhoz, hogy kimutatható legyen, ez viszont kb. 5 mg baktériumtest-fehérje mennyiségének felel meg.

Hasonló elveken nyugvó rendkívül érzékeny módszert írtak le az USA-ban a levegőben található baktériumfehérje kimutatására *pirozil-reakció* segítségével. A módszer lényege az, hogy meghatározott mennyiségű levegőben található mikroorganizmusokat 315–482 C fokon kezelik, aminek következtében a baktériumfehérjék roncsolódnak és a keletkező egyik résztermék a ciánsav, amelynek mennyiségét különböző módszerekkel viszonylag egyszerűen ki lehet mutatni. Ez a módszer alkalmas néhány mikrogramm fehérje kimutatására egy liter levegőben.

A legismertebb indirekt jelzésű módszerek rövid ismertetése egyértelműen bizonyítja azon reális törekvésnek jogosságát, hogy a legfontosabb körülmény azonnal jelzést kapni a biológiai fegyver alkalmazásáról. Mivel az aeroszolok alkalmazása csak meghatározott meteorológiai viszonyok között történhet, nyugati szakértők véleménye szerint meghatározott körzetekben szakképzett aeroszol-szakértők alkalmazása indokolt, minthogy nagy valószínűséggel előre megállapítható a biológiai fegyver aeroszol formában való bevetésének lehetősége.

Direkt jelzési módszerek.

A biológiai ágensek specifikus kimutatására alkalmas eljárások három nagy területet ölelnek fel:

1. a fertőző anyagminta gyűjtését;
2. a begyűjtött anyagban a kórokozók bekoncentrálását;
3. a mikroorganizmusok identifikálását.

Mintagyűjtés.

A mintagyűjtés kettős célt szolgál, egyrészt vizsgálati anyagot biztosít a kórokozó identifikálására, másrészt lehetőséget nyújt a fertőzött terület megállapítására és körülhatárolására. Fontosabb vizsgálati anyagok a következők: levegő, víz, élelmiszer, tereptárgyokról mosófolyadék, légbomba és gránát repeszdarabok, aerosolképző készülékek, vagy ennek részei és egyéb tárgyak, amelyek fertőzöttsége feltételezhető. A laboratóriumi diagnózis rendkívül nehéz feladat elé állítja a legkiválóbb specialistát is, mivel a modern mikrobiológia lehetővé tette számos pathogen és apathogen mikroorganizmus tenyésztési, morfológiai, biokémiai és antibiotikum-érzékenységi tulajdonságainak megváltoztatását.

További nehézséget jelent, hogy nagy valószínűséggel több típusú mikro-organizmus alkalmazható, amelyek a levegőben, vízben és a tereptárgyakon egyéb nem pathogen baktériumokkal keverednek, ezért a gyors és jó laboratóriumi diagnózisnak egyik fontos alapfeltétele a szakszerű mintavétel.

Levegőmintavétel.

Az a tény, hogy levegő mintavételére számos különböző elvek szerint működő készüléket ajánlanak bizonyítja, hogy ezideig nem sikerült kialakítani egy nagyfokú érzékenységgel rendelkező és minden helyzetben használható levegő mintavevő készüléket. A levegő mintavevő készülékeket működési elveik szerint két nagy csoportra osztjuk:

1. szedimentációs,
2. aspirációs elvek szerint működő.

A szedimentációs eljárások közül minden pontatlansága dacára a legrégebb és még ma is széles körben használt a nyitott Petri-csészés ülepitési próba. Petri-csészéket különböző magasságokban helyeznek el meghatározott ideig és 24 órás inkubáció után értékelik egyrészt az összcsíraszámot, másrészt identifikálják a gyanús telepeket. A módszer előnye, hogy specifikus diagnózist biztosít, hátránya viszont, hogy csak 24 óra múlva vizsgálható és hogy csak a nagyméretű aerosol-részecskék ülepednek le a rövid expozíció alatt. *Hollaender és Dalla Walle* (6) által készített szedimentációs elveken nyugvó készülék lényege az, hogy egy üvegtölcsér szélesebb részét Petri-csésze fölé illesztik és a keskenyebb részén bepréselt levegőben lévő baktériumok viszonylag nagy számban ütköznek és tapadnak meg a táptalajon. Előnye, hogy minden nagyságrendű aerosol-szemcse a táptalajra kerül.

A fenti készülék újabb módosítása szerint a tölcészerszerűen kiképzett alsó részbe táptalajjal átítatott speciális szűrőt erősítenek. Meghatározott levegőmennyiség átszívása után a szűrők thermostátba kerülnek. Hátránya, hogy a tenyésztés 24 órát igényel, előnye viszont, hogy megoldja a táptalaj-problémát tábori körülmények között is.

Ezt a megoldást hivatalosan is bevezették az USA polgári légvédelmi szolgálatában.

Az ülepitési módszerek egyik variánsa az *Anderson* (7) által készített henger alakú készülék, amely hat darab egymásfölött elhelyezett Petri-csészebe ülepití az aerosol-szemcséket, úgyhogy a felső Petri-csészék fölött nagyobb nyílású, az alsóbbak fölött pedig kisebb nyílású lyukakkal ellátott, félgömbszerűen kiképzett fedőrész van. A fentről lefelé áramló levegőből a nagyobb aerosol-szemcsék a felső, a kisebbek az alsó Petri-csészébe ülepednek le.

A készülék előnye, hogy hordozható, elkülöníti a különböző szemcsenagyságokat és tenyésztéssel identifikálható a kiszűrt baktérium. A legmodernebb, szedimentációs eljárással működő készülék a réses mintavevő. A *Bourdillon* (8) által készített réses mintavevő működésének lényege az, hogy egy a közép-pont felé keskenyedő résen keresztül hat a levegő egy módosítható fordulatszámmal forgó Petri-csészére. Ismerve az átszívott levegő mennyiségét, a fordulatszámot, az expozíciós időt és a leolvasott telepek számát, megközelítő pontossággal lehet következtetni a levegő csíratartalmára és inkubálás után izolált telep nyerhető további vizsgálatok céljára.

A Bourdillon-készüléket *Schuster* automatizálta, úgyhogy 12 órán keresztül folyamatosan működik, és percenként 28,3 liter levegőt szívott át. Így viszonylag hosszú időn keresztül követhető a levegő csíratartalmának alakulása.

A fent elmondottak előnyeit egyesíti magában a *Krotov-féle réses mintavevő*, amely készüléket automatizálva, hordozható formában készítették el.

Levegő mintavételére alkalmas eszköz a *Wells-féle aerocentrifuga*, amelynek centrifuga-csőveiben táptalajt tartalmazó, megfelelően kiképzett üveg-edény van. A centrifugacsövek forgása következtében ütődnek az aerosolszemcsék a táptalajra.

A levegőmintavételi eszközök másik nagy csoportját az *adszorpciós* eljárásos eszközök képezik, amelyek egyrészt az elektromos áram, másrészt hőhatásra határozzák meg a levegő aerosol részecskéit. A legegyszerűbb, táptalajjal ellátott elektropraecipitátor a *Luckiesch-féle* készülék, amelyben két agarlemez között átszívott levegőből adszorbeáló az aerosol részecskék az agarlemezre, — annak következtében, hogy a 8000 Volttal működő pólusok egy-egy agarlemezbe épülnek be.

Hasonló elveken nyugvó számos más elektropraecipitátort készítettek, amelyek közös hátránya, hogy nagyjából csak beépített állapotban használhatók.

A thermopraecipitátorok működése azon az elven alapszik, hogy a légáramlás különböző hőmérsékletű lemezek között történik s az aerosol részecskék a hő hatására a hideg lemezre lecsapódnak. Baktérium aerosolok esetén az ún. hideg lemez 25 C fokon, a meleg lemez 100 C fokon s a két lemez közötti távolság 0.038 cm.

Az impingerek is fontos szerepet játszanak a baktériumokkal szennyezett levegő kiszűrésében. Az elsők között *Robertson*, *Diakonov* és *Rosebury* készítettek ilyen típusú mintavevőket, amelyek lényegesen érzékenyebbek a táptalajokkal kombinált mintavevőknél, minthogy gyorsabb a mikrobák szaporodása az impingerek tápfolyadékában. Nálunk ismert a *Kovács-féle módosított impinger*. Kézipumpával működtethető és tábori körülmények között is jól használható. Levegő- és vízmintavételre készítettek különböző szűrőberendezéseket. Ezek között a legegyszerűbb a vatta-szűrő, amelyről eluálják a mikrobákat a laboratóriumban.

Sokkal tökéletesebb megoldás a membránfilterek használata, amelyek segítségével folyamatos mintavétel eszközölhető. Levegőszűrésre általában kisebb porúsú filtereket használnak, míg vízszűrés céljára nagyobb porussal rendelkezőket.

A nitrocellulózéból készült membránfilterekről alkotott szerzői vélemények rendkívül ellentmondóak. Az ellentmondó vélemények dacára használata ma már rendkívül széleskörű és a vízbakteriológiában rutinszerű felhasználást nyert. A membránfiltert electív táptalajon inkubálva 24 óra alatt identifikálható a kiszűrt mikroba. Jól használható haptén flokkulációs vizsgálatok végzésére is, mivel bizonyos kémiai eljárásokkal a filterek feloldhatók teljes csirtartalmukkal.

Napjainkban mind szélesebb körben nyernek alkalmazást a semleges közegekben is oldható anyagokból készült filterek. Ezek közül legismertebb a száraz gelatin habszűrő, amelynek előállítási technikáját *Mitchell* (9) dolgozta ki. 4%-os glicerinnoldatba 40%-os gelatint elegyítenek 65 C°-on, majd habbá keverik és kiszáritás után vékony lemezzé préselik. A száraz, kerek gelatinhablapot megfelelő szűrőfoglatba helyezve alkalmas egy mikron nagyságrendig mindent kiszűrni. A szűrőlapokat széndioxiddal elegyített ethilénoxidral sterilizálják. Szűrés alkalmával legalább 50 liter levegőt kell átszűrni a filteren maximálisan 0,5 atmoszféra nyomással, ezután steril fiziológias konyhasóoldatba téve és thermostátba helyezve a gelatinhabszűrő teljesen feloldódik és továbboltásra válik alkalmassá.

Az oldható szűrők egy másik csoportját *nátrium alginátból* készítik, amely 1/10 arányú vízben jól oldódik szobahőmérsékleten is és 125 C° sterilizációt bír el. A nátrium alginát filter rendkívül nagy határfokkal dolgozik, mert számos kísérlet alapján megállapítható volt, hogy az átszívott levegő minden esetben tökéletesen steril marad. Hasonló effektivitással dolgozik a japánok által ajánlott nátrium glytomat is.

Összegezve az elmondottakat, megállapítható, hogy az indirekt jelzésű módszerek és eszközök egy részével 20—30 perc alatt meghatározható egy adott helyen és időpontban a normálistól eltérő csíraszám, a levegőben és vízben egyaránt, ami minden esetben alapos gyanút kelt biológiai ágensek bevetésére.

A direkt jelzési módszerek csak 24 óra múlva adnak, de megbízhatóan pontos előzetes tájékoztatást a felhasznált kórokozók specieséről. Ezekben általában táptalajra, vagy filterekre ütköztetjük az aerosolt. A fejlődés további útja egyrészt a készülékek automatizálása és az időfaktor további leszűkítése, másrészt az indirekt és direkt módszerek összekapcsolása úgy, hogy a biológiai támadás jelzésével egy időben gyorsdiagnosztikus módszerekkel legalább előzetes eredményt tudjunk biztosítani.

Ilyen elvek alapján *Mansberg* (10) egy olyan baktériumtelep számláló készüléket szerkesztett, amely a televíziós kamera működési elvén alapszik. A mikrobatelepek által kiváltott fényimpulzusok alapján egy automatikus számláló berendezés egy-két másodperc alatt jelzi az összcsíraszámot.

Vízmintavétel

Amint már jeleztem, a biológiai ágens gyors és pontos identifikálásának egyik fontos előfeltétele a szakszerű mintavétel, amelyet a vízre vonatkozóan nem észleletezek, mert a csap-, kút- és folyóvíz, valamint az állóvizek és vízzelvezetőkből történő vízvétel általában közismert módon történik. A membránfilterrel történő vízmintavételről már fentebb szoltam. Említést érdemel *Lyutov* (11) által ajánlott diatomafilter, amely alkalmas 100 liter víz átszűrésére 35 perc alatt. Szerző adatai szerint a rendkívül kevés csíraszám mellett 5-féle *Salmonella* típus 20 liter vízből sikerült identifikálnia.

Ha felmerül a biológiai fegyver alkalmazásának gyanúja, célszerű mintát venni az összes környező tereptárgyokról. A mintákat a területileg feltételezett középpontban és elérhető magasságban kell venni. Erősebb légáramlás esetén annak irányában távolabbi pontokon, szélcsendes időben a négy világtájnak megfelelően a fertőzött terület körülhatárolása céljából. Tárgyak felületéről steril, nedves vattával, vagy újabban kalcium alginát vattával célszerű mintát venni, mert utóbbiból a mikrobák nagyobb számban tenyészthetők ki.

Számos irodalmi adat tanulsága szerint fertőzött területen elengedhetetlenül fontos a területen tartózkodó emberek és állatok orr- és szájüregéből mintát venni, mert itt nagyobb valószínűséggel marad fenn a mikroba, mivel védve van a természeti tényezők mikrobakárosító hatásától.

A fertőzött területen levett mintákon kívül célszerű tereptárgy részeket, izeltlábuákat és rágcsálókat is polietilén zacskóban a laboratóriumba küldeni.

Gyorstenyésztési módszerek

A vizsgáló laboratórium elsődleges feladata a beküldött minták gondos kezelése mellett a kórokozókat mielőbb kitenyésztetni és szintenyészet nyerése után identifikálni azokat. Közismert, hogy vírusok és rickettsiák esetében ez hosszabb időt igényel. A tenyésztési idő minimálisra való csökkentésének leg-egyszerűbb módja a mintavétel utáni azonnali inkubáció, már a szállítás alatt.

Ezt a célt szolgálja a *test-, illetve a zsebthermostát*. A gyorsstenyésztés másik módszere egy olyan eljárás, amelyben a tenyésztés folyamán a táptalajt állandóan cserélik, ami a szaporodást gátló bomlástermékek folyamatos kiiktatását biztosítja. *Harris és Powell* ezzel a módszerrel olyan mértékben tudta lerövidíteni a tenyésztési folyamatot, hogy 5—6 óra alatt baktériumfestést és immun-diagnosztikai reakciókat volt képes elvégezni. A módszer lényege az, hogy a tenyésztés celophan membránon történik, amely alatt a tápfolyadék különböző módszerekkel folyamatosan cserélhető.

Egy másik irányzatot képviselnek azok a kísérletek, amelyekből kiderült, hogy homológ baktériumtenyészet szűrletek hozzáadása a táptalajhoz, lényegesen megrövidíti a tenyésztési időt. Jó növekedés és stimulátorként írták le a corn-steep liquor, vagyis a kukorica kivonatot, ezenkívül a szarvasmarha csontvelőt és a táptalajba vezetett elektromos áramot. A corn-steep liquort különösen az anaerob baktériumok tenyésztésében használják kiterjedten, amikor nemcsak a csíraszám gyorsabb növekedését segíti elő, hanem toxintermelő mikroorganizmusok esetén a keletkezett exotoxinok mennyiségét több százszorosan megemelik. Ilyen módon sikerült Lammananak egymillió DLM/50 értékű botulinus toxint termelni. Ezek a módszerek általában a baktériumszaporodás kb. 6 órás lappangási fázisát rövidítik meg.

Identifikálási módszerek

A klasszikus laboratóriumi vizsgáló módszerek általában 24—48 órát igényelnek abban az esetben, ha a vizsgáló sokoldalú tapasztalattal rendelkezik és célzott tenyésztés folyik. Ez az időtartam azonban sokszorosan megnyúlik, ha a vizsgálónak nincs gyakorlata egyrészt a különösen veszélyes fertőző kórokozók és toxinok, másrészt a területileg ismeretlen ágensek identifikálásában.

További nehézséget jelent, ha az ellenség mikrobák, toxinok és vírusok különböző kombinációját alkalmazza, amelynek technikai előfeltételei ma már biztosítva vannak.

Biológiai ágensek alkalmazása esetén elengedhetetlen a gyorsdiagnosztikus módszerek használata, amely nem zárja ki annak szükségességét, hogy ezzel párhuzamosan a klasszikus módszereket is minden esetben elvégezzék a kapott gyorsdiagnosztikus eredmények ellenőrzésére, és megerősítésére. Igen nagy problémát jelent a toxinok kimutatása, amely legmegbízhatóbban még ma is kísérleti állat védelési próbákkal történik.

Boroff és Fitzgerald (12) megfigyelései szerint a botulinus toxin jellemző autofluorescentiával rendelkezik meghatározott hullámhosszúságú ultrabolya fényben. Specifikus antitoxin hozzáadása után gyengül az autofluorescentia, vagy teljesen eltűnik.

Napjainkban a biológiai ágensek gyorsdiagnosztikájában a legnagyobb érdeklődéssel az *immunfluorosztopia* és az *infravörös spektrofotometria* tart számot.

A fluorosztopiás módszert először *Coons* (13) írta le. A módszer lényege az, hogy a specifikus immunsavófehérje molekulái kémiaiilag egyesülnek bizonyos fluorochromokkal s az így megfestett immunsavót, vagy immunglobulint tárgylemezre fixált homológ antigénnel összehozva, az immunsavó specifikusan adszorbeálódik az egyes baktériumokra és lemosással sem távolítható el, míg heterológ antigén esetén a fluorochromizált savó lemosható. Ezt a tárgylemezt fluorescens mikroszkópban vizsgálva, amelyet magashyomású higanygőzlámpával előállított ultrabolya fényvel világítunk meg, specifikus kötés esetén az egyes homológ baktériumok intenzíven csillognak, míg a kontroll kenet

látótere egyneműen sötét marad. A fluorescens diagnosztika lényeges előfeltétele a magastiterű immunsavó, vagy ennek globulinfrakciója.

A vizsgálat elvégezhető direkt, indirekt és módosított indirekt módszerrel.

A direkt módszernél a fixált kenetre jelzett savót teszünk közvetlenül.

Az indirekt módszer esetén jelzetlen immunsavót vizsgálunk a fixált kenetre, amelyet 15 perc után lemosunk és fluorochrommal jelzett nyúlantiglobulinnal hozzuk össze, amikor is a homológ baktériumra abszorbeálódott szérumblobulin egyesül a jelzett nyúlantiglobulinnal és így közvetve festődik meg a baktérium is.

A módosított indirekt módszer alkalmazása esetén a fixált kenetre specifikus jelzetlen savón kívül még natív tengerimalac savót (komplementumot) is vizsgálunk. A tárgyilemez lemosása után a kenetet fluorochrommal jelzett tengerimalac antiglobulinnal festjük, ahol a komplementkötő hatás is érvényesül a specifikus festés létrejöttében. A direkt módszert általában a baktériumok fluorescens diagnosztikájában használják. A vírusdiagnosztikában az indirekt módszer alkalmazása javasolt, mivel lényegesen érzékenyebb a direkt módszerrel és így alkalmas a millimikron nagyságrendű vírusrészecskék kimutatására is.

Indirekt módszerrel identifikálták a bárányhimlő, herpes, poliomyelitis, psittacosis, kanyaró stb. vírusokat, bár az elbírálás ma még meglehetősen szubjektív. Liu adatai szerint az influenza vírust csirke embrióba oltva már 24 óra múlva kimutatták indirekt fluorescens festéssel. Több szerző jó eredményt ér el a kiütéses tifusz kórokozójának gyors identifikálásával. Carter és Leise kidolgozták a *Brucella suis*, *Pasteurella tularensis*, *Pasteurella pestis* és a *vibrio cholerae* immunofluorescens gyorsdiagnosztikáját, kevert és szintenyészetben egyaránt. Ahol keresztreakciót kaptak, ott alacsonyabb titerű savó használatával a keresztkéteket ki tudták iktatni.

Hazai viszonylatban magam is foglalkoztam (14) a *Clostridium botulinum* B és a gázoedemát okozó *Clostridiumok* immunofluorescens kimutatásával. Ebben a munkában sikerült bebizonyítani, hogy az egyes *Clostridium*-fészeségek egymástól és minden egyéb baktériumtól pontosan és jól elkülöníthetők. Ezzel a módszerrel sikerült a két-háromnapos, esetenként egy-kéthetes tenyésztési időtartamot kb. egy órára lesűkíteni. A *Clostridium perfringens* esetében sikerült az A és F típusokat egymástól elkülöníteni. Az immunfluorescens módszer előnye a következők:

1. Kiiktatja a tenyésztés hosszú folyamatát, kivéve a vírusokat, mert a mintavevő eszközökről kenetlenyomatot készítve és homológ fluorochromizált savóval festve, az ismeretlen kórokozó azonnal vizsgálható. A kenet lemosása után hat különböző savóval ugyanaz a kenet újra festhető. Ezzel a módszerrel megfelelő jelzett savók birtokában egy órán belül laboratóriumi előzetes diagnózis mondható, ami mindenképpen irányt szabhat a vizsgálatok további menetére vonatkozóan. Az indirekt módszer továbbbtkéletesítése esetén remélhető, hogy a több hetet igénylő vírusdiagnosztikus eljárások is néhány órára lecsökkenthetők lesznek.

2. Rendkívül kevés, kb. 200 baktérium/ml is identifikálható élő és elölt állapotban egyaránt, tehát olyan esetben is, amikor a klasszikus tenyésztési módszerektől eredmény már nem remélhető.

A módszer hátránya az, hogy részantigén rokonság esetén nem specifikus fluorescenciát ad és meglehetősen hosszadalmas az egyes immunsavók fluorochromokkal való konjugálása.

Az utóbbi időben a mikroorganizmusok identifikálására az infravörös spektrofotometriás eljárást ajánlják. Kb. 1948 óta kezdték felhasználni az infravörös spektrofotométert biológiai anyagok vizsgálatára. A módszer értékét

diagnosztikus szempontból azt határozza meg, hogy a különböző alkatrészeknek karakterisztikus és egymástól eltérő abszorpciós spektruma van és ezt mikroorganizmusok identifikálására is fel lehet használni. Az infravörös spektrofotometria a baktériumok identifikálására először *Stevenson* (15) alkalmazta 1952-ben. Később többen végeztek hasonló vizsgálatokat. A módszer lényege az, hogy a baktériumok tiszta tenyészei infravörös spektrofotometren vizsgálva a 3—12 mikron közti hullámhosszúságon speciális abszorpciót mutatnak, melyet az egyes baktériumfélésekben jelenlévő organikus anyagok okoznak. Úgy látszik, hogy ezen organikus anyagok összetevői eléggé változatos mennyiségekben vannak jelen a különböző baktériumfélésekben, mert a kapott abszorpciós spektrumok alapján egymástól elég jól elkülöníthetők.

Az infravörös spektrofotometriával nemcsak a teljes baktériumsejtek vizsgálhatók, hanem baktériumsejt kivonatok is. *Williams és Ingraham* (16) szerint az egész vizsgáló folyamat a mintagyűjtéstől a diagnózis felállításáig kb. 30 óra. Szerzők membránfiltert ajánlanak a baktériumok bekoncentrálására és ezt a filtert kb. 6—8 órán keresztül electív táptalajon tartják, mivel az analízishez igen kevés mikroorganizmus szükséges. Mivel ez a módszer tiszta baktériumtenyészetet igényel, a diagnózist csak azzal az idővel rövidíti meg, amit a biochemiai és az állatkísérletes identifikálás jelentene. A módszer specificitása tekintetében is merülnek fel problémák, mivel az enterális baktériumok esetén a közeli rokonságban levő baktériumfélések között az abszorpciós differenciák nem elég kifejezetek. Methodikája és eszközszüksége elég bonyolult és igen szigorú tenyésztési pH, hő stb. kautélékat kell betartani korrekt eredmény eléréséhez.

Az elmondott, kissé bonyolultnak látszó módszerek mellett ismerünk számos olyan specifikus vizsgáló módszert is, amelyek viszonylag rövid idő alatt bizonyos részeredmények, vagy tájékoztató jellegű előzetes diagnózis biztosítására alkalmasak.

A *Marder-* (17) módszer lényege az, hogy a membránfilteren átszűrt víz, vagy levegő csiratartalmából kenetlenyomatot készít és Gram szerint festi. Mikroszkópikus vizsgálattal rövid időn belül eldönthető, hogy Gram-pozitív, vagy -negatív coccusok, illetve pálcák szaporodtak-e fel a vizsgált közegben. Ez a módszer további irányt szabhat a laboratóriumi vizsgálatoknak.

A *Sordelli-* (18) féle telluros gégetampon a *diphtheriae bacillus* kimutatására szolgál. Hasonlóképpen jól használható az „Ecco”, a „Colitrop” és a „H-Polytrop T” (19) táptalajok. Ezen portáptalajok a rendkívül electív, illetve differenciáló képességükkel a víz, illetve mosófolyadék *coli bacillusos*, *enterococcusos*, *cholera vibríós* és *anthrax bacillusos* fertőzöttségét magánál a fertőző forrásnál 10—12 óra alatt kimutatják, tábori körülmények között is. Közismert a haptén flokkulációs gyorsdiagnosztikus módszer is, amely az eddig ismert eljárás szerint a rövidített inkubációval nyert telepeket bouillonba oltva kb. 6 órás tenyésztés után a hapténeket kémiai eljárással tárják fel. A feltárt hapténeket különböző adszorbensekkel összehozva specifikus immunsavók segítségével tárgylemez flokkulációt nyerhetünk. Egyes haptén flokkulációs módszereknél kémiai adszorbensek helyett birka vörösvérsejt is használható. Hasonló elvek szerint végezhető el a *Kravcsenko*—*Szokolova*-féle haptén flokkulációs módszer is. Ez az eljárás csak megfelelő csíraszám esetén ad pozitív eredményt.

Az újabb módszerek között említhető a specifikus savóban való kevert mikrobák tenyésztése. Homológ savó meghatározott hígítását a tápfolyadékhoz adva 6—8 órán belül jól elbírálható agglutináció alakul ki a tenyésztő folya-

dékban, amennyiben homológ baktérium is van a kevert tenyészetben. Hasonló kísérleteket magam is végeztem a *Clostridium perfringens* gyors identifikálására és 6 órán belül sikerült kiválasztanom azokat az agglutinációs csöveket, amelyekben az utólagos tenyésztés is a *Clostridium perfringens* előfordulását igazolta. A *Lányi*-féle gyorsított tenyésztési módszer lényege az, hogy izolált telepet néhány óráig bouillonban tenyészt, majd dezoxicholát-phenolvörös agarra szélesíti a baktériumtörzset. Erre a táptalajra különböző, cukorral átítatott papírkorongokat helyez és így egy időben olvassa le a biochemiai reakciókat, az antibiotikumérzékenységet és végzi el a serológiai reakciókat is. Az újabb biochemiai vizsgáló módszerek közül értékesek a mikromethodikás eljárások. Ezen módszerek közös elve az, hogy a viszonylag nagy inokulumhoz képest kevés táptalajban a reakció igen gyorsan következik be és így hamar leolvasható.

A *Thiry*-féle mikromódszerrel egy adott gyanús telep baktériumainak összes fontosabb biochemiai tulajdonságait az eddigi 4—5 nap helyett 10—18 óra alatt ki lehet mutatni. Egyszerűsége és gyorsasága alkalmassá teszi tábori körülmények között való felhasználását. A *Thiry*-féle mikromódszer további előnye, hogy a megfelelően kiképzett plexilemez, amelyen egy időben nagyszámú biochemiai vizsgálat végezhető el, viszonylag kis helyen elfér, — ezért jól használható komplettekbe beépítve is. Nagymértékben meggyorsítja a diagnosztikus lehetőségeket a *Thiry*-féle portáptalajok használata, minthogy tábori körülmények között is viszonylag egyszerű eljárással teljes értékű táptalajok készíthetők belőlük, ugyanakkor nem tégigényesek.

Meg kell említenem még a serológiai mikromódszereket. Legtöbbje a komplemenktötéses reakció új alkalmazásán alapszik. Ezeket a módszereket elsősorban a vírusdiagnosztikában lehet alkalmazni. Itt említem meg a direkt és az indirekt haemagglutinációt, amely módszert újabb adatok szerint, mint igen érzékeny eljárást, a toxinok identifikálásában is jól fel lehet használni.

Rendkívül nehéz problémát jelent a toxinok bekonzentrálása és gyorsdiagnosztikus identifikálásuk. A toxin bekonzentrálásra számos módszert ajánlanak. Egyik legegyszerűbb eljárás a talcummal való adszorbeálás, amikoris talcumos szűrőpapíron nagymennyiségű toxintartalmú vizet szívnak át és a szűrőpapírról 3—4 ml fiziológiás vízben lemosott talcummal, amely a vízben levő toxinféhrjét adszorbeálja, kísérleti állatot oltanak és elvégzik a közismert egérvédési próbát.

A különösen veszélyes fertőző betegségek gyorsdiagnosztikus módszereire vonatkozóan nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Itt csak utalni szeretnék az „Utasítás a tábori mikrobiológiai szolgálat működésére” című segédletre, amelyben a klasszikus módszerek és néhány gyorsított laboratóriumi diagnosztikus módszer szerepel. Ezek a módszerek jól kiegészítik az előbbieken vázolt legújabb vizsgáló methodikákat.

Megemlíteni kívánom az ún. rövidített séma szerinti vizsgáló eljárást, amely megnyugtató módon képes identifikálni a pestis, cholera, anthrax és a botulizmus kórokozóit. A bővített séma szerinti vizsgálat viszont alkalmas számos baktériumfélése, rickettsiák, néhány fontosabb vírus és a botulinus toxin identifikálására. Célszerűnek látszik mind a két sémát továbbfejleszteni és az újabb gyorsdiagnosztikus eljárásokkal kiegészíteni, ami a vizsgálatokat gyorsabbá, egyszerűbbé és pontosabbá teheti.

Nem beszéltem még a phagok felhasználásának lehetőségeiről a bakteriológiai diagnosztikában. Különösen enterális kórokozó típus specifikus phagjai alkalmasak diagnosztikai célokra, azon egyszerű elgondolás alapján, hogy olyan közegben, amelyben sok az ismert phagtípusnak megfelelő bakté-

rium, a kérdéses phagtípus lényegesen gyorsabban szaporodik el. A phagok gyors elszaporodása Plaque módszerrel ellenőrizhető.

A Szovjetunióban kidolgozták az anthrax gyorsdiagnosztika egyik módszerét. A módszer lényege az, hogy a kevert tenyészetet húsos pepton agarra oltják. A gyanús izolált telepet húsos pepton bouillonban szaporítják el. 3 óras inkubáció után a tenyészetet penicillin tartalmú agarra oltják, ugyanilyen agarra kontrollként bacillus anthracoidest oltanak le. Ezután thermostátban 3 órán keresztül inkubálják a két tárgylemezre rávitt vékony agarlemezre. Inkubáció után a penicillintartalmú agarlemezeket mikroszkóp alá helyezik s ha a gyanús izolált telep valóban anthrax volt, a mikroszkóp alatt involúciós, illetve szétesett formákat lehet látni, míg a bacillus anthracoides kontroll, amely penicillin resistens, streptobacillus formájában nő.

Amint már említettem, biológiai ágensként felhasználhatók fertőzött rovarok is, amelyek hosszú időn keresztül fertőző forrásként szerepelhetnek. Számos adat alapján ismeretes, hogy ezek a rovarok rezistensekké tehetőek többféle ismert rovarirtó szerrel szemben s a rovarok ezen tulajdonságukat több generáción keresztül megtarthatják. Ha alapos gyanú merül fel, hogy biológiai támadás során fertőzött rovarokat is alkalmazott az ellenség, minden esetben célszerű elvégezni a DDT, vagy egyéb rovarirtó szer elleni érzékenységi próbát. Meghatározott arányban acetont és DDT-t elegyítenek, amit vékony kapilláris csővel visznek rá a begyűjtött rovar kutikulájára. Az aceton gyorsan oldja a kutikulát és így a DDT biztosan a szervezetbe jut. A különböző nem rezistens rovarok a rovar fajtától függően néhány órán belül elpusztulnak.

Nem foglalkozhattam a *gombák* és *protozoonok* laboratóriumi diagnosztikájával, mivel nem találtam gyorsdiagnosztikai irodalmi adatokat biológiai támadás esetére. Néhány cikk, amelyben a gombák immunofluorescens diagnosztikájával foglalkoztak, az eredmények értékelése alapján nem bizonyultak meggyőzően specifikusnak, a számos serológiai keresztreakció miatt, amely egymástól rendszertanilag távolos gombafajták között is fennáll. Ezen a területen ma még a hosszú időt igénylő tenyésztési és allergiás próbáknak van jelentőségük. Külön említést érdemelnek az egyes *allergiás próbák*, amelyek, ha nem is szolgálnak gyorsdiagnosztikus célokat, mégis jól alkalmazhatók a mikrobiológiai diagnózis megerősítésére. Ezen próbáknak jelentőségük lehet elsősorban tájékozódás és adatgyűjtés szempontjából olyan esetekben, amikor háborús körülmények között, hadifoglyokon elvégezve bizonyos allergiás próbákat, tájékozódást sikerül nyerni az ellenség által foganatosított oltások milyenségéről. Ugyanilyen jellegű tájékozódást nyújthatnak bizonyos serológiai próbák is.

Összefoglaló munkámban nem törekedhettem teljességre, csupán vázolni szerettem volna azokat az újabb direkt és indirekt vizsgáló módszereket és eszközöket, amelyek ismerete és a legfontosabb eszközök birtoklása egy modern háború esetén szükségesnek látszik. Az elmondottakból az is kiderül, hogy ma még egyrészt nincsen olyan vizsgáló eljárás, amely általános érvénnyel alkalmas lenne a biológiai fegyver megnyugtató kimutatására, másrészt az összes eljárások, amellelt, hogy speciális eszközöket és anyagokat igényelnek, a mikroorganizmusok csupán egy-két tulajdonságát mutatják meg, így a biológiai fegyver kimutatására csak részben alkalmasak.

A diagnosztikus módszerek részletesebb áttanulmányozása után meggyőződésem, hogy a mikroorganizmusok sokfélesége miatt csak egy párhuzamosan elvégezhető vizsgáló rendszer kidolgozása visz közelebb a diagnosztikus problémák gyors megoldásához. Egy ilyen diagnosztikus rendszer kidolgozása egy specialistákból álló munkacsoport feladata lehet.

Befejezésül meg kell említenem még, hogy némely fertőző betegség a rövid inkubációs ideje, vagy pl. a botulinus toxin esetében a kettő-hat óráig terjedő lappangás kizarja annak lehetőségét, hogy laboratóriumi diagnózist lehessen adni. Ilyen esetekben a klinikai tünetek és a kórboncolási lelet nyújthat támpontot a további vizsgálatok számára.

IRODALOM:

1. *Hagemann, V.*: Gerl. Beiter. z. Geophys. 1936. 46. 261. — 2. *May, K.*: R. J. Scient. Instrumenti. 1945. 22. 10. 127. — 3. *Guyton, A.*: S. J. Int. Hyg. Tox. 1946. 23. 133. — 4. *Collins, W., Kipling, C.*: J. Appl. Bact. 1957. 20. 2. 257. — 5. *Stickland, L.*: H. J. Gen. Microb. 1951. 4. 5. 698. — 6. *Hollaender, A., Dalla, Valle.*: J. M. Pub. Health Rep. 1939. 54. 14. 574. — 7. *Anderson, A.*: A. J. Bact. 1959. 76. 5. 471. — 8. *Bourdillon, R. B., Lidwell, O. M., Schister, E.*: Studies in Air Hygiene. 1948. 262. 12. — 9. *Mitchell, R. B., Fulton, J. D., Ellingson, A. V.*: Am. J. Pub. Health. 1954. 44. 10. 1334. — 10. *Mansberg, H. P.*: Science. 1957. 126. 3278. 823. — 11. *Lyntov, V.*: Acta Path. et Microb. Scand. 1954. 35. 4. 370. — 12. *Boroff, D., Fitzgerald, J.*: Nature. 1958. 181. 4611. 751. — 13. *Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, B. N., Berlinger, E. J.*: Immunol. 1942. 45. 3. 159. — 14. *Geck P., Szántó R.*: Honvédervos. 1961. 4. — 15. *Stevenson, H. J. R., Levine, S.*: Science. 1952. 116. 705. — 16. *Williams, E. G., Ingraham, S. G.*: Pub. Health. Rep. 1956. 71. 2. 173. — 17. *Marder, B. B.*: Voenna Med. Zs. 1957. 11. — 18. *Sordelli, Amzullo.*: J. Amer. Med. Ass. 1938. 954. — 19. *Thiry L.*: Honvédervos. 1960. 4. 43. — 20. *Simon M.*: Honvédervos. 1959. 4.

Подполковник вет/сл. д-р П. Гек:

СПОСОБЫ ПРЯМОГО И НЕПРЯМОГО ВЫЯВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Dr. P. Geck, Veterinär-Oberstl.:

DIREKTE UND INDIREKTE NACHWEISVERFAHREN BIOLOGISCHER AGENTEN