

Подполковник мед. службы д-р М. Шимон:

ПРИВИВКИ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Последовательное выполнение программы вакцинации в армии предоставляет лучшую возможность для защиты в борьбе против ряда инфекционных заболеваний и обеспечивает сохранение военного потенциала. До сих пор достигнутые результаты вакцинации убедительно подтверждают возможность почти полноценного предупреждения большинства опасных заболеваний, как например оспы, сыпного тифа, желтой лихорадки среди заболеваний, вызванных вирусами и риккетсиями.

Dr. M. Simon, Oberstl. d. Med. D.:

SCHUTZIMPFUNGEN ZUR PROPHYLAXE DER VIRUSKRANKHEITEN

Eine konsequente Durchführung des Impfprogramms der Armee bietet die beste Abwehrmöglichkeit bei der Überwindung sehr vieler Infektionserkrankungen, sowie ersichert das Erhalten des Militärpotentials. Die bisherigen Impferfolge beweisen überzeugend dass der grösste Teil der gefährlichen Erkrankungen, dazwischen einige Virosen und Rickettsiosen, wie die Pocken, der Typhus exanthematicus, das Gelbfieber usw. mit Schutzimpfungen zumeist überwindet werden können.

A fágítteremelkedés reakciójának elve és alkalmazása a bakteriológiai diagnosztikában

Írta: **Biró György** dr. orvosőrnagy,
az orvostudományok kandidátusa

A kórokozó baktériumok kitenyésztése és azonosítása a különböző vizsgálati anyagokból hosszadalmas és nemegyszer eredmény nélküli munka. Ezért fordítanak a kutatók komoly érdeklődést olyan módszerekre, melyek tiszta baktériumtenyésztés előállításával nélkül mutatnak rá egyik, vagy másik baktérium jelenlétére. Több oldalról igyekeztek megközelíteni a feladat megoldását. Ezek között az eljárások között szerepel a *fágítteremelkedés reakciója* is (továbbiakban: FTER).

A módszert először a harmincas évek végén *Szergienko* kísérte meg alkalmazni. Közleménye azonban feledésbe merült és csak 1951-ben jelent meg hasonló jellegű közlemény *Katznelson*, majd *Katznelson* és *Sutton* munkája alapján. Ezek a vizsgálatok azonban nem emberi kórokozókra, hanem növénypatogén baktériumokra vonatkoztak. Eredményeikből kiindulva az eljárást azóta is alkalmazzák a bakteriális eredetű növényi betegségek felismerésére. Az enterális megbetegedések diagnosztikájába a FTER-ját *Timakov* és *Goldfarb*, valamint *Sechter* széles körű vizsgálatai alapján vezethették be nagyobb mértékben. Ekkor kerülhetett tisztázásra a reakció elvégzésének elve és pontos metodikája. Munkásságuk nyomán számos szerző foglalkozott a FTER alkalmazásának különböző lehetőségeivel.

A FTER egyes bakteriofágok szigorú specificitásán alapul. Ezek a fágok csak a homológ baktérium törzseken képesek sokszorozódásra. Ezért a reakció

elvégezését a vizsgálati anyag kísérő baktériumflórája nem befolyásolja. A megfelelő inkubációs idő elteltével az eredetinel magasabb koncentrációban visszanyert fág a homológ baktérium jelenlétét bizonyítja a vizsgálati közegben. Ez az egyszerűnek látszó elv azonban számos, megválaszolásra váró kérdést vet fel.

1. Az „indikátor” bakteriofágok kiválasztása.

A FTER-hoz alkalmazott fágoknak szigorúan specifikusaknak, magas adszorpciós készségűeknek, rövid latencia idejűeknek és magas fághozamúaknak kell lenniök. Csak ezek alkalmazhatók az eljárás során indikátor fágként.

A fágok *specifitása* csak számos, esetleg több száz baktérium törzsön való vizsgálattal tisztázható. A specifikusnak tekinthető fág csak a kiszemelt baktérium törzset lizálja és ugyanakkor annak összes típusára, változatára (pl. különböző lizotípusok, szerológiai, vagy biokémiai variánsok) hatékony. Ez a követelmény nem mindig teljesíthető egyetlen fágtörzssel, hanem szükség lehet több fágtörzs keverékének alkalmazására, melyek egymást kiegészítve képesek a kívánt hatást létrehozni. A vizsgálat céljára természetesen csak virulens, azaz hatásuk eredményeként tarfoltot létrehozó fágok alkalmasak.

A fágok a gazdasejt felületén részben aspecifikus, részben specifikus hatások eredményeként adszorbeálódnak. Ennek létrejöttével megnyílik a lehetőség a fág genetikus anyagának a baktériumba való injiciálására. Az adszorpció számos tényező (a gazdasejt milyensége, állapota, táptalaj, hőmérséklet, pH, mennyiségi viszonyok, adszorpciós kofaktorok) függvénye, de egyik oldalról nyilvánvalóan a fág adszorpciós képessége által jellemzett. Az a fágtörzs lesz a FTER céljára alkalmasabb, mely azonos, egyébként optimális körülmények között a rövidebb idő alatt nagyobb egyedszámban adszorbeálódik. Az adszorpció néhány perc alatt zajlik le. Az adszorpció sebességének konstansa (K), mely jellemző a különböző fágtörzsekre, az alábbi egyenlet szerint kísérletileg meghatározható:

$$K = \frac{2,3}{B \cdot t} \times \log \frac{P_0}{P}$$

ahol B = baktériumkoncentráció, P_0 = fágkoncentráció 0 időpontban, P = a t idő alatt nem adszorbeálódott fágok koncentrációja. A K dimenziója cm^3/min , nagyságrendje 10^{-10} körül mozog.

A fág genetikus anyagának a gazdasejtbe való bejutásától a baktérium pusztulásáig, azaz érett fág-részecskék újbóli megjelenéséig telik el a latencia idő. Ekkor zajlik le — a fáganyag hatására — a baktérium enzimrendszerének olyan átállítódása, hogy a sejten belül többé nem baktériumanyag, hanem fág-szintézis folyik és ennek eredményeként először éretlen „fág-prekurzorok”, vegetatív fág-részecskék, majd érett fágok jelennek meg. Ez utóbbival együtt jár a gyakran előzetesen felpuffadt gazdasejtnak a másodperc töredéke alatt történő gyors szétrobbanása. A latencia idő az ún. egy lépéses kísérletben (one step growth) meghatározható. A latencia idő általában 10–60 perc.

A gazdasejtbe bejutott egy vagy legfeljebb néhány fágból a baktériumtest szétesése után 30–40–100, vagy még több érett, fertőzőképes fág alakul ki. Ezt nevezik fághozamnak. A rövidebb latencia idejű és magasabb hozamú fágok azért felelnek meg jobban a reakció céljára, mert intenzívebbé, gyorsabbá teszik a reakciót, könnyebbé az értékelést. Mivel pedig a nagyobb számú infekcióképes részecske a vizsgálat inkubációs ideje alatt nagyobb számú homológ baktériumon adszorbeálódhat, ill. sokszorozódhat meg, fokozódik a pontosság.

2. A FTER-jának módszere.

A reakció kivitele a következő alapelveken nyugszik:

a) A vizsgálandó anyag bevitele olyan közegbe, mely kedvező a fágthatás létrejöttére. E célra folyékony táptalajt alkalmaznak, legtöbbször a szokásos, esetleg különböző tápanyagokkal feljavított bouillont. Szükség lehet az elegy külön pufferezésére is, főleg akkor, ha a vizsgált anyag a pH-t savanyú irányba tolja el, amely kedvezőtlen a fágthatásra. Ebbe a folyékony táptalajba viszik be a szilárd vizsgálati anyagot eldörzsölve, szuszpenzió formájában, 10—20%-nyi mennyiségben, folyékony anyagot úgy, hogy a táptalaj ne híguljon fel túlságosan (esetleg dupla bouillont lehet használni). Membránfilteres víz, vagy levegő vizsgálatnál annyi bouillont öntenek a filterlapra, hogy azt jól ellepje. Egyidejűleg két azonos vizsgálati lombikot, vagy kémcsövet készítenek minden vizsgálandó anyagból.

b) Az egyik vizsgálati edénybe adagolják az *indikátor fág* megfelelő mennyiségét. Ez két szempontból is megfontolást érdemel:

— minél kevesebb a bejuttatott fág mennyisége, annál kisebb a valószínűsége annak, hogy a fág a vizsgálati anyagban levő csekély számú baktériummal, melyen megsokszorozódása létrejöhet, találkozzék, tehát pozitív reakciót kapjunk,

— ha pedig túlságosan sok fágot adagolunk az elegyhez, akkor egy baktériumon nagyon sok fág adszorbeálódhat és ennek eredményeként a baktériumtest feloldódhat a fág multiplikálódása nélkül (lysis from without).

A különböző szerzők által az eltérő tulajdonságú indikátor fágtörzsek számára javasolt mennyiség 10^2 — 10^5 nagyságrendű részecske szám a vizsgálati elegy egy ml-ében.

c) A másik vizsgálati edény a *szabad fágok* kimutatására szolgál. A vizsgált anyagban ui. lehetnek — bár tapasztalat szerint ritkán — a fágthatás kimutatására használt baktériumtörzset oldó fágok olyan mennyiségben, hogy a reakció leolvasását, értékelését zavarhatják. Ennek kizárására szükséges a szabad fág tartalmat meghatározni.

d) Az *indulási fágszám* meghatározása, szilárd táptalajon, a szokásos módszerekkel. Előtte a vizsgálati elegyet olyan mértékben szükséges hígítani, hogy a lemezen a tarfoltok jól számolhatók legyenek.

e) Az indikátor fágot és a szabad fág kontrollt tartalmazó edények *inkubálása* 37 C°-os termosztátban. Az inkubáció ideje néhány órától egy napig terjedhet. Ennek az időtartamnak növelése emeli a reakció érzékenységét, mert a kimutatandó baktérium is szaporodásnak indul, nagyobb a lehetőség a fág részecskével való találkozásra és a több, fágthatásnak kitett baktérium több fágot is képes együttvéve produkálni. Alacsonyabb kiindulási fágszám esetében is célszerű az inkubációs időt megnyújtani, hasonló okból. Tapasztalatunk szerint 10^2 /ml fágszám mellett 20—22 órás inkubáció optimális és biztosítja a maximális érzékenységet.

f) A *kísérő baktériumflóra előlése* céljából mindkét anyagot az inkubáció után centrifugálják és 58 C°-os vízfürdőn kezelik 30 percig. A centrifugálás esetleg elhagyható.

g) A *fág mennyiségi meghatározása* az indulásnál alkalmazott módszerrel és ugyanolyan, ill. nagyobb hígításban. Hasonlóan vizsgálják a szabad fág tartalmat is. Amennyiben ez utóbbi zavaró mennyiségben nincs jelen, a reakciót pozitívnak akkor tekintik, ha a fágszám a kiinduláshoz képest lényegesen emelkedett. Ez — a kísérleti hibák okozta hamis pozitív eredmények kizárására — általában legalább háromszoros legyen. Vizsgálataink szerint

azonban a fágyszám emelkedés pozitív esetben mindig ennek többszöröse: tízszeres-százszoros vagy/ több.

Goldfarb és munkatársai beszámolnak arról, hogy sikerült a szabad fágot a vizsgálati anyagból az eljárás megkezdése előtt megfelelő adszorbensek alkalmazásával teljesen eltávolítani. Ily módon ez a zavaró körülmény megszüntethető.

3. A FTER-jának alkalmazási lehetőségei.

A FTER elvileg minden olyan baktérium kimutatására alkalmas, amellyel szemben aktív fágot izolálni, vagy adaptálni sikerül. A kutatások leginkább a salmonellák és shigellák kimutatására irányultak, de beszámolnak jó eredményekről a pestis és kolera kórokozójának kimutatásában is. Kevésbé alkalmas az eljárás a brucellák diagnosztizálására. Ez részben a gazdasejt különleges biológiai tulajdonságainak, részben a gyengén aktív fágoknak tudható be.

Az említett kórokozók székletből, vérből, vizeletből, vízből, élelmiszerből stb. egyaránt kimutathatók. A reakció érzékenysége magas: vízből egy baktérium/ml már biztosan kimutatható, élelmiszernél 10^1 – 10^2 baktérium/g, székletnél 10^4 – 10^5 /g a határérték. Ugyanakkor a szokásos bakteriológiai módszerekkel 10^5 – 10^6 /g nagyságrendű kórokozó szám nem mindig mutatható ki, a hapténes gyors módszer határa pedig 10^6 – 10^7 /g csíraszámánál van. Ezenkívül a kórokozók biokémiai, tenyésztési és bizonyos mértékig szerológiai tulajdonságai is megváltozhatnak a vizsgálati anyagban, főleg ha — amint gyakori — hosszabb idő telik el a mintavétel és a feldolgozás között. A FTER ilyenkor is megőrzi határozott pozitivitását (*Goldfarb, Osztrovszkaja*).

A FTER érzékenysége a vizsgálati anyagon kívül a kimutatandó kórokozónak is függvénye: pl. salmonelláknál kissé magasabb, mint shigelláknál.

Különösen előnyösen alkalmazható a FTER ott, ahol az előzetes antibiotikum adagolás a kórokozó kitenyésztését zavarja (*Sztrongorszkaja*).

Kozelko szerint a FTER kiválóan alkalmas fertőzött területen a fertőtlenítés eredményességének, hatásfokának ellenőrzésére: hatékony fertőtlenítés esetén a környezet tárgyai mosófolyadékának pozitív FTER-ja megszűnik. *Donaldson* kiemeli a módszer jelentőségét a biológiai fegyver kimutatásában.

A FTER elvégzésének ideje a fág sokszorozódásánál használt inkubációs időtől függ. A legmagasabb érzékenységet jelentő 20 órás inkubáció mellett 25–27 óra alatt kapható meg a végleges eredmény. Az inkubációs idő csökkenthető, ha várhatóan magas a kimutatandó baktériumok száma a vizsgálati közegben. Ilyenkor már 10–12 óra alatt megvan az eredmény. Esetleg beállítható több, párhuzamos vizsgálat is, különböző inkubációs időkkel. A rövidebb inkubáció melletti negativitás nem zárja ki azt, hogy hosszabb inkubációval pozitív eredmény mutatkozhat.

4. A FTER alkalmazásának korlátai.

A reakció a vizsgálandó baktériumtörzs fágérzékenységéhez kötött. Ha a vizsgálati anyagban levő baktériumtörzs az alkalmazott fággal szemben rezisztens, hamis negatív eredményt kapunk.

A vizsgálati anyagban nem specifikus, fágot adszorbeáló ágensek lehetnek, amelyek a reakció lefolyását zavarják, ill. értékelését lehetetlenné tehetik. Nagyszámú homológ, de elpusztult baktériumon is adszorbeálódhatnak a fágok, melyek ily módon hatástalanává válnak.

A reakció élő, szaporodó homológ baktériumok jelenlétében zajlik le. A vizsgálandó anyag tárolási időtartamával fordított arányban változik a FTER pozitivitása, bár kétségtelenül kisebb mértékben, mint a klasszikus bakteriológiai módszereké.

Bizonyos kémiai anyagok is csökkentik a fághatást. Ez azonban a táptalaj összetételével bizonyos mértékig blokározható: pl. az indol hatása triptofánnal, a nehézfémeké peptonnal.

Széleskörű diagnosztikai munka végzéséhez nagyszámú indikátor fág-törzsrre van szükség. Ezeknek és megfelelő baktériumtörzseiknek fenntartása munkaiigényes feladat, tehát csak nagyobb laboratóriumokban célszerű.

A FTER nem teszi lehetővé finomabb bakteriológiai analízis elvégzését és ezért nem mindig hatékony a járványügyi kutatás céljára akkor, ha egyidejűleg nem történt meg a kórokozó törzs kitenyésztése. Ugyanakkor azonban a korai, megbízható eredmény megadásával hasznos segítőtársa az epidemiológusnak.

A pozitív reakció, a kórokozó kitenyésztése nélkül is, határozottan és egyértelműen a homológ baktérium jelenlétét mutatja.

IRODALOM

- Birzu, A.*: Primul simposion de microbiologie alimentelor, Bucuresti. 15—16 mai 1959. — Soc. stiintelor Med. Din. R. P. R. Fil. Bucuresti. 1959. — *Birzu, A.*: A fagtitler emelkedésének meghatározása, mint a tífusz bacilus élelmiszerekből való kimutatásának módszere. Előadás. Magy. Hyg. Társ. 1959. szept. 11. — *Bogomolov, B. P.*; *Boriszova, K. P.*; *Dedova, T. A.*; *Filkina, N. V.*: Gig. i szan. 27. 56. 1962. — *Dianova, E. V.*; *Vorosilova, A. A.*; *Gig. i szan. 5. 35. 1954.* — *Donaldson, A. W.*: Nonmilitary defense. Advances in chemistry series 26. Am. Chem. Soc. Washington. 1960. — *Gicsevics, M. A.*; *Bojarsinova, K. P.*; *Kremencsuk G. A.*: ZsMEI. 32. N° 3. 43. 1961. — *Goldfarb, D. M.*; *Kuznyecova, V. N.*; *Osztrovszkaja, E. S.*: ZsMEI. 31. N° 3. 36. 1960. — *Goldfarb, D. M.*; *Osztrovszkaja, E. Sz.*: ZsMEI. 28. N° 5. 17. 1957. — *Herčik, F.*: Biophysik der Bakteriophagen. VEB Verlag der Wissensch. Berlin. 1959. — *Kacitadze, G. K.*: ZsMEI. 40. N° 2. 28. 1963. — *Kambaratov, P. I.*: ZsMEI. 40. N° 6. 40. 1963. — *Katznelson, H.*: J. Publ. Hlth. 42. 69. 1951. — *Katznelson, H.*; *Sutton, M. D.*: J. Bact. 61. 684. 1951. — *Kozelko, O. A.*: ZsMEI. 32. N° 2. 36. 1962. — *Kulikova, E. N.*; *Bajman, E. I.*; *Kuzmina, Ju. T.*; *Blinova, L. L.*: ZsMEI. 40. N° 6. 131. 1963. — *Leonescu, M.*; *Horodoiceanu, Th.*: Microbiol. Parazitol. Epid. (Bucuresti) 6. 271. 1961. — *Sechter, I.*: Ac. R. P. F. Fil. Iasi. Stud. si Cerc. Stiintifice. Anul. VI. N° 3—4. 99. 1955. — *Sechter, I.*: *Ibid.* VIII. No 1. 155. 1957. — *Sneiderman, V. E.*: ZsMEI. 40. N° 2. 25. 1963. — *Szergienko, F.*: Zbl. Bakt. I. Ref. 127. 334. 1937. — *Sztrongorszkaja, N. V.*: ZsMEI. 40. N° 2. 25. 1963. — *Timakov, V. D.*; *Goldfarb, D. M.*: Vesztn. Ak. Med. Nauk. 11. N° 2. 28. 1956. — *Timakov, V. D.*; *Goldfarb, D. M.*: Českoslov. Epid. Mikrobiol. Immunol. VIII. 361. 1959.

Майор мед. службы д-р Д. Биро:

ПРИНЦИП ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЕАКЦИИ УВЕЛИЧЕНИЯ ТИТРА ФАГА

Dr. Gy. Biró, Major d. Med. D., Kandidat d. Med. Wissensch.:

ÜBER GRUNDLAGEN UND ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER PHAGTITERERHÖHUNGSREAKTION