

Magyar Néphadsereg Egészügyi Szolgálata,
Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest

Dr. Geck Péter állatorvos alezredes

Az immun-tusreakció és a tenyésztéses módszer összehasonlító vizsgálata kórokozó enterális baktériumok gyors kimutatására

A korszerű bakteriológiai diagnosztikában állandó jellegű törekvés a diagnosztikus módszerek egyszerűsítése és gyorsítása, valamint érzékenyséjük és specifitásuk emelése. A metodológia ez irányú fejlesztését jelzik az irodalomból jól ismert expresztesztek, mikrotesztek és immunesztek, amelyek meghatározzák egy mikroba egy, vagy több jól ismert tulajdonságát. A gyorsdiagnosztika alkalmazásának alapvető célja egyrészt a betegfelvétellel egy időben a kórokozó ágens identifikálása, másrészt fertőzéses eredetű tömeges megbetegedéskor a kórokozó meghatározása egy-két órán belül.

Ismerve az immunfluorescens technika elterjedését gátló objektív nehézségeket, célul tűztük ki egy egyszerű, olcsó, gyors és az immunflorescens technika érzékenységeivel és specifitásával rendelkező új módszer kidolgozását.

Sok éves, nagyon sok irányban folytatott kísérletezés után dolgoztuk ki az immun-tusreakciót, amely saját gyakorlatunk és mások tapasztalata szerint, megfelel minden olyan követelménynek, amely egy gyorsdiagnosztikus módszerrel szemben támasztható.

Eszközök és módszerek

Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagunk tenyésztéssel ellenőrzött negatív széklethez kevert, 10^3 -tól 10^9 -ig terjedő *Escherichia coli dyspepsiae* 026:B6, 055:B5, 086:B7, 0111:B4, 0112:B11, 0119:B14, 0124:B17, 0125:B15, 0126:B16, 0127:B8, 0128:B12, ezenkívül *Shigella flexneri* 2a, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* 2, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella typhi* murium, *Salmonella*

typhi. A negatív székletek borsónyi mennyiségét 3 ml. fiziológias konyhasóoldatban szuszpendáltuk, majd kézi centrifugával 1 percre ülepítettük. A széklet felülúszójából 1—1 ml-t Wassermann-csővekbe mértünk, amelyekhez *ana* mennyiségben hozzámértük a fent felsorolt baktériumok ferde agarról lemosott szuszpenzióját úgy, hogy az első csőben 10^3 -on, az utolsóban 10^9 -en sűrűségű baktériumsuszpenzió volt.

Tenyésztés

A kórokozó baktériumok identifikálását az Országos Közegészségügyi Intézet Bakteriológiai Osztályán elfogadott módszerekkel végeztük (1). Naponta 16 anyagot vizsgáltunk meg úgy, hogy a frissen fertőzött széklet-suszpenziót azonnal kikentük a megfelelő táptalajokra.

Az immun-tusreakció (ITR)

A vizsgálati anyag előkészítése

Modell kísérleteinkben a fent leírt székletsuszpenziót használtuk kenet készítésére. Ugyanígy készítjük elő a vizsgálati anyagot akut enterocolitis esetén is, amikor várhatóan 10^5 — 10^7 — csira per ml található a vizsgálati anyagban. Ismételt vizsgálatoknál vagy bizonytalan enteritis esetén célszerű a szedimentált felülúszót 3000 rpm-el 30 percre centrifugálni és ennek szedimentumát használni kenet készítésére, mivel várhatóan kevés a kórokozó mikroba a vizsgálati anyagban.

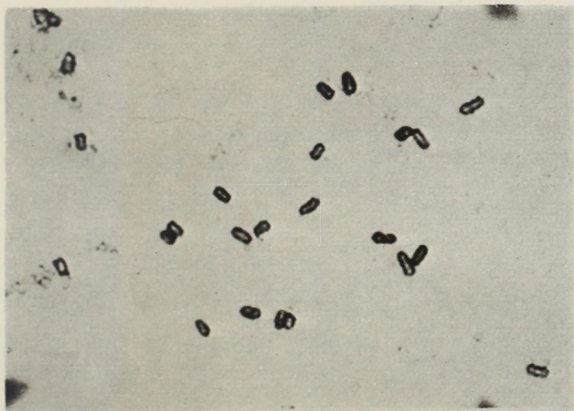
Kenetkészítés

Zsírtalanított tárgylemezre kacsnyi mennyiséget szélesztünk az ülepített széklet felülúszójából vagy a felülúszó lecentrifugált szedimentumából. A keneteket szárítás után hővel fixáljuk. Várhatóan alacsony csíraszám esetén keneteket úgy is készíthetünk, hogy a tárgylemez középső alsó részére borsónagyságú pontot rajzolunk kék dermatográfal, majd az ellenkező oldalra kacsnyi mennyiséget viszünk a széklet-suszpenzióból pontosan a kék pont fölé, de nem szélesztjük el. Szárítás után hővel fixáljuk.

Diagnosztikus savók munkahígítása

A diagnosztikus savók munkahígítását úgy kell elkészíteni, hogy az háromszor töményebb legyen a tárgylemez-agglutinációhoz használt titermél. A savók hígítását 0,5%-os karbolsavat tartalmazó fiziológias konyhasóoldattal célszerű végezni. Kivételt képez a *Salmonella polyvalens* „0”-savó, amelyet egyenlő mennyiségben hozunk össze a fenti konzerváló oldattal. A módszer érzékenysége és specificitása nagymértékben függ az immun-savók minőségétől, ezért igen fontos az immun-savók természetes és részantigén-ellenanyagtartalmának kimerítése az aspecificus kötések elkerülése végett. Minden savó munkatiterét tova futó hígítással kell meghatározni.

A vizsgálat irányától függően annyi tárgylemezen készítünk kenetet, ahány diagnosztikus savót tervezünk alkalmazni. Minden tárgylemezre ráviszünk egy-egy csepp folyékony kínai Holló-tust (Politur és Vegyitermék, Budapest), majd a megfelelően hígított savókból teszünk egy-egy cseppet a keneteken levő tusra. Ezután szélesztő kaccsal egyenletesen elkeverjük a tust és az immunsavót, vigyázva arra, hogy a különböző savók ne keveredjenek. Ügyelni kell a tárgylemezek vízszintes elhelyezésére is, mert ha a kenetről lefolyik a tus, a kenet nem bírható el. A keneteket öt percig kezeljük Petri-csészéből kialakított nedves kamrával leborítva, szobahőmérsékleten. A kezelt kenetek lemosására 0,3%-os konyhasóoldatot használunk, amelyet úgy készítünk, hogy a desztillált vízből készített fiziológiás konyhasóoldatot másfélszeresére hígítjuk csapvízzel. A csapvízzel szembeni követelmény az, hogy emberi fogyasztásra alkalmas legyen, melynek sódatösszetétele bizonyos szélsőséges értékek között állandó. Magyarország legkülönbözőbb ivóvizeiből készített lemosófolyadékok egyformán jól használhatók.



1. ábra

Lényeges, hogy a lemosófolyadék pH-ja 7 legyen, amelyet Univerzál indikátorpapírral ellenőrzünk. Amennyiben a lemosófolyadék pH-ja 7 alatt van, akkor 5%-os nátriumkarbonáttal pH 7-re állítjuk. A lemosófolyadék sókoncentrációjától és a pH-tól függ a kép minősége, ezért a megadott receptúrától nem célszerű eltérni. Amennyiben a fenti lemosófolyadékkal nem kapunk egyértelműen pozitív képet, úgy 1%-os ferriklorid-oldatból 0,1 ml-t hozzámérünk s alaposan elkeverjük a lemosófolyadékban. Erre a korrekcióra általában akkor van szükség, ha artézi vízből készül a lemosófolyadék.

A lemosást gumiballonral ellátott 10 ml-es, széles lumenű pipettával végezzük úgy, hogy a mosófolyadékot középerős nyomással irányítjuk a ferdén tartott tárgylemezre. Lényeges, hogy a vízszög a lefolyó tust fentről lefelé folyamatosan kövesse és hogy szemmel láthatóan kicsapódott tus

ne maradjon a keneten. Szűrőpapírral történő leitatás után a keneteket fénymikroszkópban immerziós objektívvel, kb. 800-szoros nagyítással vizsgáljuk.

Elbírálás

Poszítív a kenet, ha a várható nagyságrendű és morfológiájú baktériumok kontúrja határozottan fekete rajzolatú, ezenbelül a baktériumtest hamuszürke színű, tehát homológ kötés jött létre. Ez a fekete kontúr megegyezik azzal a fluoreszkáló kontúrral, amely a fluorescens mikroszkópban látható homológ kötés esetén. Negatív a lelet abban az esetben, ha több látóteret átvizsgálva baktériumképletek nem láthatók, csupán különböző rajzolatú tusszemcse-maradékok és aggregátumok, amelyek nem téveszthetők össze a homológ kötésekkel. (1. sz. kép.)

A homológ diagnosztikus savók gyakran tartalmaznak természetes elenanyagot coccusokkal, aerob és anaerob spórás baktériumokkal szemben.

Amennyiben a vizsgálati anyagban a fenti mikróbák jelen vannak, aspecifikus kötések alakulnak ki, de ezek morfológiájuk és nagyságrendjük alapján könnyen elkülöníthetők a bélbaktériumoktól.

Eredmények

Megvizsgáltunk 1320 db mesterségesen fertőzött székletet, amelyek csíraszámát 10^3 -tól 10^9 -ig állítottuk be, azzal a céllal, hogy a párhuzamos tenyésztéses eredményeket összehasonlítsuk az immun-tusreakció érzékenységgel és specifitásával.

Az *Escherichia coli dyspepsiae* vizsgálatára 690 db székletből 555 (80,4%) volt mindkét eljárással pozitív. Immun-tusreakcióval pozitív, de tenyésztéssel negatív 72 db (10,5%) széklet volt, míg csak tenyésztéssel pozitív, de immun-tusreakcióval negatívnak bizonyult 8 db (1,2%) széklet. Mindkét eljárással negatív eredményt kaptunk 55 db (7,9%) biztosan pozitív székletből, ami zömmel a 10^3 – 10^4 csíraszámú székletmintákra volt jellemző (1. sz. táblázat).

1. táblázat

Tenyésztés és immun-tusreakció összehasonlító vizsgálata *E. coli dyspepsiae* (10^3 – 10^9) kimutatására modellkísérletekben

Tenyésztés \ ITR	Pozitív	Negatív	Összesen
	Pozitív	555 (80,4%)	8 (1,2%)
Negatív	72 (10,5%)	55 (7,9%)	127 (18,4%)
Összesen	627 (90,8%)	63 (9,2%)	690 (100%)

A fentiekhez hasonló módon megvizsgáltunk 280 db székletet, amelyeket *Shigella flexneri* 2a-val és *Shigella sonnei*-vel fertőztünk. 219 széklet (78,2⁰/₀) mindkét eljárással pozitívnak bizonyult (2. sz. táblázat).

2. táblázat

Tenyésztés és immun-tusreakció összehasonlító vizsgálata *Shigella flexneri* és *Shigella sonnei* (10³—10⁹) kimutatására modellkísérletben

ITR \ Tenyésztés	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	219 (78,2%)	6 (2,2%)	225 (80,4%)
Negatív	28 (10%)	27 (9,6%)	55 (19,6%)
Összesen	247 (88,2%)	33 (11,8%)	280 (100%)

Immun-tusreakcióval pozitív, de tenyésztéssel negatív volt 28 db széklet. Tenyésztéssel pozitív, de immun-tusreakcióval negatívnak találtunk 6 db székletet (2,3⁰/₀). Mindkét eljárással negatív volt 27 db széklet (9,6⁰/₀).

A salmonellák kimutathatóságának ellenőrzésére feldolgoztunk 350 db székletet. Három különböző csoportba tartozó salmonella-szerotípussal fertőztük a székleteket, ezek ellenőrzésére a *Salmonella polyvalens* „0”-savót és a megfelelő csoportsavókat használtuk. Mindkét módszerrel pozitív volt 223 db széklet (63,7⁰/₀). Immun-tusreakcióval pozitív, de tenyésztéssel negatív 16 db (4,6⁰/₀) széklet volt. Tenyésztéssel pozitív, de immuntusreakcióval negatív volt 18 db széklet (5,1⁰/₀). Mindkét módszerrel negatívnak bizonyult 93 db széklet (26,6⁰/₀) (3. sz. táblázat).

3. táblázat

Tenyésztés és immun-tusreakció összehasonlító vizsgálata *Salmonella* (10³—10⁹) kimutatására modellkísérletben

ITR \ Tenyésztés	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	223 (63,7%)	18 (5,1%)	241 (68,8%)
Negatív	16 (4,6%)	93 (26,6%)	109 (31,2%)
Összesen	239 (68,3%)	111 (31,7%)	350 (100%)

Az immun-tusreakció alkalmazása sokéves tapasztalatunk szerint egyszerű, gyors, olcsó és megbízható eljárásnak bizonyult. Modellkísérleteink beállítással nagyon tárgyilagosan igazoltuk a klasszikus tenyésztés és az ITR helyét és értékét a bakteriológiai diagnosztikában.

Párhuzamosan végzett összehasonlító vizsgálataink azt bizonyították, hogy a székletben levő 10^3 — és 10^4 csíraszámú kórokozó tenyésztéses identifikálásának lehetőségét számos közismert hibalehetőség akadályozza. Ezek közül említésre méltó a vizsgálati anyag levétele és feldolgozása között eltelt idő, a széklet pH-ja és kísérő flórája, specifikus fágok aránya, élő és elpusztult kórokozók aránya, a táptalaj minősége, a feldolgozás módja, az elbírálásban való jártasság stb.

Vizsgálatainkhoz optimális körülményeket biztosítottunk és mégis azt tapasztaltuk, hogy a biztonságos tenyésztés alsó határa az 5×10^4 és 10^5 közötti csíraszám volt. Az ITR aspecifikus kötési lehetőségeinek kiiktatását úgy biztosítottuk, hogy a tenyésztéssel negatív székletmintákkal elvégeztük az ITR-t és csak az így ellenőrzött negatív székleteket fertőztük a fenti kórokozókkal. A táblázatok részletezése nélkül is nyilvánvaló, hogy minden biológiai vizsgáló eljárásnak megvan a módszer jellegéből fakadó hibalehetősége.

Mint minden bakteriológiai szerodiagnosztikus módszernek, így az ITR-nek érzékenysége is attól függ, egyrészt hogy az egységnyi vizsgálati anyagban hány kórokozó mikroba található, másrészt, hogy az alkalmazott immunsavó milyen mértékben típusspecifikus, vagyis milyen mértékben mentes a természetes és a részantigénekkal szemben aspecifikus kötést adó ellenanyagoktól.

Saját kísérleteink is bizonyítják, hogy magastiterű homospecifikus immunsavók alkalmazása lényegesen emeli az ITR érzékenységét és specificitását. Egyes *E. coli dyspepsiae* savók 1:8-as hígítását alkalmazva aspecifikus kötést kaptunk néhány *Streptococcus faecalis* és aerob spórás törzssel szemben, míg ugyanezen székletek vizsgálatakor ugyanezen savók 1:64-es hígításával a fenti aspecifikus kötések nem zavarták az elbírálást.

Számos modellkísérletben és több ezres nagyságrendű rutin vizsgálati anyagon hasonlítottuk össze a tenyésztés, az ITR és az immunfluorescens eljárást. Vizsgálataink azt igazolták, hogy az ITR és az immunfluorescens eljárás gyakorlatilag egyenértékű.

Az immun-tusreakció mechanizmusa még nem minden részében tisztázott és csak látszólag hasonlít az immunfluorescens módszerhez. Mai nézetünk szerint az immun-tusreakció egy immun — abszorpciós eljárás. A tárgylemezre fixált mikrobákhoz kapcsolódik az immunsavó globulinmolekula-frakciójának egyik valenciája, míg a másik valenciát abszorbeálja egy szénszemcse, amely ezáltal lemoshatatlanul kötődik a baktériumhoz. Amennyiben a szabad valenciát homológ antiglobulinnal lekötjük, a reakció nem alakul ki. Akkor is elmarad a reakció, ha a kezelésmenete nem fiziológiás körülmények között történik. Ennek megfelelően például, ha a lemosófolyadék pH-ja 6 alatt vagy 8 fölött van, a reakció nem értékelhető. Hasonlóképpen nem bírálható el a kenet, ha a lemosófolyadékot desztillált vízből készítjük és pH-ját nátrium hidroxiddal állítjuk be 7-re.

Fentiekkel szemben sokféleképpen lehet megbízható lemosófolyadékot készíteni rendkívül komplikált módon, a sóarányok pontos kialakításával, de mi a legegyszerűbb megoldásra törekedtünk, amelyet csapvízzel, kútvízzel és ártézi kútból származó vízzel teljes biztonsággal el lehet végezni.

Saját tapasztalataink szerint, ha egyharmadnyi fiziológiás konyhasó-oldathoz hozzáadunk kétharmad, bármilyen eredetű vizet, amely akár csak nyomokban is tartalmaz komplexképző fémionokat és pH-ját nátrium karbonáttal 7-re állítjuk, megbízható lemosófolyadékot kapunk.

A reakció kialakulásának másik fontos feltétele, hogy a „Folyékony kínai Holló-tus”-t használjuk, amelyet Magyarországon a „Politúr és Vegyitermék” forgalmaz. Számos más minőségű hazai és külföldi eredetű tussal is dolgoztunk, de csak a folyékony kínai Holló-tussal kaptunk minden esetben reprodukálható eredményt.

Az immun-tusreakció kidolgozásával alapvető célunk volt egy olyan gyorsdiagnosztikus módszer kialakítása, amely alkalmas az immunfluoreszcens technika helyettesítésére a bakteriológiai diagnosztikában.

Figyelembe véve a vizsgálati anyag azonos előkészítését, az immun-tusreakció számos előnnyel rendelkezik az immunfluoreszcens technikával szemben.

Az immun-tusreakció nem igényel fluoreszcens mikroszkópot, különféle konjugátumokat stb.

Lényeges előnye, hogy egymagában helyettesíti az immunfluoreszcens technikában használt direkt, indirekt és módosított indirekt módszereket.

Az immun-tusreakció előnye a tenyésztéssel szemben egyrészt a 24—72 órás tenyésztési idő 1—2 órára való lerövidítése, másrészt bizonyos gyakorta, jó minőségű immunsavók birtokában, egyes kórokozók vonatkozásában nagy mennyiségű táptalaj takarítható meg.

Az új reakciót elsősorban akut betegek vagy kezdődő járványok első betegeinek vizsgálati anyagából célszerű elvégezni, amikor is várhatóan nagyszámú kórokozó található a vizsgálati anyagban.

Az immun-tusreakció alkalmazásakor csak a kiszűrt pozitív anyagot kell tenyésztetni részletesebb identifikálás és az antibiogramm meghatározása céljából.

Sokéves vizsgálataink szerint az immun-tusreakció alkalmas minden olyan mikroba gyors diagnosztizálására, amellyel szemben immunsavó termelhető.

Tárgylemezre fixált, ismert diagnosztikumok birtokában alkalmas rekonvaleszcens savók titerének vagy titeremelkedésének gyors meghatározására.

A bakteriológiai kutatómunkában az immun-tusreakció jól alkalmazható a bakteriális eredetű vakcináció hatásosságának ellenőrzésére, természetes ellenanyagok gyors meghatározására, részantigén-rokonság tanulmányozására, baktériumok O, K és H-antigénjeinek meghatározására, valamint a keratoconjunctivitis pozitív baktériumok interacelluláris parazitizmusának egyszerű és gyors identifikálására.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerző új szerodiagnosztikus módszert dolgozott ki a kórokozó mikrobák gyors identifikálására. Az új eljárást, az immun-tusreakciót, modellkísérletekben összehasonlította a klasszikus tenyésztési módszerrel *E. coli dyspepsiae*-k, *Shigellák* és *Salmonellák* gyors azonosítására. A párhuzamosan végzett összehasonlító vizsgálatok azt igazolják, hogy az immun-tusreakció érzékenysége gyakorlatilag a tenyésztéssel, specificitása pedig az immunfluorescens technikával egyező. Az új eljárás kidolgozásának alapvető célja volt az immunfluorescens technika helyettesítése a bakteriológiai diagnosztikában.

Az immun-tusreakció előnye, hogy a kenetek festésére a folyékony kínai Holló-tus, elbírálásukhoz pedig a normál fénymikroszkóp alkalmas. A festés időtartama 5 perc és egyesíti magában a direkt, indirekt és a módosított indirekt festési eljárást.

Петер ГЕК: Сравнительное исследование методов иммунологической реакции с применением туши и высевания для быстрого выявления энтеральных болезнетворных бактерий.

Dr. P. Geck, Veter.—Oberstltn. des Med. Dienstes:

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER IMMUNOTUSCHE-REAKTION UND DER ZÜCHTUNGSMETHODEN ZUM SCHNELLEN NACHWEIS ENTERALER BAKTERIEN