

614.777-078:542.67

POUŽITÍ MEMBRÁNOVÝCH FILTRŮ RŮZNÉ VÝROBY K MIKROBIOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ VODY A VE FÁGOVÉ TECHNICE

Major MUDr. György BIRÓ, CSc., podplukovník MVDr. Péter GECK,
podplukovník RNDr. PhMr. Vladimír MÉRKA
Zdravotnická služba Maďarské lidové armády, Budapešť a Vojenský lékařský výzkumný
a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové

Používání membránových filtrů v mikrobiologii, virologii, epidemiologii, hygieně i farmacii vzrůstá. Velký význam mají tyto filtry pro vojenskou epidemiologii, neboť jich lze využít při rychlodiagnostických mikrobiologických metodách i v polních laboratořích (11). Do nedávna byla potřeba těchto filtrů v ČSSR i v Maďarsku kryta výhradně dovozem z NSR. Od r. 1960 se vyrábějí v ČSSR (29).

Úkolem naší práce bylo porovnat membránové filtry Co 5 (výrobce Membranfiltergesellschaft, Göttingen, NSR) s membránovými filtry typu VUFS a HUFs (výrobce VCHZ Synthesia, Pardubice). Uvedené filtry jsme používali ke

- a) stanovení coli indexu pitných a povrchových vod,
- b) sterilizační filtraci fágových suspenzí,
- c) stanovení patogenních bakterií v kontaminovaných vodách haptenovou flokulační metodou.

Z fyzikálně chemických parametrů membránových filtrů uvádíme jen průměrnou velikost pórů: u Co 5 je $0,6 \mu$, u VUFS $0,25 \mu$, u HUFs $0,4 \mu$, jinak odkazujeme na jejich výrobní dokumentaci (19, 29).

A) Použití membránových filtrů ke stanovení celkového počtu bakterií v pitných, povrchových a odpadových vodách navrhoval již Zsigmondy a od té doby se řada autorů zabývala dílčími otázkami tohoto tématu (3, 5, 9, 12, 17, 18, 21, 22, 24, 25, 27). Používají se k záchytu enterokoků (2), klostridií (7), salmonel (1, 4, 8, 26) a shigel (14) z vody. Pro své nesporné výhody je metoda membránových filtrů pojata i do návrhu nových jednotných mikrobiologických metod rozboru vod zpracovaných v ČSSR. V SSSR je membránová filtrace hlavní zavedenou metodou od r. 1950 (GOST-5216-50). V mnoha státech dosud do norem pojata není (15, 16).

Metodika: Membránové filtry jsme obvyklým

způsobem upravili, sterilizovali a vkládali do Seitzova filtračního aparátu. K odsávání jsme používali vodní vývěvu o podtlaku zhruba 380 mm Hg. Po filtraci jsme membránové filtry položili na Endův agar a po 48hodinové inkubaci odečetli výsledky. Našími vzorky byla surová a uměle kontaminovaná voda Dunaje a pitná voda rovněž kontaminovaná *E. coli*.

Výsledky zkoušek obsahuje tab. 1, udávající průměr 3 souběžných stanovení počtu *E. coli* ve 100 ml vody. Z tabulky vyplývá, že mezi účinností uvedených 3 membránových filtrů není podstatný rozdíl. Morfologické vlastnosti narostlých kolonií byly shodné, stejně dobře byl viditelný i rozklad laktózy a fuchsinový lesk.

Použité membránové filtry jsme podle návodu výrobce regenerovali, odbarvili sířičitanem a znovu použili. Filtry VUFS a HUFs se lámaly ve větším počtu než filtry Co 5. Nepoškozené filtry byly použitelné i podruhé, jejich účinnost nebyla změněna.

Množství vody, které lze filtrem přefiltrovat, závisí samozřejmě na mechanické čistotě vody a na velikosti pórů filtru. Sledovali jsme množství přefiltrované vody do ucpání filtru. Za ucpání jsme považovali filtr, kterým protékala filtrovaná voda pomaleji než 1 kapka za 10 vteřin. Filtrem Co 5 jsme přefiltrovali 600 ml, filtrem HUFs 250 ml a filtrem VUFS 75 ml surové dunajské vody a při použití vodovodní vody bylo přefiltrováno filtrem Co 5 2450 ml, filtrem HUFs 1200 ml, filtrem VUFS 800 ml.

B) V literatuře se doporučuje použití membránových filtrů ke sterilizační filtraci fágových suspenzí, jelikož je u nich dosažitelná větší filtrační rychlost než u Seitzových nebo skleněných filtrů a hlavně proto, že snížení titru fágu je menší (23, 30).

Metodika: Filtrovali jsme stejným způsobem jako v předešlém pokusu, ovšem filtrát jsme zachycovali do sterilních zkumavek. K pokusům jsme použili 6 druhů shigelových fágů, které jsme sami izolovali z odpadové vody. Titr fágů lyzujících příslušné shigely jsme určovali i na semiso-

lidní agarové vrstvě (6, 10) těsně před filtrací a ihned po ní. Sterilitu filtrátů jsme kontrolovali běžným způsobem.

Výsledky: Rozdíl fágových títů před filtrací a po ní byl u všech tří druhů membránových filtrů prakticky stejný, většinou byl nízký a nepřesahoval meze přesnosti stanovení (6–12 %). Pouze v některých případech jsme dostali jak s filtry Co 5, tak i s filtry HUFs a VUFS větší snížení titru. Toto snížení však nikdy nedosáhlo hodnoty jednoho řádu. Ipromilová přísada Tween 80 k filtrovanému bujónu ani impregnace filtrační membrány 1% roztokem Tween 80 výsledky neovlivnila. Jelikož se Tween 80 ve fágové technice u jiných filtrů s dobrými výsledky hojně používá ke snížení adsorpce (28), dospěli jsme k závěru, že snížení titru u membránových filtrů lze připisovat nikoli adsorpci, nýbrž především částečnému ucpání pórů. Tomu nasvědčuje také fakt, že předcházející odstředění lyzátů s vyšším obsahem bakterií (kalných) vykazuje další snížení i jinak velmi nízkých hodnot ztrát.

Filtráty byly ve všech případech sterilní, schopnost použitých membránových filtrů zachytit bakterie se ukázala být 100%.

C) Membránové filtry jsou vhodné také při mikrobiologickém vyšetření vody k přímému spočítání zárodků (13) nebo po rozpuštění membrány k provedení hapténové flokulační reakce (20).

Metodika: Různé množství vodovodní vody jsme infikovali *E. coli* O 124 a *Shigella flexneri* v počtu 10^9 , 10^8 , 10^7 zárodků. Vzorky vody jsme filtrovali membránovým filtrem, který jsme po filtraci vložili do aglutinační zkumavky a přečtvrtili 2,0 ml fyziologického roztoku. Po přidání 4 kapek 40% roztoku louhu sodného jsme obsah zkumavky vařili do úplného rozpuštění filtru. Poté jsme přidali 1 kapku 0,1% roztoku bromthymolové modři jako indikátor a přikapávali normální roztok kyseliny solné až do žlutého zbarvení. Takto okyselený roztok jsme nad plamenem 3krát povařili, ochladili a jeho pH jednou kypkou 40% louhu sodného a 5% roztokem uhličitanu sodného nastavili na hodnotu 7,0. Směs jsme 1–2 minuty centrifugovali ruční odstředivkou a k vrchní 1,0 ml vrstvě přidali 1 kapku 1% roztoku cholesterolinu. Po důkladném protřepání jsme roztok nechali 5 minut stát, načež jsme káplí na mikroskopické podložní sklíčko dvě kapky. Ke kapce na levé straně sklíčka jsme přidali jednu kapku homologního séra zředěného 1:5, k pravé kapce, jež sloužila jako kontrolní, jsme přidali jednu kapku heterologního séra. Sklíčkem jsme pak 3–5 minut silně pohybovali, čímž se v případě homologické vazby zrnka cholesterolinu srazil a vytvořila se zjevná flokulace, zatímco kontrolní kapka zůstala stejnoměrně čirá.

Výsledky: Rozpustnost všech tří typů membránových filtrů v louhu byla úplně stejná jak co do doby rozpouštění, tak i co do množství sedimentu při centrifugování. Pozitivní reakci jsme dostali u všech tří typů filtrů při zachytu aspoň 10^8 mikroorganismů. Filtráty byly ve všech případech sterilní.

Tabulka 1

Výsledky stanovení počtu *E. coli* membránovými filtry Co 5, HUFs a VUFS vztaženy na 100 ml vody

Druh vody	Označení membránových filtrů		
	Co 5	VUFS	HUFs
	Průměrný počet <i>E. coli</i> ve 100 ml vody		
Surová voda dunajská	180	208	160
Dunajská voda kontaminovaná <i>E. coli</i>	400	380	400
Pitná voda kontaminovaná <i>E. coli</i>	300	290	230

Diskuse: Membránové filtry HUF5 a VUF5 jsou ke zjišťování coli indexu vody prakticky rovnocenné s mikrofiltry typu Co 5. Nevýhodou je, že nemají síťování, které ulehčuje odečítání kolonií a znemožňuje záměnu rubu a líce filtru při vkládání do filtračního aparátu nebo přikládání na živnou půdu. Dalšími nevýhodami je menší filtrační kapacita a menší možnost regenerace těchto filtrů. Tyto vlastnosti však podstatně neovlivňují možnost jejich praktického využití. Ačkoliv výrobce doporučuje pro vyšetřování vod v hygieně filtry VUF5, na základě výsledků svých pokusů se domníváme, že pro tento účel jsou vhodnější filtry HUF5 vzhledem k většímu množství vody, které lze jimi zfiltrovat.

Velmi vhodnými se ukázaly čs. membránové filtry při našich pokusech ke sterilizační filtraci fágových lyzátů jak z hlediska sterility filtrátu, tak i z hlediska minimálního poklesu titru.

Při analýze vody infikované enterálními bakteriemi je výhodné souběžně s kultivací bakterií provést haptenovou flokulační reakci. V případě dostatečného množství bakterií lze tímto způsobem již během jedné hodiny získat informativní výsledek. Základním předpokladem zkoušky je membránový filtr, kterým je možno za poměrně krátkou dobu zfiltrovat větší množství vody a tak zkoncentrovat bakterie na filtru. Naše pokusy ukázaly, že i v tomto směru mají všechny 3 membránové filtry stejné vlastnosti, a tím se potvrdil náš předpoklad, že jsou vhodné k provádění rychlých diagnostických zkoušek.

Závěr

Autoři porovnávali membránové filtry západoněmeckého (Co 5) a československého původu (HUF5 a VUF5) při stanovení coli indexu vody, při důkazu enterálních bakterií haptenovou flokulační metodou a při sterilizační filtraci fágových suspenzí. Zjistili, že ačkoli je množství vody, které lze filtry zfiltrovat, u typu HUF5 a VUF5 menší než u filtrů Co 5 a také možnost jejich regenerace je poněkud nižší, jsou prakticky rovnocenné. Filtráty byly u všech tří zkoušek membránových filtrů sterilní.

Literatura

1. Beling, A.: Nachweis von Keimen der Salmonella-Gruppe im Abwasser mit Hilfe der Membranfilter-Methode auf Wismutsulfidagar. Zbl. Bakt. I. Orig. 170, 1957, 1/5: 137—145.
2. Colobert, L., Moréris, P.: Nouveau milieu sélectif pour l'isolement des entérocoques, d'emploi pratique pour leur recherche et leur numération dans l'eau. Ann. Inst. Pasteur 94, 1958, 1: 120—122.
3. Ferrer, E. B., Stapert, E. M., Sokolski, W. T.: A medium for improved recovery of bacteria from water. Can. J. Microbiol. (Ottawa) 9, 1963, 7: 420—425.
4. Gärtner, H., Schyma, D.: Über den Nachweis von Coli Bakt. u. Salmonellen aus dem Wasser mit einem löslichen Ultrafilter. Arch. Hyg. 145, 1961, 2: 81—87.
5. Gohar, H. A., Eissa, A. A.: The use of membran filters in the bacteriological examination of water and air. Ztschr. Hyg. 143, 1957, 4: 364—370.
6. Gratia, A.: Des relations numériques entre bacteries lysogènes et particules de bacteriophages. Ann. Inst. Pasteur 57, 1936, 3: 652—670.
7. Graziadei-Celoria, M. L.: Membranfilterverfahren zur Isolierung von sporenbildenden Anaerobiern aus Wasser. Zbl. Bakt. I. Orig. 168, 1957, 5/6: 407—412.
8. Gregács, M., Mörö, E.: Salmonellák kimutatása felszíni vizből, szennyvizből és szennyvíziszapból. Egészségtudomány 8, 1964, 4: 237—242.
9. Haller, D.: Ein Vorschlag zur Vereinfachung der routinemässigen Bakt. Wasseruntersuchung. Ztschr. Hyg. 143, 1957, 6: 599—603.
10. Horváth, I., Alföldi, L.: A new and sensitive method of phage titration on plastic trays. Acta Microbiol. Hung. 1, 1954, 6: 495—499.
11. Chvapil, J., Švejcar, J.: Možnosti využití membránové filtrace v mikrobiologické diagnostice. Voj. zdrav. listy 28, 1957, 6: 274—281.
12. Kabler, P.: Water examinations by membran filter and most probable number procedures. Am. J. Publ. Health 44, 1954, 4: 379—387.
13. Korsh, L. E.: Direct quantitative microscopic determination of bacteria on membran filters in the sanitary inspection of water reservoirs. J. HEMI 5, 1961, 5: 349—356.
14. Kratochvíl, J., Tarabčák, M.: Vodný faktor v epidemiologii dyzenterie. Čs. Epid. 7, 1958, 4: 271—275.
15. Kruse, H.: Die Durchführung der bakteriologischen Wasseruntersuchung in den verschiedenen Staaten der Erde, I. část Gas- und Wasserfach 101, 1960, 6: 498—502.
16. Kruse, H.: II. část Gas- und Wasserfach 101, 1960, 8: 561—569.
17. Lang, H.: Vergleichende Trinkwasseruntersuchungen unter besonderer Berücksichtigung der sog. Warmblüter Colibakterien mit dem Titrations- u. Membranfilterverfahren. Arch. Hyg. 141, 1957, 1: 34—40.
18. Mašínová, L., Žežulková, M.: Stanovení fekálních streptokoků jako indikátorů čerstvého fekálního znečištění v povrchových vodách metodou membránových filtrů. Čs. hygiena 2, 1957, 1: 38—42.
19. Membranfilter, Filtrationsgeräte. Membranfiltergesellschaft, GmbH, Göttingen.
20. Orlov, A. V.: Novaja serologičeskaja reakcija — gaptocholevaja flokulacija na stěkle. Vojenno-med. žurnal 1957, 7: 48—53.
21. Papavassiliou, J., Wegener, K. H.: Membranfiltermethode zum Nachweis sulfitreduzierender Clostridien in Wasser u. anderen Flüssigkeiten. Zbl. Bakt. I. Orig. 167, 1957, 5: 383—385.
22. Pokorný, J.: Stanovení bakteriální masy povrchových vod pomocí membránových filtrů. Čs. hygiena 2, 1957, 7: 412—416.
23. Raettig, H.: Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklungsvorgänge bei Bakteriophagen. Zbl. Bakt. I. Orig. 157, 1951, 4: 287—293.
24. Schütz, F., Kruse, H.: Die Anwendung der Membranfilter in der bakteriologischen Wasseruntersuchung. Zbl. Bakt. I. Orig. 152, 1947/48, 135—142.
25. Šerý, V.: Použití membránových filtrů v mikrobiol. diagnostice. Čs. Hyg., Epid., Mikrobiol., Imunol. 3, 1954, 1: 53—55.
26. Šerý, V.: Použití membránových filtrů k průkazu salmonel při tyfové epidemii. Čs. Hyg., Epid., Mikrobiol., Imunol. 3, 1954, 5: 245—249.
27. Thomas, H. A. a spol.: Use of molecular filter membranes for water potability control. J. Am. Water Works Assoc. 48, 1957, 9: 1391—1399.
28. Uecker, W.: Membranfilter in der Bakteriophagenfiltration. Zbl. Bakt. I. Orig. 168, 1957, 3/4: 194—203.
29. Ultrafiltry UFS, VCHZ Synthesia, Pardubice 1962.
30. Zak, C.: Adsorpcja bakteriofagów gronkowcowych na filtrach bakteriologicznych. Med. Dośw. i Mikrobiol. 11, 1959, 1: 39—42.

ZLEPŠOVACÍ NÁVRHY

ZN č.:

27 HT-ZS/66

Název ZN:

Souprava pro hromadné zpracování roztěrových preparátů cytochemickými metodami

Autoři:

o. p. MUDr. Milan Potměšil, o. p. František Zvěřina,
Ústřední vojenská nemocnice, Praha

Stručný popis:

Souprava umožňuje hromadné zpracování 40 až 60 roztěrových preparátů, jejich barvení ve vodorovné i svislé poloze. Je řešena tak, aby byla použitelná při vyvolávání striping-filmů u cytologické autoradiografie. Odměna v místě podání 600,— Kčs
Informace: autoři, ÚVN Praha