

# Bakteriologiske undersøgelses metoder

Hans Lautrop  
Niels Høiby  
Annie Bremmelgaard  
Birgitte Korsager

FADL's Forlag

København  
Aarhus  
Odense

**GERDI HOFF**

Overlæge

**Herning Centralsygehus**

**DK-7400 Herning**

**Tlf. 97 21 44 00, lok 5111**

→ Helga ♥ ↓



# Bakteriologiske undersøgelses metoder

Hans Lautrop  
Niels Høiby  
Annie Bremmelgaard  
Birgitte Korsager

FADL's Forlag

København  
Århus  
Odense

© 1979 By Hans Lautrop,  
Niels Høiby, Annie Bremmelgaard  
og Birgitte Korsager.  
Sats: Hanne Francia  
Tryk: Villadsen & Christensen, København  
ISBN 87-7437-692-6

## *Forord*

Denne bog om bakteriologiske undersøgelsesmetoder er resultatet af et undervisningsprojekt gennemført i diagnoseafdelingen, Statens Seruminstitut, i tiden fra januar 1977 til december 1978. Rollefordelingen var fra starten een lærer og tre læger ansat i kursusstillinger i specialet klinisk mikrobiologi, men hurtigt opstod et kollektiv med fire lige aktive forfattere.

Seruminstituttets direktører, J.Chr. Siim og Ole Forsting, har fra begyndelsen indtaget en klart positiv holdning til projektet og har på flere måder direkte støttet dets gennemførelse, hvilket vi hermed siger tak for.

Vi har modtaget megen hjælp fra kolleger blandt Seruminstituttets mikrobiologer, dels i form af svar på spørgsmål, dels i form af gode råd efter genlæsning af hele manuskriptet eller dele af det. Særligt ønsker vi at takke overlæge Jørgen Bang, antibiotikaafdelingen, overlæge dr. med. Per Bülow, regionalafdelingen i Århus, overlæge dr.med. Hans Chr. Engbæk, tuberkuloseafdelingen, overlæge Wilhelm Frederiksen, diagnoseafdelingen, overlæge Knud Gaarslev, diagnoseafdelingen, dr.med. Jørgen Henriksen, streptokokafdelingen, overlæge dr.med. Ebbe Kjems, streptokokafdelingen, afdelingsleder dr.phil. Vagn Møller, substratafdelingen og overlæge dr.med. Kirsten Rosendal, afdelingen for hospitalsinfektioner.

Projektets sekretær, Agnete Thorborg, skylder vi tak for fremragende hjælp med at tilvejebringe et nogenlunde homogent og læseligt manuskript, instituttets bibliotekspersonale, Ruth Ebert og Tove Gertsen, for udholdende bistand med at fremskaffe litteratur og fotografierne Anne Grete Overgaard og Finn Laursen for fremstilling af alle figurerne.

Vi – i forfatterkollektivet – er enige om, at fra et undervisningssynspunkt var projektet vellykket. Om projektets håndgribelige resultat – håndbogen her – også er blevet vellykket, må andre dømme om.

Diagnoseafdelingen, december 1978.

Hans Lautrop  
Annie Bremmelgaard

Niels Høiby  
Birgitte Korsager



## Indholdsfortegnelse

Forord .....	3
Indledning .....	7
<b>Farvemethoder</b>	
Kapitel 1: Alment om bakteriefarvning .....	13
Kapitel 2: Metylenblåfarvning .....	25
Kapitel 3: Gram-farvning .....	27
Kapitel 4: Ziehl-Neelsen-farvning .....	35
Kapitel 5: Flagelfarvning .....	39
<b>Prøver for kulturelle og andre egenskaber</b>	
Kapitel 6: Hæmolyseprøver (streptokokker) .....	53
Kapitel 7: Symbioseprøver ( <i>Haemophilus</i> ) .....	67
Kapitel 8: Porfyrynsynteseprøver ( <i>Haemophilus</i> ) .....	77
Kapitel 9: Koagulaseprøver (staphylokokker) .....	85
<b>Toleransprøver</b>	
Kapitel 10: Galdeopløselighedsprøver .....	95
Kapitel 11: Optokinprøven .....	102
Kapitel 12: Tellurresistensprøven .....	106
Kapitel 13: KCN-prøver .....	113
<b>Oxidations-reduktionsprøver</b>	
Kapitel 14: Oxidaseprøver .....	123
Kapitel 15: Katalaseprøver .....	130
Kapitel 16: Nitratreduktionsprøver .....	139
<b>Undersøgelse af kulhydratomsætning</b>	
Kapitel 17: Alment om kulhydratomsætning .....	153
Kapitel 18: Forgæringsprøver .....	160
Kapitel 19: Voges-Proskauers prøve .....	175
Kapitel 20: Prøver for oxidativ syredannelse (Hugh & Leifson's medium) .....	185
Kapitel 21: ONPG-prøven og andre glukosidaseprøver .....	194
Kapitel 22: Æskulinspaltningprøver .....	203
Kapitel 23: Stivelsesspaltningprøver .....	210
Kapitel 24: Cellulosespaltningprøver .....	216
Kapitel 25: Pektinspaltningprøver .....	223
Kapitel 26: Prøve for 3-ketolaktosedannelse .....	231
Kapitel 27: Prøver for dextran- og levandannelse .....	238

## Indholdsfortegnelse

<b>Undersøgelse af proteinomsætning</b>	
Kapitel 28: Alment om proteinomsætning .....	253
Kapitel 29: Gelatinesmeltningprøver .....	256
Kapitel 30: Aminosyredecarboxylaseprøver .....	266
Kapitel 31: Arginindihydrolaseprøver .....	275
Kapitel 32: Fenylalanindeaminaseprøver .....	282
Kapitel 33: Indolprøver .....	289
Kapitel 34: Svovlbrinteprøver .....	299
Kapitel 35: Ureaseprøver .....	312
<b>Undersøgelse af fedtomsætning</b>	
Kapitel 36: Lipase- og fosfolipaseprøver .....	323
<b>Undersøgelse af nukleinsyreomsætning</b>	
Kapitel 37: DNase- og RNaseprøver .....	341
<b>Undersøgelser ved brug af antibiotika</b>	
Kapitel 38: Alment om antibiotika og måling v.hj. af agardiffusionsmetoden ....	355
Kapitel 39: Resistensbestemmelse .....	376
Kapitel 40: Koncentrationsmåling .....	396
Stikordsregister .....	411

## *Indledning*

”Bakteriologiske undersøgelsesmetoder” er i første række tænkt som lære- og håndbog for speciallæger i faget klinisk mikrobiologi, men der er så vidt muligt taget hensyn til at den også skulle kunne anvendes af laboranter.

Bogen dækker langt fra det samlede mikrobiologiske fagområde. Metoder til identifikation af svampe, mycoplasmer, rickettsier, chlamydier og virus er ikke omtalt og der er kun tale om et udvalg blandt eksisterende bakteriologiske prøver. Udvalget er bestemt af forfatterens personlige erfaring, hvilket stort set vil sige at det er begrænset til metoder der anvendes i Seruminstittets diagnoseafdeling. Desværre blev der ikke tid til inden for projektets rammer at udarbejde alle de planlagte kapitler som ville have gjort bogen til en mere komplet håndbog i bakteriologisk teknik.

De beskrevne undersøgelsesmetoder er grupperet i 9 hovedafsnit, dels på grundlag af undersøgelsesgangen i laboratoriet, dels på grundlag af de 4 hovedgrupper af organiske stoffer: kulhydrat, protein, fedt og nukleinsyre. Den enkelte prøves placering i et bestemt hovedafsnit beror dog i nogle tilfælde på en arbitrær beslutning.

De fleste enkeltkapitler behandler een bestemt prøve eller undersøgelsesmetode, men nogle af hovedafsnittene indledes med et oversigtskapitel, som giver det fælles baggrundsstof for resten af kapitlerne i afsnittet og forklarer de enkelte prøvers placering inden for den større sammenhæng.

Kapitler, som beskriver en enkelt prøve, er i de fleste tilfælde opdelt i faste underafsnit for at gøre det lettere for brugeren at finde ønskede oplysninger.

Den *historiske indledning* er mere dybtgående end i andre håndbøger af samme slags. Formålet har været at præsentere de anvendte metoder i den bredest mulige biologiske og historiske sammenhæng, hvilket på een gang skulle uddybe forståelsen af prøvens grundlæggende princip og af de forskellige udformninger, den har fået i tidens løb, og fremhæve, at hver udformning ofte kun giver en vis tilnærmelse til det ønskede resultat. Med andre ord et forsøg på at indpode en kritisk holdning til prøveresultaterne, specielt for så vidt angår deres anvendelse i videnskabeligt arbejde.

Afsnittene om den *biokemiske baggrund* er ligeledes gjort fyldige, dels af hensyn til den fulde forståelse af hvad prøveresultaterne oplyser, dels med henblik på et fremtidigt arbejde med at udforme bedre prøver. En af vanskelighederne med disse afsnit har været, at mange biokemiske forhold stadig kun er delvis afklarede.

I underafsnittene om *valg af metode* er forsøgt en kortfattet vurdering af de vigtigste i litteraturen beskrevne metoder konkluderende i anbefaling af en enkelt eller nogle få udformninger. Afsnittene er uundgåeligt præget af subjektive synspunkter og af hensynet til, at bogen skulle indeholde en teknisk beskrivelse af de for tiden mest anvendte metoder i danske klinisk-mikrobiologiske laboratorier. Et gennemgående træk har været at fremhæve brugen af såkaldte "direkte enzymtests" hvor denne mulighed er til stede. I dette og/eller i de forudgående underafsnit er det som inspiration for fremtidige bakteriologer også fremhævet, hvor bestemte prøver i særlig grad trænger til forbedring, eller hvor der synes at være mulighed for at udarbejde helt ny metoder ved at udnytte foreliggende biokemisk viden.

I underafsnittene om *teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning* er angivelser angående substrater og reagenser, hvor intet andet er anført, baseret på de af Seruminstittuttets substratafdeling udgivne løbblade med substratopskrifter og på substratafdelingens á jourførte kommentarer til disse. Beskrivelsen af teknikken er bevidst gjort meget detaljeret. Det skyldes, at mange af prøverne er baseret på en empiri, der må fastholdes så nøjagtigt som muligt, da selv små ændringer i en fastlagt teknik kan vise sig at medføre uforudselige ændringer i resultaterne.

Underafsnittene om *sikkerhedsforanstaltninger* er kortfattede, da det er forudsat, at diagnoseafdelingens regler for omgang med patogene bakterier er kendt og følges.

Underafsnittene *fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion* er tænkt som en hurtig hjælp til at fastslå, om et bestemt prøveudfald hos en given stamme er foreneligt med den eksisterende almindelige viden om positive prøvers forekomst. Fortegnelsen dækker dog stort set kun taxa, som har betydning i den medicinske bakteriologi. Den oprindelige plan, at anvende "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8. udgave, 1974, som grundlag for disse fortegnelser, er fastholdt, skønt det i mange tilfælde viste sig umuligt at opnå tilstrækkeligt sikre og fuldstændige data fra denne kilde. Fortegnelserne er derfor i nogle tilfælde suppleret fra andre kilder, men ikke så systematisk at vi kan indestå for, at alle fortegnelser er komplette. Dette er der taget højde for ved at angive, at kun de vigtigste bakterier indgår i fortegnelsen.

Underafsnittene om prøvernes *diagnostiske værdi og særlige anvendelsesområder* gør ikke krav på at være udtømmende. De er væsentligst baseret på forfatternes egne erfaringer, men medtager desuden de i bakteriologien gængse vurderinger. Disse afsnit er kun vejledende og skal ikke afholde nogen fra at forsøge at udnytte en bestemt prøve udenfor de anførte anvendelsesområder.

For at lette litteraturstudiet af de enkelte prøver til videnskabelige eller praktiske formål er hvert kapitel forsynet med en *fortegnelse over citerede arbejder*. Langt størstedelen af denne litteratur findes i diagnoseafdelingens bibliotek i form af fotokopier samlet i mapper for hver prøve. Også relevante sider af monografier og tekstbøger findes som regel, og ud over den i bogen citerede litteratur findes i mange tilfælde et betydeligt supplerende materiale. Denne særtryksamling er efter aftale med diagnoseafdelingens overlæger tilgængelig for interesserede, dog ikke til udlån.



# **Farvemetoder**



## *Kapitel 1*

### **Alment om bakteriefarvning**

Farvestoffer anvendes inden for bakteriologien for at tydeliggøre bakteriecellens omrids med henblik på formdifferentiering, for at påvise organeller og andre specielle strukturer, fx. vægbygning, og for at påvise specielle makromolekyler, fx. inklusioner.

Blandt de mange forskellige metoder, der er udviklet til farvning af bakterier og bakteriebestanddele, skal kun omtales følgende, almindeligt anvendte metoder: generel farvning med metylenblåt, Gram-farvning, Ziehl-Neelsen-farvning og flagelfarvning. Indførelsen af fasekontrastmikroskopi har gjort, at metoder til fx. sporefarvning og kapselfarvning sjældent er nødvendige i det mikrobiologiske laboratorium, og har i øvrigt også til dels overflødiggjort generel farvning.

#### **1. Fælles historisk indledning**

Studiet af bakteriernes morfologi var i de første 200 år hæmmet af de ufuldkomne mikroskoper og af manglen på farvemetoder.

De billeder man så i mikroskoper som dem hollænderen Leeuwenhoek (1632–1723) og hans efterfølgere brugte, var kun svagt forstørrede (højest 300 x), og desuden var de lyssvage, uklare og mangefarvede på grund af kromatisk og sfærisk aberration. Disse ulemper fjernedes efterhånden. Bedre belysninger opnåedes ved hjælp af spejle, kondensorer og blændere. Kromatisk og sfærisk aberration forsvandt, og opløsningsevnen (forstørrelsen) blev forbedret, da man indførte sammensatte akromatiske linser (Amici 1824 og især Abbé 1883). Også indførelsen af immersionsvæsker var et fremskridt (vandimmersion indført af Amici ca. 1850, olieimmersion af Abbé i 1878). Fra begyndelsen af 1880'erne var mikrobiologerne derfor udstyret med lysmikroskoper, som i ydeevne ikke adskilte sig meget fra dem, der bruges i dag. De gradvise fremskridt i mikroskopets udvikling afspejler sig tydeligt i bakteriologiens historie. I 1830'erne, da de første akromatiske linser kom i brug, opdagedes de første parasitære sygdomme, nemlig dem som skyldes svampe (Bassi 1835; Schönlein 1839; Gruby 1841), og man opdagede gærsvampenes

tilstedeværelse ved alkoholiske forgæring (Cagniard-Latour 1837; Swann 1837). Efter at yderligere forbedringer i linserne var nået i begyndelsen af 1880'erne, og farvemethoderne var taget i brug, fulgte slag i slag beskrivelserne af de patogene bakterier. (Cit. fra Lechevalier & Solotorovsky 1974 og Col-lard 1976).

Foruden af de ufuldkomne mikroskoper var udforskningen af bakterier vanskeliggjort af, at bakterierne i fugtige, ufarvede præparater viste for ringe kontrast i forhold til det omgivende medium, og af at der var så stærk uro i præparatet på grund af molekylarbevægelse og evt. flagelbevægelse, at præcise tegninger og målinger ikke kunne udføres (Koch 1877).

Naturlige farvestoffer, som udvindes af plante- og dyrematerialer, har i århundreder været brugt til farvning af tekstiler, og desuden har nogle få uorganiske stoffer været anvendt. Englænderen Grew synes at være den første, der anvendte et sådant farvet ekstrakt fra et insekt til plantehistologisk arbejde (1682). Leeuwenhoek anvendte i 1714 som den første plantefarvestoffet safran til farvning af dyrisk væv. Forskellige naturlige farvestoffer brugtes i den efterfølgende tid til histologisk arbejde, bl.a. indførte Goepfert & Cohn i 1849 karmin og Waldeyer i 1863 hæmatoxylin. Et stort fremskridt var introduktionen af de syntetiske anilinfarver i 1856 af Perkin, og Beneke var den første der benyttede et anilinfarvestof til histologisk arbejde (1862) (cit. fra Culling 1963, Jensen 1964 og Gurr 1965).

I 1862 farvede Hoffmann – formentlig som den første – bakterier i *fugtigt præparat* med en fuksin- eller karminopløsning (cit. fra Hoffmann 1869 og Loeffler 1887), og danskeren Salomonsen anvendte i 1877 en jodjodkaliumopløsning og senere svovlsur rosanilin til farvning af fugtige præparater. Weigert var den første, der i farvede *snitpræparater* af væv erkendte bakterier (1871), og han benyttede i 1875 med held hæmatoxylin- og siden anilinfarvning specielt til påvisning af bakterier i vævssnit. Denne metode blev ligeledes brugt af Billroth & Ehrlich (1875-77) (cit. fra Koch 1877, Loeffler 1887 og Salomonsen 1904).

Det var imidlertid Koch, der indførte principperne for farvning af *tørt præparat*. I 1877 angav han metoder til fremstilling, fiksering, farvning, fotografering og konservering af tørre præparater. Han viste, at anilinfarvestoffer, specielt vandige opløsninger af metylviolet eller fuksin, var de mest velegnede til farvning af bakterieceller, og at svingtråde kunne farves med en koncentreret vandig opløsning af Campeche-trækstrakt (indeholder hæmatoxylin og garvesyre). Med fremkomsten af Koch's arbejde var der åbnet muligheder for at sammenligne og dokumentere nøjagtige mikroskopiske observationer, hvilket tidligere havde været umuligt.

I løbet af 1880'erne udvikledes de første specielle farvemethoder. Koch offentliggjorde i 1882 en metode til farvning af tuberkelbakterier, som forbedredes af Ehrlich (1882), af Ziehl (1882) og af Neelsen (1883). Gram publicerede i 1884 sin metode til i vævssnit at skelne mellem cellekærner og bakterier, der senere fik særlig betydning ved også at adskille de to hovedgrupper af bakterier, grampositive og gramnegative, og Loeffler offentliggjorde i 1889-90 en metode til at farve bakteriers svingtråde. Omkring århundredeskiftet var der fremkommet et stort antal farvemethoder og varianter heraf, som bl.a. omtales i arbejder af Unna (1888), Neisser (1889), Salomonsen (1894) og Grimme (1902) samt af Friedberger & Reiter (1912).

## 2. Fysisk-kemisk baggrund

### a) Farveopfattelsen

Almindeligt hvidt lys består af en blanding af alle spektrets forskellige farver. Fire er såkaldt rene farver eller urfarver: rødt, gult, grønt og blå, og tre er grundfarver: rødt, grønt og blå, hvoraf alle andre farver kan sammensættes. Tilsvarende har det menneskelige øjes nethinde lysfølsomme tappe med tre forskellige følsomhedsmaxima ved henholdsvis rødt, grønt og blå (trikromatisk). Hvis en genstand i almindeligt hvidt lys har en farve, er det fordi genstanden absorberer nogle af spektrets farver, mens andre transmitteres eller reflekteres til øjets nethinde, og disse forhold bestemmer med hvilken farve genstanden opfattes. Sorte genstande absorberer alle spektrets farver; hvide absorberer enten ingen farver eller reflekterer to farver, som tilsammen opfattes som hvid (komplementærfarver). Mens det normale øje er trikromatisk, mangler farveblinde personer én eller flere af de tre farveopfattelseskomponeenter (de kan altså være dikromate eller monokromate), hvorfor de vil fejlopfatte visse farver og dermed forveksle dem. Dette kan have stor betydning fx. ved mikroskopi af Ziehl-Neelsen farvede præparater, hvor de røde TB-bakterier af nogle farveblinde ikke kan skelnes fra en gul, grøn eller blå baggrundsfarve.

De fleste organiske forbindelser absorberer ikke lysbølger svarende til det synlige spektrum (400 nm (violet) – 750 nm (rødt)), men derimod lysbølger fra det ultraviolette område. Ved tilstedeværelse af såkaldte *kromofore grupper* (dvs. grupper med dobbeltbindinger eller tripelbindinger, fx.  $=C=N-$ ,  $-N=N-$ ,  $=C=C$ ,  $=C=S$ ), der indeholder løst bundne elektroner, rykker absorptionen ind mod eller ind i den synlige del af spektret. Denne virkning kan forstærkes væsentligt, når en kromofor gruppe er bestanddel af et konjugeret system, dvs. et system som indeholder vekslende enkelt- og dobbeltbindinger. Af væsentlig betydning for farven er også de såkaldte *auxokromer*, der er

atomgrupper med et disponibelt elektronpar (OH, NH<sub>2</sub> samt alkylsubstitutter af disse grupper), som kan inducere en elektronforskydning i det konjugerede system og derfor "fordybe" en allerede forhåndenværende farve, men ikke i sig selv gøre et farveløst stof farvet (cit. fra Jensen 1964 og Gurr 1965).

#### *b) Farvestoffernes kemi*

Alle farvestoffer til bakteriologisk brug er syntetiske, organiske produkter, såkaldte anilinfarver. Anilin, som industrielt fremstilles ved reduktion af nitrobenzen, er en farveløs væske med formelen C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>, altså en primær amin af benzen.

I 1834 viste Runge, at anilin fra stenkulstjære danner mørkt farvede forbindelser med iltningmidler, og den første egentlige anilinfarve (det violette mauvein) fremstilledes af Perkin i 1856 ved oxidation af anilin med kromsyre. I 1859 fremstilledes fuksin af Verguin ved iltning af en blanding af anilin og toluidiner, og i 1862 blev af Beneke for første gang et anilinfarvestof anvendt til mikroskopipræparater. Fra omkring 1870 er anilinfarvestofferne således til rådighed. Den videre udnyttelse af disse stoffer til biologisk farvning skyldes især Ehrlich (1877, 1878, 1886). På den tid startedes navnlig i Tyskland en fabrikation af anilinfarver, idet man hertil foruden anilinderivater regnede farvestoffer udvundet af tjæreprodukter. Farvestofferne benyttes hovedsagelig til tekstilfarvning, men fandt som anført hurtigt anvendelse i histologiske og bakteriologiske laboratorier.

Et farvestofmolekyle består af en farvet jon og en ufarvet uorganisk eller alifatisk, organisk jon af modsat ladning og er således et salt. Gurr (1962) inddeler farvestoffer i sure, basiske, amfotere, neutrale og sammensatte. I sure farvestoffer er det den negativt ladede anjon, der er farvet, mens det i basiske farvestoffer er den positivt ladede katjon, som er farvet. Amfotere farvestoffer har både positivt og negativt ladede grupper; neutrale farvestoffer er ikke-joniserede, og sammensatte farvestoffer består af kemiske forbindelser mellem to forskelligt farvede farvestoffer.

Af betydning for farvestoffers kemiske binding til vævselementer eller til andre farvestoffer o.lign. er såkaldte kolligatorer. Sure kolligatorer er de negativt ladede carboxyl- og sulfonsyregrupper, som findes i sure og i nogle få basiske farvestoffer. De bindes til basiske elementer i væv eller basiske joner i andre farvestoffer. Basiske kolligatorer er de positivt ladede frie eller substituerede aminogrunder, som findes i basiske og i mange sure farvestoffer. De gør, at basiske farvestoffer kan bindes til sure vævselementer eller sure farvestoffers joner.

Basiske farvestoffer har stor affinitet til cellekærner, især til nukleinsyrenes fosfatgrupper, og mindre affinitet til proteiners carboxylgrupper i cytoplas-

maet. Sure farvestoffer har større tendens til at binde sig til cytoplasmaets bestanddele, især til proteiners aminogruupper. Til bakteriologisk brug anvendes mest basiske farvestoffer.

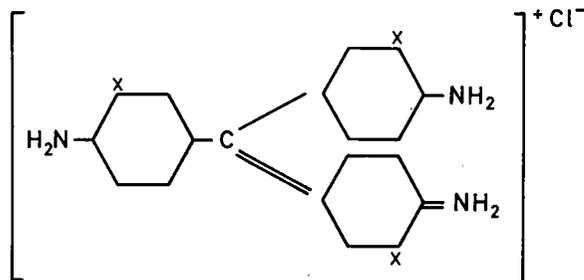
Fordelingen af farvestoffer i væv bestemmes foruden af den elektriske ladning af vævenes permeabilitet, og bestemmende for det visuelle indtryk er desuden den lokale mængde af farvbart materiale. Da bakterier ikke som eucaryoter har nogen opdelt indre cellestruktur, farves de ensartet med basiske farvestoffer, der bindes særligt fast til nukleinsyrernes fosfatgrupper. De bindinger, der forekommer, er først og fremmest jonbindinger, som formentlig forstærkes af bl.a. brintbindinger og kovalente bindinger (Baker 1960).

Heraf fremgår, at samme cellestruktur kan farves af mange forskellige farvestoffer, og at amfotere stoffer som fx. proteiner i nogen grad kan farves af både sure og basiske farvestoffer. Ved at variere farvetiden eller pH kan man opnå kontrol med, om et amfotert stof farves af sure eller af basiske farvestoffer. Et basisk farvestof kan fjerne og erstatte et andet, som allerede er bundet i vævet. Denne "replacement" følger massevirkningsloven for kemiske reaktioner (Bartholomew et al. 1950). Dette betyder, dels at kontrastfarvning (efterfarvning) ofte skal foretages med forsigtighed, dels at nogle modifikationer af farvemethoder direkte udnytter denne replacement-effekt, idet differentiering (affarvning) og kontrastfarvning foregår samtidigt.

### c) Almindeligt anvendte farvestoffer

#### Basisk fuksin

Basisk fuksin er en blanding af p-rosanilin og to metyleringsprodukter heraf (basisk magenta og ny magenta), og det fås som klorid eller acetat eller frie baser. Det er et magentarødt basisk farvestof, hvis opløselighed ved 15°C er: 1% i H<sub>2</sub>O, 8% i absolut (abs.) alkohol og 0 i xylene. Molekylvægten for de tre ingredienser er 329, 338 og 366, og den fælles formel er:

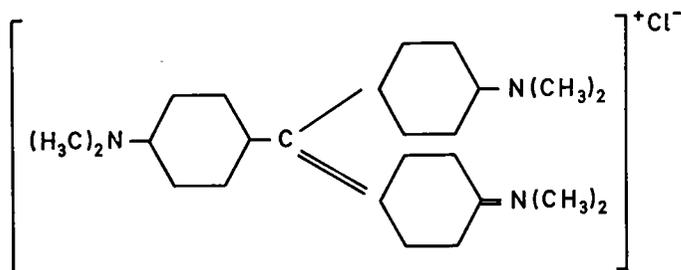


Basisk fuksin

Metyleringen finder sted ved +-erne. Absorptionsmaximum er 540 nm. pH af en vandig opløsning er 6,7. Det anvendes i en vandig opløsning indeholdende 1% fuksin, 10% alkohol og 5% fenol som "koncentreret" karbolfuksin til Ziehl-Neelsen-farvning og fortyndet 1:10 med destilleret vand til Gram-farvning. Det anvendes som en 1,2% opløsning af basisk fuksin i 95% alkohol til Leifson's flagelfarvning.

### Krystalviolet

Krystalviolet er et blåviolet basisk farvestof med molekylvægten 408. Formlen er:

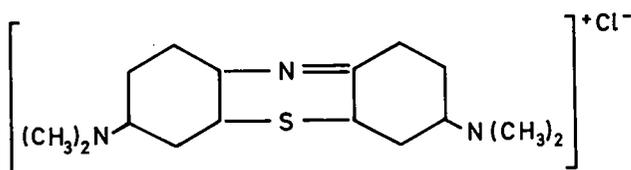


Krystalviolet

Opløseligheden ved 15°C er: 9% i H<sub>2</sub>O, 8,75% i abs. alkohol og 0 i xylene. Absorptionsmaximum er 590 nm. pH af en vandig opløsning er 6,6. Det anvendes som en 0,2% vandig opløsning med 3% anilin og 10% ætanol til Gram-farvning.

### Metylenblåt

Metylenblåt er et basisk farvestof, som i iltet tilstand er blåt, mens det i reduceret tilstand er farveløst, hvorfor det også bruges som oxidations-reduktionsindikator. Molekylvægten er 320 og formelen er:



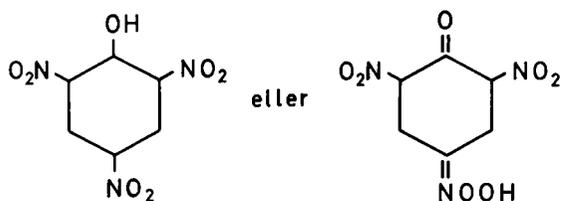
Metylenblåt

Karakteristisk for metylenblåt er, at det i opløsninger, som henstår, bliver delvis oxideret, så at disse opløsninger indeholder en del rødligt-violette farvestoffer af lavere metyleringsgrad end det originale metylenblåt. Disse polykromatiske egenskaber er værdifulde i mange tilfælde og søges ofte fremmet, fx. ved tilsætning af alkali som i Loeffler's metylenblåt.

Opløseligheden ved 15°C er: 1,3% i H<sub>2</sub>O, 6% i abs. alkohol og 0 i xylen. Absorptionsmaximum er 665 nm. pH af en vandig opløsning er 2,5. Anvendes som en 1% vandig opløsning til simpel farvning.

### Pikrinsyre

Pikrinsyre er et gult, surt (anjonisk) farvestof med molekylvægten 229. Formlen er:



Pikrinsyre

Opløseligheden ved 15°C er: 1,2% i H<sub>2</sub>O, 9% i abs. alkohol og 10% i xylen. Absorptionsmaximum er 400 nm. pH af en vandig opløsning er 1,35. Det er et generelt cytoplasmfarvestof og derfor velegnet som baggrundsfarve til kontrast for farvestoffer, der farver kærner eller bakterier, og som sådan bruges det som en 0,75% vandig opløsning ved Ziehl-Neelsen-farvning.

### d) Bejdser

Bejdser er stoffer, der danner uopløselige forbindelser med farvestoffer og fikserer dem til det materiale, som skal farves. De tilsættes i reglen før, sjældnere samtidig med og sjældent efter farvestoffet. Som bejdser anvendes fx. *let hydrolyserbare salte*, især sulfater og dobbeltsulfater (aluner), af trivalente metaller (fx. aluminium-, jern-, krom- og blysalte), der giver surt pH i vandig opløsning. Metaljonen er afgørende for bindingen, som formentlig finder sted til sure grupper i væv, især fosfat i nukleinsyrer og carboxylgrupper i proteiner (Baker 1960). Antagelig er det samme slags bindinger, der binder metaljonen komplekst til farvestoffet. En anden slags bejdse er *tannin* (garvesyre), som på grund af sine sure grupper bindes til proteiners basiske grupper

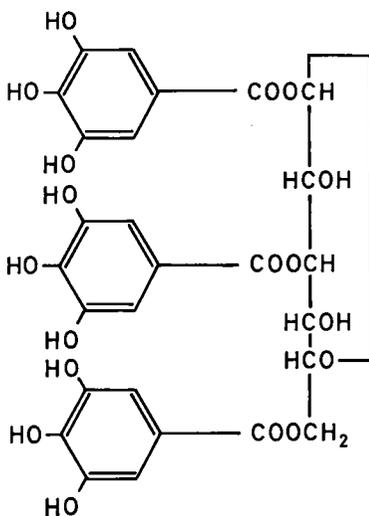
og til basiske farvestoffer. I Gram-farvningen anvendes jodjodkalium (I<sub>2</sub>K) som bejdse, idet det danner tungt opløselige komplekser med de anvendte basiske farvestoffer. Til en given opgave kan flere forskellige bejdser somme-tider anvendes, men de giver ikke altid lige gode resultater. Stort overskud af bejdse i opløsning kan fjerne farvestof, der allerede ved bejdse er bundet til vævskomponenter (Baker 1960).

### Jod

Jod anvendes som opløsninger i kaliumjodid (KI), da det er meget tungt opløseligt i H<sub>2</sub>O. Ved tilstedeværelse af KI kan større mængder jod opløses, idet der indstiller sig en ligevægt:  $I_2 + I^- \rightleftharpoons I_3^-$ . Jod er et meget brugt farvestof, fx. blandt parasitologer og histologer, men i det bakteriologiske laboratorium anvendes det først og fremmest som bejdse i Gram-farvningen, idet det danner tungt opløselige komplekser med krystalviolet i molekyleforholdet 2:1 og 1:1. Formlen er I<sub>2</sub>. Atomvægten er 127. Opløseligheden ved 15°C er: 0 i H<sub>2</sub>O, 15% i abs. alkohol og 20% i xylene. Anvendes som en vandig opløsning indeholdende 0,33% jod og 0,67% kaliumjodid til Gram-farvning.

### Tannin

Tannin = gallusgarvesyre er et glykosid, som ved hydrolyse danner gallus-syre (3,4,5-trihydroxybenzoesyre) og glukose. Det er meget let opløseligt i H<sub>2</sub>O og i abs. alkohol. Den kemiske formel er kompleks, og nedenstående formel er for det specielle tannin corilagin:



Tanninet Corilagin

Tannin anvendes til flagelfarvning i en 3% vandig opløsning, som lige før brugen blandes med lige dele 1,2% basisk fuksin i 95% alkohol og 1,5% NaCl i vand. Herved dannes et tannin-fuksin kompleks, som præcipiterer og bindes til flagellerne, når alkoholen fordamper.

#### *e) Differentieringsmidler (affarvningsmidler)*

Differentieringsmidler er væsker, som opløser og fjerner overskud af farvestoffer, der ikke er bundet af de specifikt farvede strukturer i et præparat. I bakteriologiske laboratorier anvendes almindelige opløsningsmidler: H<sub>2</sub>O, ætanol, metanol, acetone og syrer. Flere af dem kan erstatte hinanden, omend de ikke altid giver lige gode resultater. Basiske farvestoffer kan fjernes med syrer, og sure farvestoffer med baser. Ætanol og andre organiske opløsningsmidler nedsætter farvestoffernes joniseringstendens, og hvis farvestofferne samtidig er opløselige i ætanol, kan de derved lettere fjernes. I almindelighed er forskellen i affarvbarhed mellem forskellige celler og cellebestanddele derfor kvantitativ og altså bl.a. afhængig af affarvningsmidlets koncentration, affarvningstiden og pH (Bartholomew & Mittwer 1952; Baker 1960). Vaskeprocedurer med H<sub>2</sub>O mellem de forskellige trin i en farvemethode skal i nogle tilfælde undgås eller være af kort varighed (5 sekunder), idet vand også er et affarvningsmiddel, hvis farvestoffet er vandopløseligt. Farvestofopløsninger, ja selv overskud af bejdsler, kan som ovenfor anført også fungere som affarvningsmidler for farvestoffer, der tidligere er påført præparatet.

### **3) Fremstilling og fiksering af præparater til farvning**

#### *Objektglas og dækglas*

Koch og senere andre bakteriologer fremstillede farvede præparater på dækglas. Neisser gik i 1878 over til at fremstille de farvede bakteriologiske præparater på objektglas (se Neisser 1889).

Det almindelige optiske udstyr på mikroskoper idag er beregnet til 0,8–1,0 mm tykke objektglas og 0,13–0,16 mm tykke dækglas. Standardstørrelse for objektglas er 76 x 26 mm og for dækglas 18 x 18 mm. Objektglas til ufarvede præparater og til præparater, der skal farves enten med metylenblåt eller med Grams eller Ziehl-Neelsens metode, kan som regel benyttes som de leveres fra fabrikken uden yderligere rensning, såfremt de opbevares i en lukket æske, og berøring med fingrene af overfladen undgås. En lettere rensning (affedtning) kan om nødvendigt foretages ved pudsning med 95% alkohol. Dækglassene behøver som regel ingen rensning, men kan bruges som de leveres fra fabrikken.

Objektglas, der skal anvendes til flagelfarvning, kræver en meget omhyggelig rensning. Først vaskes de med sulfosæbe, skylles i 95% alkohol og henstilles i kromsvovlsyre i mindst 4 dage. De skylles derefter godt under rindende vand og henstår mindst 1 time i destilleret eller dejoniseret vand (man skal være opmærksom på, at destilleret og især dejoniseret vand kan indeholde gramneg. stave som kan genfindes på glassene), hvorefter de lufttørres ved at blive stillet på højkant oven på et lag sugende cellestof. Glassene opbevares efter rensningen i lukket kasse og må kun håndteres med pincet. Umiddelbart før brugen flamberes de på den side, hvor præparatet skal være, i en *farveløs* gasflamme.

#### *Fremstilling af tørpræparater til generel farvning, Gram- og Ziehl-Neelsen farvning*

a) Hvis udgangsmaterialet er en kultur, fremstilles en svagt turbid bakteriesuspension ved at opslemme lidt kolonimateriale fra et fast substrat i destilleret vand eller ved at udtage en øsefuld direkte fra en flydende kultur. Sidstnævnte er dog ikke altid tilfredsstillende, dels fordi bestanddelene fra nogle substrater forhindrer bakterierne i at hæfte sig på objektglasset, dels fordi substratbestanddele kan interferere med farvningen. En lille dråbe svagt turbid bakteriesuspension anbringes på objektglasset og spredes så tyndt som muligt ved hjælp af en steril øse. Formålet er at opnå et én-cellelag og en celletæthed på ca. 100 pr. synsfelt uden tætte hobe (1000 x forstørrelse). Spredningen foretages forsigtigt for at bevare cellernes naturlige indbyrdes arrangement, og præparatet lægges derefter til lufttørring. Afkortning af lufttørringstiden ved opvarmning af objektglasset over gasflamme er risikabel, da for høj temperatur af vandig suspension kan deformere cellernes udseende. Fysisk overlaster i form af ridsning med andre glas eller lignende skal undgås, da mekanisk ødelæggelse af cellevæggen kan forvanske farvbarheden.

b) Hvis udgangsmaterialet er flydende biologisk prøvemateriale, afhænger fremgangsmåden af dettes art. I nogle tilfælde, hvor materialet er tyndtflydende og bakterietætheden lille (fx. spinalvæske), vil man søge at koncentrere bakterierne i et bundfald ved hjælp af centrifugering. Drejer det sig om tyktflydende materiale (fx. ekspektorat), fremstiller man et præparat direkte fra materialet. I alle tilfælde vil man ved udstrygningen stræbe efter at få et enkelt cellelag.

c) Hvis udgangsmaterialet er fast biologisk prøvemateriale (væv), kan man fremstille et aftrykspræparat af en frisk snitflade, men helst bør man findele og homogenisere enten hele materialet eller en del af det, fx. i en steril morter, og fremstille et udstrygningspræparat af homogenatet. Herved vil vævets arkitektur dog blive ødelagt, så hvis man ønsker oplysninger herom, må man

fremstille snitpræparater på mikrotom af frosne præparater eller af paraffin-indlejrede præparater. Bakteriefarvning af sidstnævnte slags præparater skal omtales nærmere, da de kræver speciel behandling.

#### *Behandling af formalin-fikserede, paraffin-indlejrede præparater*

Såfremt formalin-fikserede, paraffin-indlejrede vævspræparater skal farves til bakteriepåvisning, må paraffinen først fjernes og præparatet rehydreres. Efter farvningen skal det igen dehydreres og monteres med eukitt og dækglas, da det ellers glider af, når der kommer olie på.

*Fremgangsmåde* (Cruickshank 1969): (1) Xylen 5–10 min. (2) Xylenen fjernes med lidt abs. alkohol (ætanol), hvorved præparatet bliver uigennem-sigtigt. (3) Der skylles forsigtigt med lidt 50% alkohol og vaskes forsigtigt i dest. H<sub>2</sub>O, hvorefter præparatet er klar til farvning. Efter farvning og efterfølgende vask med vand fjernes overskud af vand med filtrerpapir, og præparatet behandles straks med nogle få dråber 95% alkohol og derefter med abs. alkohol. Overskud af alkohol fjernes rundt om præparatet, nogle få ekstra dråber alkohol hældes på, og præparatet klares ved neddykning i xylen. Overskud af xylen fjernes med filtrerpapir omkring præparatet, der monteres med eukitt og dækglas. Det er vigtigt, at præparatet ikke på noget tidspunkt tørrer ind, og at dehydreringen med abs. alkohol er komplet.

Hvis bakterierne er lette at affarve med alkohol, bør man anvende anilinylen (2+1) til dehydrering, og dette fjernes derefter ved afskylning med xylen; til sidst eukitt og dækglas.

#### *Fiksering af præparater*

Formålet med en fikseringsprocedure er at hæfte bakteriecellerne fast til objektglasset og bevare cellernes naturlige struktur bedst muligt. Fikseringen forhindrer opsvulmning eller skrumpning, opløsning eller forvridning af cellerne, inaktiverer autolytiske enzymer og gør derved vævet eller cellerne modstandsdygtige over for senere behandling. Man skelner mellem koagulerende (denaturerende) og ikke-koagulerende fikseringsmetoder (Baker 1960). De kemiske fikseringsmidler, som danner et koagel af proteiner, vil mikroskopisk omdanne homogent protoplasma til et netværk. Til de koagulerende metoder hører fx. varmfiksering (ca. 80–90°C ved proteinernes isoelektriske punkt) og ætanol- eller metanolfiksering, som muligvis virker ved at dehydratisere proteiner. Til de ikke-koagulerende metoder hører fx. formaldehyd, som virker ved at bindes til aminogrupeer i proteiners peptidkæder. Herved blokeres basiske grupper i proteinerne, så affiniteten for sure farvestoffer falder meget, mens affiniteten for basiske farvestoffer er uændret.

Blandt de almindeligste kemiske fiksningsmidler, som også af og til bruges i bakteriologiske laboratorier, er koncentreret ætanol eller metanol eller 10% formalin (= 4% formaldehyd) i 15 min. (se Bennedsen 1969). 10% formalin tilsættes ofte en fysiologisk koncentration af NaCl for at undgå skrumpningsfænomener (fx. 83 ml dest. H<sub>2</sub>O + 7 ml 10% NaCl + 10 ml formalin). Andre metoder og virkningsmekanismer er omtalt af Baker (1960) og Hopwood (1969). Almindeligvis bruges dog i det bakteriologiske laboratorium varme (flammefiksering) til at fikse præparater på objektglas. Dette giver nogen celledeformering, men fjerner intet fra cellerne. Den gængse måde er at føre det lufttørrede præparat med præparatsiden opad tre gange hurtigt gennem en gasflamme, idet hver passage tager ca. 1 sekund. Efter en korrekt flammefiksering skal bagsiden af glasset kunne holdes mod huden på håndryggen uden at fremkalde smerte. For kraftig opvarmning kan ødelægge præparatet og forandre cellernes farvbarhed (Bartholomew & Mittwer 1952; Magee et al. 1975). Til præcise målinger af cellestørrelse og -form bør andre fiksningsmetoder end varme benyttes.

*Referencer:* se referencelisten efter kapitel 5.

## *Kapitel 2*

# **Metylenblåfarvning**

### **1. Historisk indledning**

Koch's generelle farvemethode (1877) videreudvikledes af Loeffler (1884, 1886), som til farvning anvendte enten alkoholisk metylenblåt eller gentianaviolet, eller fuksin i alkalisk vandig opløsning og til fjernelse af farverester behandling med 0,5% eddikesyre. Herved farvedes almindelige bakterier og cellekærner hurtigt og stærkt. Modifikationer af Loeffler's metode til generel farvning af bakterier er stadig meget anvendt.

### **2. Biokemisk baggrund**

Det basiske farvestof metylenblåt bindes til sure grupper i cellekærner og bakterier. Efter afskylning af overskydende farvestof er cellekærnerne i vævsceller og gramneg. og grampos. bakterier – ekstracellulære såvel som intracellulære – blåfarvede, mens cytoplasma i vævsceller, syrealkoholfaste bakterier og proteinpræcipitater på objektglas ikke er blevet farvet.

Den generelle farvning med metylenblåt, som findes i mange modifikationer, er meget benyttet i bakteriologiske laboratorier. I de forskellige modifikationer bruges en vandig opløsning af farvestoffet, som i nogle tilfælde er tilsat alkohol og eventuelt gjort basisk med KOH for at opnå en mere intensiv farvning på kortere tid (Loeffler 1884, 1886).

### **3. Valg af metode**

I diagnoseafdelingen på Seruminstituttet anvendes en vandig opløsning af metylenblåt uden yderligere tilsætning.

### **4. Teknisk udførelse**

*Reagens:* 1% vandig opløsning af metylenblåt. Opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg ved stuetemperatur. Holdbarhed: mindst 1 måned.

*Udførelse:* Det varmfikserede tørpræparat overhældes med farvevæsken og henstår i 3 min., hvorefter overskydende farvestof afskylles med vandhanevand, indtil der ikke afgår mere farvestof (få sekunder). Aftrykkes dernæst med filtrerpapir. Risiko for over- eller underfarvning ved ændrede farvetider er ringe.

*Mikroskopi:* Præparatet oplyser om mængde, størrelse, form og indbyrdes lejring af bakterier samt tilstedeværelse af mørkere metakromatiske granula i disse. Desuden får man oplysning om mængde af hvide blodlegemer og andre vævsceller og disses art, så vidt det kan bedømmes ud fra kærnernes morfologi. Da eukaryotiske cellers cytoplasma ikke farves, kan intracellulært beliggende (fagocyterede) bakterier også ses.

### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen specielle. Brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand eller 2% Bacillotox® og kasseres. Om brugt filtrerpapir se under *Gram-farvning*.

### 6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Farvning med metylenblåt anvendes som et vigtigt supplement til Gramfarvning ved mikroskopi af spinalvæske, pus og andet biologisk materiale, idet således farvede præparater giver oplysning både om hvide blodlegemer og andre vævsceller og bakterier, mens erythrocytter i reglen er lyseret. Det skal anføres, at et metylenblåt-farvet præparat efter fjernelse af olien med xylen i nødsfald kan gramfarves med brugbart resultat; dog skal alkoholdifferentieringen i så fald udstrækkes til 1 min. (Thomsen 1917).

*Referencer:* se referencelisten efter kapitel 5.

## *Kapitel 3*

### **Gram-farvning**

#### **1. Historisk indledning**

Denne, den vigtigste bakteriologiske farvemethode, udvikledes af danskeren Gram (1884) under et ophold hos Friedländer i Berlin. Grams metode blev oprindelig udviklet til at påvise kokker i snitpræparater af lungevæv fra pneumonipatienter.

Gram havde arbejdet på at lave en dobbeltfarvning af nyresnit med anilino-gentianviolett og jod for at opnå blå kærner og brune urincylindre, og han observerede tilfældigt, at de anilino-gentianviolett-farvede præparater, som ellers vanskeligt affarvedes af alkohol, blev fuldstændigt affarvet af alkohol efter forudgående behandling med en jod-jodkalium-opløsning. På baggrund af disse observationer udarbejdede Gram sin berømte farvemethode, som fik kokkerne, der forårsagede lungebetændelse, til at fremtræde stærkere farvet end ved nogen tidligere metode, mens kærner og andre vævselementer blev affarvet af alkoholen; det var den første farvemethode, hvor kærner og bakterier ikke farvedes samtidigt (Unna 1888). Grams farveprocedure varede 15 min. og bestod i en farvning med Ehrlich's anilino-gentiana-opløsning (eller fuksin), efterfulgt af bejdsning med en vandig opløsning af jod-jodkalium kaldet Lugol's opløsning, som var almindeligt brugt til farvning blandt bakteriologer og botanikere på den tid (cit. fra Hucker & Conn 1923), og en affarvning med absolut alkohol. Gram fandt, at en række forskellige bakterier derved blev farvet sortrøde, mens andre som fx. tyfusbakterier affarvedes, men ligesom vævselementer kunne synliggøres ved hjælp af kontrastefarvning med fx. Bismarck-brunt eller vesuvin. Den lange farvetid der efter Koch (1882) krævedes til TB-bakterier nødvendiggjorde ved gramfarvning af disse ligeledes en farvetid på 12-24 timer. Gram omtalte ikke den taxonomiske betydning af sin farvemethode, men dens differential-diagnostiske muligheder blev i hvert fald hurtigt erkendt (Hueppe 1885 og en række forfattere i 1886, cit. fra Austrian 1960 og Bartholomew & Mittwer 1952). Omkring århundredskiftet blev metoden søgt standardiseret med henblik på anvendelse som pålideligt middel i species-differentieringen (Neide 1904).

Grams farvemethode er blevet modificeret af mange, bl.a. Weigert (1887) og Nicolle (1895), ved anvendelse af forskellige farvestoffer (fx. karbolsyregentianaviolet, krystalviolet og metylviolet), forskellige affarvningsmidler til differentiering mellem grampos. og -neg. bakterier (absolut alkohol, absolut alkohol + 5% salpetersyre, metylalkohol, acetone, alkoholacetoneblanding, xylen i anilinoilie) og forskellige kontrastfarvestoffer (fx. fuksin og neutralrødt). Den udformning, som i en kun lidt ændret form bruges i dag på Serum-instituttet, er beskrevet i 1912 af Vilhelm Jensen.

I 1923 foretog Hucker & Conn en sammenligning af de mange forskellige modifikationer af metoden og konkluderede, at de to bedste var Atkin's og Hucker's, som begge indeholder lidt bejdse i farvevæsken og bruger alkohol til affarvning. Hucker's metode anvendes stadigvæk meget i USA, mens Lillie's metode (1928) med acetone til affarvning benyttes af mange i England (Cowan 1974).

## 2. Biokemisk baggrund

I korte og stærkt forenklede træk sker der antagelig følgende under de forskellige trin i Grams farvemethode: Det basiske farvestof krystalviolet bindes til sure grupper i bakterieceller. Med krystalviolet danner jod-molekyler sortblå præcipitater, som i gramneg. bakterier igen lader sig udtrække med 95% alkohol, mens de forbliver i grampos. bakterier. De affarvede gramneg. bakterier farves påny ved en efterfarvning med karbolfuksin. Trods næsten 100 års forskning er der dog ikke opnået fuld enighed om mekanismen ved Grams farvemethode. I det følgende skal de enkelte trin og de vigtigste teorier gennemgås. Der henvises i øvrigt til arbejder af Bartholomew & Mittwer (1952), Wensinck & Boevé (1957), Salton (1961, 1963) og Biswas et al. (1970).

Indledningsvis skal det understreges, at ingen af de traditionelt anvendte reagenser er specifikke for Gram-differentieringen, idet ethvert farvestof og enhver bejdse kan anvendes, hvis farvestoffet farver cellen tilstrækkeligt intenst, og hvis blot farve-bejdse-præcipitatet er dårligt opløseligt i alkohol og relativt uopløseligt i kontrastfarve-opløsningen (Bartholomew & Mittwer 1951). Også selve farveprocedurens trin kan afkortes og modificeres til to trin (Scales 1922; Adams 1975) eller trinene forkortes drastisk, så hele proceduren kun tager 15-20 sekunder mod normalt 3-4 min. (Norris & Swain 1971).

### *Farvning med krystalviolet*

Gram anvendte oprindelig gentianaviolet eller fuksin; siden er der brugt metylviolet, krystalviolet og mange andre basiske farvestoffer, som kan præcipitere i et kompleks med jod. Sure farvestoffer kan ikke anvendes. Krystal-

violet er mere stabilt, veldefineret og ensartet end de tidligere benyttede farvestoffer (Bartholomew & Mittwer 1950). pH i farvevæsken skal være basisk. Bejdse (fx. ammoniumoxalat) i farvevæsken gør affarvningstiden mindre kritisk (Hucker & Conn 1923). Bartholomew (1962) foretrækker relativt høje koncentrationer af krystalviolet ( $\geq 2\%$ ), da affarvningstiden ellers bliver kritisk snæver. Han opnår samme resultat med de anvendte gramneg. og grampos. bakterier med farvetider fra 15 sekunder til 5 min., hvorfor 1 min. er udmærket. Wensinck & Boevé (1957), som undersøgte Gram-farvningen kvantitativt, fandt ved anvendelse af levende *E. coli* og *S. aureus* i suspensioner, at grampos. og -neg. bakterier optog samme mængder krystalviolet, og at optagelsen hos begge arter viste samme pH-afhængighed.

#### *Bejdsning med jod*

Gram anvendte Lugol's IIK. Kun enkelte andre stoffer som brom og pikrinsyre kan erstatte jod, men ingen af dem er så velegnede som dette (Mittwer et al. 1950). Et stofs evne til at erstatte jod i Gram-farvningen er korreleret med dets evne til med et farvestof at give præcipitater, som kun er dårligt opløselige i alkohol og relativt uopløselige i den vandige kontrastfarve-opløsning. IIK bliver surt ved henstand, hvilket kompromitterer dets funktion, og derfor anvender nogle basisk jodopløsning. IIK er kun holdbart i kort tid; hvis flasken står åben og temperaturen er 25°C, kan mængden af reaktivt jod falde til 40% af det oprindelige på 30 dage. Af den grund er stabile jodoforer med held benyttet af Magee et al. (1975) til Gram-farvning. Med øget jodkoncentration (op til 1% i en vandig IIK-opløsning) øges spillerummet for affarvningstidens varighed. Der opnås samme resultat med jodbehandling fra 15 sek. op til 5 min., og 1 min. er derfor udmærket (Bartholomew 1962). Wensinck & Boevé (1957) fandt, at farvestofjodkomplekserne dannes i det molekylære forhold 1:1-1:2, og det er samme slags komplekser ved gramneg.- og -pos. bakterier.

#### *Differentiering (affarvning) med alkohol*

Gram anvendte absolut alkohol (ætanol), men 95% alkohol er lige så godt, mens yderligt faldende koncentrationer giver tiltagende usikre resultater, og 60% alkohol giver ingen forskel på grampos. og -neg. bakterier. Det er derfor vigtigt, at alkohol og skyllevand ikke blandes sammen (Hucker & Conn 1923). For at opnå en tilfredsstillende affarvning må præparatet på intet tidspunkt blive tørt efter farvningen er begyndt, da affarvningstiden ellers stiger. Affarvningstiden falder med stigende temperatur (Bartholomew & Mittwer 1952; Bartholomew 1962; Tucker & Bartholomew 1962). Stigende alkoholopløselighed af farvestof-jod komplekser dannet af forskellige farvestoffer

giver aftagende differentiering mellem grampos. og -neg. bakterier (Bartholomew & Mittwer 1951). Anvendelse af andre alkoholer end ætanol som affarvningsmidler har været forsøgt, men jo højere alkoholen er, des langsommere affarver den. Metylalkohol affarver for hurtigt, og acetone affarver også meget hurtigt, men har været brugt med held (Lillie 1923). Langsommere affarvningsmidler har været forsøgt med vekslende held: kloroform, overfladeaktive stoffer, fortyndede syrer, alkohol-syreblandinger, natriumthiosulfat og saltopløsninger (Bartholomew & Mittwer 1952). Bartholomew (1962) foretrækker *n*-propylalkohol (som ikke nyder toldvæsenets bevågenhed), da den giver større spillerum for affarvningstiden end ætanol og især acetone. Med 95% ætanol og "fugtige" præparater (dvs. at de stadig er lidt fugtige efter afskylning af IIK) kan affarvningstiden for de anvendte grampos. og -neg. bakterier til korrekt differentiering varieres mellem 15 sek. og 3 min. Han anbefaler derfor 1½ min. Vand i affarvningsmidlet (op til 20%) øger affarvningshastigheden og mindsker spillerummet. Lave koncentrationer af krystalviolet eller jod i affarvevæsken kan ved nogle procedurer forlænge affarvningstiden og øge spillerummet for affarvningstiden (Bartholomew 1962). Wensinck og Boevé (1957) har vist, at Gram-differentiering også kan foretages på levende, ikke-fikserede *S. aureus* og *E. coli* i opløsninger der først er farvet med krystalviolet. Efter farvning af grampos.- og -neg. bakterier med krystalviolet medfører behandling med alkohol samme grad af affarvning, men hvis bakterierne efter krystalviolet-farvningen har været jodbehandlede, afgiver de gramneg. bakterier en større mængde af krystalviolet-jod komplekset end grampos. Denne forskel opnås kun, når alkoholkoncentrationen ligger mellem 80 og 100%. Man kan vise, at kurven for kompleksets ekstraktion af gramneg. bakterier med forskellige alkoholkoncentrationer svarer til en kurve over krystalviolet-jodpræcipitaters opløselighed i forskellige ætanolkoncentrationer, og det tyder på, at ætanol passerer frit gennem væggen i gramneg. bakterier. Fra grampos. bakterier ekstraheres ved lave alkoholkoncentrationer samme mængde af komplekset som fra gramneg. bakterier, men ved højere koncentrationer af alkohol indtræder en brat ændring, idet den ekstraherede mængde fra de grampos. bakterier bliver meget mindre. Forsøgene tyder på, at forskellen mellem grampos.- og -neg. bakterier ligger i, at koncentreret alkohol har vanskeligere ved at trænge ind i de grampos. end i de gramneg. bakterier.

#### *Efterfarvning (kontrastfarvning) med karbolfuksin*

Gram anvendte Bismarck-brunt eller vesuvin. Siden har man anvendt fuksin, neutralrødt eller, som foretrukket af Hucker & Conn (1923) og Bartholomew (1962), safranin. Stigende opløselighed i kontrastfarveopløsningen af farvestof-jod komplekset giver aftagende differentiering mellem grampos.- og

-neg. bakterier (Bartholomew & Mittwer 1951). 'Replacement'-effekten af kontrastfarven er proportional med dennes koncentration og af kontrastfarvetiden, så disse to faktorer må standardiseres i overensstemmelse hermed (Bartholomew & Mittwer 1952): kontrastfarvning med 0,25% safranin kan erstatte jod-farvestof komplekset i grampos. bakterier på  $\frac{1}{2}$  time. En efterfarvningstid på 1 min. anbefales af Bartholomew & Mittwer (1951). Afskylning af overskydende kontrastfarve med vand bør være kortvarig (5 sek.), da farven hurtigt vaskes ud (Bartholomew 1962).

#### *Vaskeprocedurer mellem de enkelte trin i Gram-farvningen*

Gram anvendte ikke skylning med vand mellem de enkelte trin i sin farvemethode, og mange bruger kun afskylning med vand efter alkoholaffarvningen og efter kontrastfarvningen. Bartholomew (1962) har undersøgt betydningen af vandafskylning mellem de enkelte trin, og hans konklusioner gengives her: Overskydende krystalviolet vaskes af med vand for at undgå jodfarvestof-præcipitater på objektglasset. Man risikerer herved affarvning af grampos. bakterier, men ikke ved skylning i 5-15 sek., som er tilstrækkeligt. Vask efter jodbejdningen er risikofrit, da jod-farvestof komplekset er langsomt udvaskeligt. Efter affarvning med alkohol er skylning med vand igen risikabelt, dels fordi meget af jod-farvestof komplekset er fjernet af alkoholen, dels fordi en blanding af alkohol med vand affarver hurtigere end koncentreret alkohol, men 5 sekunders afskylning er risikofrit. Afskylning af kontrastfarven med vand bør ligeledes være kort, da kontrastfarven hurtigt vaskes ud, hvorved gramneg. bakterier bliver usædvanligt små eller blege. 5 sek. er også her risikofrit. Afskylningerne kan foretages ved at dyppe objektglasset 5 sek. i rindende vand i et kar, men kan også udføres ved at holde glasset under en rindende vandhane i 5 sek. Bartholomew anbefaler afskylning med vand efter hvert trin efter de lige anførte regler.

#### *Andre faktorer med indflydelse på Gram-farvningen*

En bakteriearts Gram-farvbarhed afhænger af kulturens alder. Kraftigst grampositive er unge kulturer (< 24 timer), og efter 3 døgn har grampos. bakterier tendens til at blive gramnegative. Nogle få bakteriearter forholder sig dog omvendt. Det anbefales derfor at lave præparater af kulturer af varierende alder (12 timer og op til flere dage, og ved termofile bakterier allerede efter 6-8 timer) og at lave mindst 3 præparater fra hver kultur, men trods dette vil nogle arter (*Neisseria*) vise sig at være gramvariable (Hucker & Conn 1923). I prøvemateriale fra antibiotika-behandlede patienter kan grampos. bakteriers vægge være beskadigede, så de ved farvningen præsenterer sig som gramnegative. For kraftig varmefiksering får grampos. bakterier til at blive gramneg.

Tykk præparater er vanskelige at affarve, og store, tykke masser af bakterier skal undgås, når farveresultatet skal bedømmes. Fysisk kontakt af præparatet med hårde genstande, fx. kanten af et andet objektglas, forårsager arealer med gramneg. bakterier i et ellers grampos. præparat på grund af læsion af cellevæggene (Bartholomew & Mittwer 1952).

*Teorier, der søger at forklare Gram-differentieringen*

(1) Den kemiske teori: Grampos. bakterier besidder specifikke kemiske gramfarvbare substanser, som ikke findes i gramneg. bakterier.

(2) Isoelektrisk punkt-teorien: Grampos. bakterier har mere surt protoplasma, dvs. lavere isoelektrisk punkt, hvorfor de tilbageholder mere farvestof end gramneg. bakterier.

(3) Permeabilitetsteorien: Forskelle i grampos. og -neg. bakteriers cellevægges opbygning betinger særlige permeabilitetskarakteristika ved grampos. celler over for stoffer som alkohol, jod eller jod-farvestof-præcipitat.

(4) En underafdeling af den kemiske teori, som går ud på at grampos. bakterier har en særlig grampos. cortex.

Disse teorier er diskuteret af Bartholomew & Mittwer (1952), Wensinck & Boevé (1957), Salton (1961, 1962), Bartholomew (1962) og Biswas et al. (1970). Der er stærke eksperimentelle holdepunkter for, at permeabilitets-teorien er rigtig (Benians 1920; Burke et al. 1929; Wensinck & Boevé 1957; Salton 1961, 1962; Kandler & König 1978), mens lignende solid eksperimentel støtte ikke findes for de tre andre teorier. Saltens forklaring er, at gramneg. bakteriers cellevæg indeholder meget lipid, mens grampos. bakteriers cellevæg har et meget stort indhold af muco-peptid. Det sidste kunne føre til at grampos. cellevægge dehydreres under affarvningen, så farvestof-jod komplekset bliver vanskeligere tilgængeligt for alkohol. Der er i øvrigt en vis lighed i mekanismen ved Gram-farvning og Ziehl-Neelsen-farvning, og ved tilstrækkelig intensiv farvning fremstår tuberkelbakterier grampos., sådan som Gram viste det i 1884. Man kan også i nogle tilfælde efter en almindelig Gram-farvning se mykobakterier, som mere eller mindre kraftigt farvede grampos. stave; omvendt kan man ikke regne med altid at påvise mykobakterier ved en standard Gram-farvning.

*Fysiologiske egenskaber korreleret til Gram-farvbarheden*

En lang række fysiologiske egenskaber er korreleret til Gram-farvbarheden (Bartholomew & Mittwer 1952; Salton 1961, 1962). Her skal blot nævnes, at gramneg. bakterier er mere følsomme for plasmas lyserende effekt og for nogle kemikalier, fx. toluol, men mindre følsomme over for G-penicillin og krystalviolet end grampos. bakterier.

### 3. Valg af metode

På Serum-instituttet har vi i mange år brugt en modificeret udgave af Vilhelm Jensens metode fra 1912. På baggrund af de grundige undersøgelser foretaget af Hucker & Conn (1923) og Bartholomew (1962) må man nok erkende, at metoden kunne forbedres, omend gevinsten næppe vil blive stor. Indførelsen af jodofor i stedet for IIK (Magee et al. 1975) og anvendelse af hurtigmetoder i travle rutinelaboratorier (Norris & Swain 1971; Adams 1975) eller automatiske Gram-farvemaskiner (Ryan et al. 1973; Burdash et al. 1976) ville snarere lønne sig. Hurtigmetoder er allerede taget i brug i nogle af Serum-instituttets regionalafdelinger. Modificerede metoder til farvning af formalin-fikserede paraffinsnit er bl.a. publiceret af Engbæk et al. (1977).

### 4. Teknisk udførelse

#### *Reagenser*

Krystalviolet til Gram-farvning: 0,2% krystalviolet, 3% anilin og 10% ætanol opløst i sterilt destilleret vand, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. pH skal være basisk, gerne 9,0. Holdbarhed ved stuetemperatur ca. 3-4 uger.

Jod-jodkalium 1+2+300: 0,33% jod + 0,67% kaliumjodid i dest. vand, opbevares i brun flaske med prop eller skruelåg. pH skal være basisk. Holdbarhed ca. 3-4 uger.

96% alkohol (ætanol): opbevares i klar flaske med slebet prop.

Karbolfuksin 1+9: 0,1% basisk fuksin, 1% ætanol og 0,5% fenol i dest. vand, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. Holdbarhed ca. 1 måned ved stuetemperatur.

*Udførelse:* Det varmfiksede tørpræparat overhældes med krystalviolet og henstår i 1 min. Krystalviolet afskylles med IIK og henstår med IIK i 1 min. IIK afskylles med alkohol og henstår i ca. 20 sek. under sagte vugning. Kort afskylning (ca. 5 sek.) af alkoholen under vandhane. Farvning med karbolfuksin i  $\frac{1}{2}$  min. Kortvarig afskylning (ca. 5 sek.) med vandhanevand. Aftrykning med filtrerpapir.

*Mikroskopi:* Gram-differentiering: grampos. bakterier er sortblå, gramneg. er røde.

#### *Grampositiv, gramnegativ, gramvariabel, Gram-Dauer*

Gram-differentiering repræsenterer en bred skala, hvor to organismer kan være snævert eller vidt adskilt. Grampos. betyder, at organismen beholder jod-farvestof komplekset og derfor stadig er sortblå efter affarvning (dif-

ferentiering) med alkohol. Gramneg. betyder, at organismen har mistet jodfarvestof-komplekset efter affarvningen og altså er farveløs. Kontrastfarven har intet med selve Gram-differentieringen at gøre. Gram-variabel betyder, at organismen er inkonstant i sin reaktion på Gram-differentieringen. Disse forhold afspejles også i udtrykket Gram-Dauer (Neide 1904), som er den tid der kræves for at affarve en mikroorganisme under standardiserede betingelser. Affarvningsendepunktet er imidlertid svært at etablere, da cellerne i en kultur ikke alle affarves samtidigt. Sommetider ses grampos. pletter i ellers gramneg. celler. Forklaringen kendes ikke, men sådanne grampos. intracellulære korn tager man ikke hensyn til ved vurdering af præparatet. Foruden Gram-differentieringen giver præparatet oplysninger om mængde, størrelse, form og indbyrdes lejring af bakterier. Derimod egner præparatet sig ikke godt til bedømmelse af andre slags celler, fx. hvide blodlegemer; her er farvning med metylenblåt bedre. Om Gram-farvning af tuberkelbakterier se afsnittet *Teorier der søger at forklare Gram-differentieringen*, p. 32.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen specielle. Brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand eller 2% Bacillotox® og kasseres. Filtrepapir til aftrykning af præparater smides i autoklavespand, også for at undgå at bakterier, der er blevet hængende i papiret, overføres til et nyt præparat, hvor de kan give anledning til forkerte resultater.

## 6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Gram-metoden anvendes til direkte farvning af prøvemateriale, inklusive vævsnit og til farvning af rendyrkede kulturer. En skelnen mellem grampos. og gramneg. egenskaber er tillige med erkendelsen af bakteriernes form og evne til svømmende bevægelse udgangspunktet for alle yderligere diagnostiske undersøgelser. Derfor kan en mislykket eller fejlvurderet Gram-farvning resultere i, at en diagnose ikke kan stilles. Det er derfor også en hovedregel, når en diagnose ikke kan stilles på grundlag af foreliggende data, at gentage Gram-farvningen med særlig omhu og med hensyntagen til alle de kendte forhold, der kan påvirke udfaldet. Hvad angår fejkilder henvises til omtalen af de enkelte trin i farvemethoden under *Biokemisk baggrund*.

Om Gram-farvning af metylenblåt-farvede præparater se kapitel 2.

*Referencer:* se referencelisten efter kapitel 5.

## *Kapitel 4*

### **Ziehl-Neelsen-farvning**

#### **1. Historisk indledning**

Det var ikke lykkedes for Koch med hans generelle farvemethode i 1877 at påvise årsagen til tuberkulose. I 1882 offentliggjorde han en stor undersøgelse, hvor han i tuberkuløst væv regelmæssigt påviste en stavformet bakterie, der ikke kunne farves med de tidligere anvendte farvemethoder, men farvedes ved hjælp af en alkalisk opløsning af metylenblåt (de almindeligt brugte farveopløsninger var neutrale eller sure) og en farvetid på næsten 1 døgn. I væv var bakterierne blå på brun baggrund efter kontrastfarvning med vesuvin. Ved opvarmning til 40°C kunne farvetiden dog afkortes til  $\frac{1}{2}$ -1 time.

Koch's metode til TB-farvning blev kort tid efter forbedret af Ehrlich (1882), som benyttede alkoholisk fuksin eller metylviolet i vandig opløsning mættet med anilinolie. Herved kunne farvetiden nedsættes til  $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$  time. Ehrlich anvendte affarvning med salpetersyre og kontrastfarvning med gult eller blåt farvestof.

Ziehl (1882, 1883) modificerede Ehrlich's metode, idet han anvendte metylviolet eller metylgrønt og senere også fuksin i en karbolsyre-opløsning, og han viste desuden, at farvningen sker meget hurtigere ved højere temperatur. Neelsen (1883) brugte fuksin i en karbolsyre-opløsning og affarvning med 25% svovlsyre, og siden har hovedmetoden til farvning af TB-bakterier heddet Ziehl-Neelsen's metode (Bishop & Neumann 1970).

I Danmark indførte K.A. Jensen (1925) Bender's modifikation (1921, 1922) af Ziehl-Neelsen-farvningen med anvendelse af pikrinsyre som kontrastfarve, og med små ændringer har denne metode siden været brugt her i landet (Jensen 1954; Engbæk et al. 1969).

Ziehl-Neelsen's farvemethode er modificeret af bl.a. Randolph & Neekel (1944), Muller & Chermock (1945), Aubert (1950), Gross (1952) og Pottz et al. (1964) ved tilsætning af opløsningsmidler eller detergenser til karbolfuksinet, hvorved opvarmning under farvningen kunne undlades, uden at farvetiden forlængedes ("kold Ziehl-Neelsen").

## 2. Biokemisk baggrund

I korte, forenklede træk sker der følgende under de forskellige trin i Ziehl-Neelsen's farvemethode: Det basiske røde farvestof fuksin bindes til sure grupper i bakteriecellen, men for at tuberkelbakterier skal kunne optage farvestoffet kræves særlige forholdsregler: koncentreret fuksin tilsat fenol (karbol) og opvarmning under farvningen. Ved den efterfølgende intensive affarvning med fortyndet syre og 95% alkohol bevarer de syre-alkoholfaste tuberkelbakterier farvestoffet, mens andre bakterier og celler affarves. For at lette mikroskoperingen gør man det affarvede væv synligt med en let kontrastfarvning med fx. det gule, sure farvestof pikrinsyre, der især farver cytoplasma. Andre kontrastfarver som metylenblåt eller malakitgrønt bruges også, men er angiveligt pikrinsyren underlegne (Bender 1921, 1922; Jensen 1925).

Årsagen til syrefastheden, som i reglen ledsages af alkoholfasthed, er blevet udforsket intensivt. Koch (1882), Ehrlich (1882) og senere forfattere har vist, at mykobakterier ikke farves ved almindelige farvemethoder, men kræver basisk pH eller tilsætning af fenol eller detergenser, lange farvetider, højere farvestofkoncentration eller opvarmning for at blive farvede. Til gengæld modstår mykobakterier derefter energiske affarvningsforsøg med fortyndede syrer og alkohol. Ehrlich (1882) mente, at dette skyldtes egenskaber ved cellevæggen, og Koch viste i samarbejde med Proskauer (Koch 1897), at syre-alkoholfastheden skyldtes lipider i cellerne.

Senere har mange forskere arbejdet med at analysere mykobakteriernes cellevæg og deres lipidindhold og har bekræftet og forenet Ehrlich's og Koch's teorier (Bullock & McLeod 1904; Tamura 1913; Anderson 1932; Yegian & Vanderlinde 1947; Kotani et al. 1959; Takeya et al. 1963, Murohashi et al. 1969; Lederer 1971; Goren 1972). 20-40% af tørvægten af mykobakterier udgøres af lipid og 60% af cellevæggens tørstof er lipid, hvilket er langt mere end i andre bakterier. Det inderste lag af cellevæggen i mykobakterier er meget rigtigt, indeholder ikke ret meget lipid og ligner grampos. bakteriers cellevæg, mens resten af cellevæggen mere ligner gramneg. bakteriers cellevæg, dog med et meget højere lipidindhold (Takeya et al. 1963). Kun intakte celler er syrefaste, og mekanisk beskadigelse af cellevæggen får cellerne til at miste syrefastheden (Yegian & Porter 1944; Murohashi et al. 1969). Med trinvis ekstraktion af lipider fra intakte celler reduceres syrefastheden gradvis og forsvinder, når bundet lipid er ekstraheret (Murohashi et al. 1969).

Blandt lipiderne i mykobakterier har især voksarterne (estere af højere fede syrer med alkoholer med lange kæder) været relateret til syrefastheden, og blandt disse er mykolsyre, som kun er fundet i cellevæggen hos slægterne *Mycobacterium* og *Nocardia* samt hos nogle corynebakterier, som derfor også

er syrefaste. Den sandsynligste forklaring på syre- og alkoholfastheden er formentlig den fysiske struktur af mykobakteriers cellevæg, hvis indhold af lipid i tæt kombination med andre stoffer udgør en barriere for farvning og affarvning af bakteriecellen (Murohashi et al. 1969).

### 3. Valg af metode

Foruden den klassiske Ziehl-Neelsen-farvemethode, der benytter sig af opvarmning for at afkorte farvetiden, er der udviklet "kolde" Ziehl-Neelsen-metoder, hvor der i stedet tilsættes et detergens til karbolfuksinet (se *Historisk indledning*) og hvor affarvning og kontrastfarvning foregår i eet trin (Pottz et al. 1964). Endvidere er der udviklet en "strip"-metode, hvor der benyttes karbolfuksin-imprægnerede filtrerpapirstykker (Varughese et al. 1974), samt farvemethoder der bygger på et helt andet farveprincip, nemlig farvning med fluorescerende farvestoffer (se fx. Bennedsen & Olesen Larsen 1966), og disse metoder har kunnet automatiseres (Clancey et al. 1976; Heimer et al. 1978). De modificerede metoder har deres store berettigelse i laboratorier, hvor man har mange undersøgelser for tuberkelbakterier. I almindelige klinisk-mikrobiologiske laboratorier står man sig ved at anvende den simple, gennemprøvede Ziehl-Neelsen-metode, som ikke kræver særlig ekspertise eller udstyr (Jensen 1954; Engbæk et al. 1969), og som også kan benyttes til histologiske vævsnit (Jensen 1954; Greenwood & Fox 1973). Tilsætning af fortyndinger af BCG-vaccine til mukopurulent sputum har været anvendt som kontrol af en syre-alkoholfast farveteknik (Pybus 1974).

### 4. Teknisk udførelse

*K.A. Jensens metode beskrevet i 1954, modificeret lidt af Engbæk et al. (1969): "Dansk Ziehl-Neelsen"*

#### *Reagenser*

"Karbolfuksin (conc.)": 1% basisk fuksin, 5% fenol, 10% ætanol i dest. H<sub>2</sub>O, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. Holdbarhed: måneder.

25% svovlsyre

96% alkohol (ætanol)

0,75% pikrinsyre i dest. H<sub>2</sub>O, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. Holdbarhed: måneder.

#### *Udførelse*

Det varmfikserede tørpræparat dækkes med filtrerpapir, som overhældes med 1% karbolfuksin. Med Bunsen-brænder eller på varmeplade (75°C) holdes temperaturen netop under kogepunktet i 3 min. (præparatet damper). Afskylning under vandhane.

Affarvning: 25% svovlsyre i 3 min., afskylning under vandhane, 25% svovlsyre igen i 3 min. og afskylning under vandhane, 96% alkohol i 3 min., afskylning under vandhane, 25% svovlsyre i få sek., afskylning under vandhane. Kontrastfarvning med 0,75% pikrinsyre i 15 sek. Afskylning under vandhane.

Tørring af præparatet: nyt filtrerpapir til hver præparat for at undgå overførsel af tuberkelbakterier til næste præparat. Af samme grund bør farveskåle ikke benyttes.

*Mikroskopi:* Syre-alkoholfaste bakterier er røde, mens alt andet farves gult. Tuberkelbakterier ser ofte kornede ud (Much-granula) eller kan indeholde kugleformede legemer, der opdriver cellen. Dette skyldes formentlig artefakts på grund af farvningen, men der hersker ikke fuld enighed herom (Porter & Yegian 1945; Lamanna 1946; Mudd et al. 1951). Mekanisk beskadigelse af præparatet ved udstrykning eller skæring med mikrotom giver arealer med ikke-syrefaste bakterier i et ellers syrefast præparat (Yegian & Porter 1944).

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ved fremstilling af præparater fra prøvemateriale, der kan indeholde tuberkelbakterier, skal der på grund af smitterisikoen udvises særlig forsigtighed. Stinkskabe eller steril-bænk med udsug bør altid anvendes. Brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand og kasseres. Om brugt filtrerpapir se under *Udførelse* og under *Gram-farvning*.

## 6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Ziehl-Neelsen-farvning anvendes ved direkte mikroskopisk undersøgelse af biologisk materiale for indhold af syre-alkoholfaste bakterier. Da bakterierne ofte er til stede i ringe mængde, skal præparatet gennemsøges grundigt, mindst 25 synsfelter ved 800 x forstørrelse spredt over hele præparatet (Engbæk et al. 1969). Farvemetoden har taxonomisk værdi, da kun slægterne *Mycobacterium* og *Nocardia* samt enkelte corynebakterier, bakteriesporer og svampesporer er syrefaste; mykobakterier dog i betydelig højere grad end de øvrige. For de øvriges vedkommende og for *M. leprae* anvendes derfor en modificeret udgave af Ziehl-Neelsens metode uden affarvning med alkohol og evt. med mere fortyndet syre og kortere affarvningstid (Cruickshank 1969).

*Referencer:* se referencelisten efter kapitel 5.

## *Kapitel 5*

### **Flagelfarvning**

#### **1. Historisk indledning**

I 1889 og 1890 offentliggjorde Loeffler en ny metode til at farve bakterier og især deres svingtråde. Duske af svingtråde fra nogle bakterier havde kunnet farves med Koch's metode, men de enkelte svingtråde havde ikke kunnet erkendes. Loeffler's nye princip bestod i en bejdsning før farvningen, et princip som længe havde været brugt ved farvning af tekstil. Loeffler bejdsede præparatet med en vandig opløsning af tannin, ferrosulfat og Campeche-træ-afkog efterfulgt af farvning med en svagt alkalisk anilinopløsning af metylenblåt eller fuksin eller metylviolet. På denne måde kunne de tynde svingtråde gøres tilstrækkeligt tykke til at blive synlige i lysmikroskopet.

Loeffler's flagelfarvning blev forbedret af Zettnow (1899), som indførte bedre bejdsere (jernoxydbejdse, kieselguhr-bejdse, antimonbejdse) og farvning af præparaterne med guld- eller sølvsalte, der udfældedes som metallisk guld og sølv på bakterierne og deres bejdsede svingtråde. En modificeret og forenklet metode indførte Plimmer & Paine (1921), idet de anvendte en opløsning med bejdse og farvestof samtidigt. Et lignende princip er videreudviklet af Leifson (1930, 1938, 1951, 1960, 1961), og hans metode anvendes stadigvæk i diagnoseafdelingen på Serum-instituttet, hvor den har afløst Zettnow's metode, der brugtes af Martin Kristensen (1955). En teknisk mere simpel metode byggende på farvning af fugtigt præparat er udarbejdet af Mayfield & Inniss (1977), men den har endnu ikke været rigtig gennemprøvet på Serum-instituttet. I det følgende omtales kun Leifson's metode til flagelfarvning.

#### **2. Biokemisk baggrund**

De fleste bakteriesvingtråde har en diameter på 0,01–0,03  $\mu\text{m}$ , dvs. de skal gøres ca. 10 gange tykkere for at kunne ses i lysmikroskop. Denne fortykkelse opnås ved anvendelse af bejdse foruden farvestof. Ved Leifson's metode anvendes en opløsning, der både indeholder det basiske farvestof, tannin som bejdse og NaCl som elektrolyt. Mellem det basiske farvestof og den sure bejdse dannes et kolloidt præcipitat, som er mere opløseligt i alkohol end i vand, hvorfor

komponenterne er opløst i 33% alkohol, som ved denne koncentration lige netop forhindrer, at tannin-fuksin komplekset præcipiterer. Når farvævæsken hældes på præparatet, fordamper alkoholen hurtigere end vand, hvorfor tannin-fuksin komplekset præcipiterer, når alkoholkoncentrationen er kommet ned på 20-25%, og bindes til flageller og cellelegemer. Elektrolyttens betydning er formentlig en effekt på den relative elektriske ladning på tannin-fuksin komplekset og på flagellen. Jo højere elektrolytkoncentration des tykkere flagel op til en NaCl-koncentration på 1%. Endnu højere NaCl-koncentration deformerer flagellerne. Tanninkoncentrationen er ikke særlig kritisk, men pH skal helst være  $5,0 \pm 0,2$ . Ved faldende pH ses stadigt tyndere flageller, mens stigende pH giver tiltagende tykke flageller. Andre basiske farvestoffer end fuksin kan også bruges.

I mange tilfælde farves både cellelegeme og flagel røde, i andre farves kun omridset af cellelegemet, og i andre igen farves cellelegemet slet ikke. I sidstnævnte tilfælde kan 1% metylenblåt anvendes som kontrastfarvning af cellerne (Leifson 1951, 1960).

Bakterierne dyrkes på bouillon-agarplade, andet fast medium eller i tryptonbouillon ved en temperatur, der er lavere end optimum for vækst, oftest 20 eller 30°C, hvor flagellerne udvikler sig bedst. Optimal flageldannelse ses i den logaritmiske og i begyndelsen af den stationære væksthase; efter ophør af væksten kan flagellerne ødelægges hurtigere end resten af cellerne. Ved den sædvanlige inkubering ved 35°C natten over er bakterierne langt forbi den logaritmiske væksthase og godt inde i den stationære fase. For lavt pH i dyrkningsmediet kan ødelægge flagellerne, og derfor bør substratet ikke indeholde forgærbare sukkerarter. Flydende medier giver ofte, men ikke altid, bedre flagellering end faste medier. Agar, som overføres med bakterierne til objektglasset, interfererer med farvningen. Fosfat synes at fremme flageludviklingen (Leifson 1960).

### 3. Valg af metode

Leifson's metode har i mange år været anvendt i diagnoseafdelingen som afløser for Zettnow's metode. For at opnå et tilfredsstillende resultat kræves først og fremmest et fuksinsalt, som har vist sig egnet til flagelfarvning (mange af de kommercielle præparater af fuksin er helt uegnede) dernæst kræves friske reagenser, meget grundigt rensede objektglas, omhu ved fremstilling af præparaterne samt øvelse. Tages der højde for disse faktorer, fungerer metoden udmærket. Mayfield & Inniss (1977) har udviklet en metode til flagelfarvning, som ikke kræver specielt rensede glas; den udføres på fugtigt præparat og er teknisk meget enkel. Indtil en sammenligning mellem denne og Leifson's metode foreligger, må sidstnævnte dog anbefales.

#### 4. Teknisk udførelse

*Leifson's metode til flagelfarvning (1951, 1960)*

##### *Reagenser*

Specielt rensede objektglas (se afsnittet om objektglas og dækglas)

Basisk fuksin, 1,2% i 96% alkohol (ætanol)

Tannin 3% i dest. H<sub>2</sub>O

NaCl 1,5% i dest. H<sub>2</sub>O

Opbevares i køleskab i hver sin flaske.

Lige dele af de 3 væsker blandes lige før brugen, og blandingen er straks brugbar, men henstand til næste dag kan være en fordel. Der udvikles gradvis et præcipitat, som *ikke* må rystes op ved brug af farvævæsken. Opbevares i mørk flaske med skruelåg. Holdbarhed ved stuetemperatur 1 uge, i køleskab 1 måned, i dybfryser meget længere, men så skal farvævæsken blandes grundigt før brugen. Når en opløsningsfarvetid er 5 min. længere end en frisk opløsnings, ialt omkring 15 min., bør den kasseres.

*Tryptonbouillon til dyrkning af flagelbærende bakterier*

Bacto-trypton Difco 0,5 %

Gærekstrakt 0,1 %

Sekundært kaliumfosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,05%

Primært kaliumfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,05%

pH ca. 6,8.

Til vask efter centrifugering: redestilleret H<sub>2</sub>O

Til fiksering: formalinstødpude pH 7,5: 20% formaldehyd i  $\frac{1}{15}$  molær fosfatstødpude "Sørensen", pH 7,5.

##### *Udførelse*

Bakterierne dyrkes på fast substrat eller i tryptonbouillon ved 20°C (30°C) natten over og undersøges dernæst for bevægelighed ved mikroskopi af fugtigt præparat. I en bevægelig kultur skal altid findes flageller, ellers er farvningen mislykket, mens en ubevægelig kultur i meget sjældne tilfælde kan have flageller, som ikke er funktionsdygtige (Leifson 1960). Hvis bakterierne er dyrket i flydende substrat, sættes 0,6 ml 20% formaldehydstødpude til 5 ml kultur, dels for at dræbe kulturen, dels fordi nogle bakteriers flageller farves bedst efter formalinbehandling. Dernæst henstår kulturen i 15 min. ved 35°C, hvorefter den centrifugeres ned for fuld styrke (ca. 3000 g) og vaskes 2-4 gange med redestilleret vand. Med bundfaldet fra den flydende kultur eller med kultur direkte fra en agarplade (uden medfølgende substratbestanddele!) laves der en suspension, der er så tynd at man lige netop kan ane turbiditeten.

Ved suspension fra fast medium i redestilleret vand skal man undgå, at kulturmassen på podenålen gnides hårdt imod substratoverfladen eller mod glassets sider, fordi flagellerne afrives som i en kuglemølle, når cellerne kværnes mellem hinanden.

De specialrensede og tørrede objektglas flamberes med en farveløs gasflamme (gul flamme forurener glasset) på den side, hvor præparatet skal være, og opdeles i to halvdele med en tyk fedtblyantstreg. Glassene stilles skråt op ad fx. et reagensglasstativ, på filtrerpapir, og en dråbe bakteriesuspension sættes af med øse lige neden for strengen og et godt stykke inden for kanten, således at dråben af sig selv kan løbe ned ad glasset i lige bane; at den gør det er tegn på, at glasset er rent. Der er plads til to præparater ved siden af hinanden på hvert glas. Når præparatet er lufttørret, lægges glasset *uden* fiksering på det skrå farvestativ som giver glasset en svag hældning fra fedtstrengen ned til enden af glasset, og 1 ml farv væske afsættes med en stangpipette på overfladen. Husk, at bundfaldet i flasken ikke må oprystes, dvs. overskydende farve i pipetten må ikke hældes tilbage i flasken. Der dannes herved et farv væskelag af stigende tykkelse fra fedtstrengen ud mod enden af glasset, og i den tynde del af farvelaget vil der ske en hurtigere udfældning med tættere farveintensitet end i den tykkere del. Farvetiden varierer betydeligt efter farv væsken og de ydre omstændigheder som temperatur og luftfugtighed. Man står sig ved at begynde med at fremstille 3 præparater, som farves henholdsvis 8, 10 og 12 min., hvorefter man tager bestik, indtil den optimale tid er fundet. Hvis farvelaget på objektglasset belyses med en koncentreret stærk lysstråle, kan man se når udfældningen sker og dermed fastslå når farvningen er færdig. Under farvningen dannes der fra glassets rand en metallignende hinde på farv væskens overflade, og når den dækker hele overfladen, er yderligere forlængelse af farvetiden formålsløs.

Uden forudgående afhældning af farven foregår afskylningen med rindende vand ved hjælp af en stråle rettet direkte mod den farvedækkede del af glasset, så al farve på een gang sprøjtes af. En "langsom" afskylning, hvorved farven fra en ende af bortskylles, ødelægger med sikkerhed præparatet. Derefter lufttørring eller tørring med filtrerpapir. Kontrastfarvning er i reglen ikke nødvendig.

#### *Mikroskopisk vurdering af flagelpræparater (Leifson 1951, 1961)*

Ved undersøgelse af præparatet opsøges områder, hvor cellerne ikke ligger for tæt, da det ellers er umuligt med sikkerhed at bedømme flagellernes antal og arrangement på den enkelte celle. Man noterer sig antal flageller pr. celle, deres afgangsteder på cellen og bølgens amplitude og bredde. De forskellige bakterier karakteriseres efter deres flagellering på følgende måde, idet man

anvender et arbitrært index til at fastlægge grænsen mellem polært mono- og multitrike. Index er det tal, som angiver procenten af flagellerede celler med mere end 1 flagel pr. pol (Lautrop & Jessen 1964).

(1) Som polært monotrik karakteriseres bakterier som har et index  $\leq 10$ .

(2) Som polært multitrik karakteriseres bakterier som har et index  $\geq 25$  (ved index-værdier mellem 10 og 25 kan bakterierne ikke karakteriseres med hensyn til flagelleringen uden nærmere undersøgelse, se Lautrop & Jessen 1964).

(3) Som peritrik karakteriseres bakterier hvor flagellerne udgår spredt fra alle sider af cellen.

(4) Som subpolært flagellerede karakteriseres bakterier hvor alle flagellerne – een eller flere – udgår tæt under polen ofte retvinklet på cellens hovedakse.

(5) Som mixed flagellerede karakteriseres bakterier som essentielt er polært flagellerede, men hvor der samtidigt er udviklet laterale flageller af en anden bølgebredde.

*Individuel flagelmorfologi:* Almindeligvis har flageller form som en helix; afstand fra bølgetop til bølgetop kaldes bølgebredden, og udslaget fra bølgedal til bølgetop kaldes amplituden (Leifson et al. 1955; Leifson 1960). En del særlige flageltyper har fået særlige navne: ved curling forstås at der optræder flageller med netop halvt så stor bølgelængde som de øvrige; ved coiling forstås at flagellernes ender krummer tilbage mod celleoverfladen, så flagellerne ligner en række løkker langs cellen; ved undulation er amplituden meget lille og bølgebredden som regel stor; næsten lige flageller uden bølger kan ses (Leifson & Hugh 1953; Leifson 1960). Leifson (1961) mener, at bortset fra curling fremkaldes disse varianter formentlig overvejende af formalinbehandlingen, men vore erfaringer tyder på, at medens coiling kan skyldes formalinbehandlingen før farvningen, er de øvrige varianter vist betinget af variationer i flagellinets bygning. Ofte ses afrevne frie flageller, især har peritrikt flagellerede bakterier tendens til at tabe flagellerne. Såkaldte pseudo-flageller (Thjotta & Kåss 1946) er enten sammensnoede hobe af fimbriae eller slim og andet materiale fra kulturerne, som organiserer sig som tråde der kan forveksles med flageller, men som regel kan skelnes fra disse ved, at de næsten altid mangler helixform og i det hele er af meget vekslende længde og udseende, modsat flagellernes ret ensartede præg i et givet præparat.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige; brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand eller 2% Bacillotox® og kasseres.

## 6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Den taxonomiske betydning af flagelantal og -arrangement og i mindre grad deres bølgebredde er stor ved species-diagnostik af gramnegative, oxidase-positive stavbakterier, mens flagelfarvning sjældnere giver diagnostisk værdifulde oplysninger inden for *Enterobacteriaceae* eller grampositive bakterier. En sikker adskillelse af polært monotrike og polært multitrike bakterier forudsætter i en del tilfælde en præcis tælling af flagellerne hos 50-100, fritliggende, tydeligt flagellerede bakterier for at bestemme flagelindex. En afgørelse alene baseret på et skøn forudsætter enten stor erfaring eller meget oplagte tilfælde.

## Samlet referenceliste for kapitlerne 1-5

- Adams, E.: Studies in Gram staining. *Stain Technology* 50: 227, 1975.
- Anderson, R.J.: The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli. *Physiol. Rev.* 12: 166, 1932.
- Aubert, E.: "Cold" stain for acid-fast bacteria. *Canad. J. publ. Hlth* 41: 31, 1950.
- Austrian, R.: The Gram stain and the etiology of lobar pneumonia, an historical note. *Bact. Rev.* 24: 261, 1960.
- Baker, J.R.: Cytological Technique. The principles underlying routine methods. John Wiley & Sons. Inc., New York, 1960.
- Bartholomew, J.W. & Mittwer, T.: The mechanism of the Gram reaction. I. The specificity of the primary dye. *Stain Technol.* 25: 103, 1950.
- Bartholomew, J.W., Roberts, M.A. & Evans, E.E.: Dye exchange in bacterial cells, and the theory of staining. *Stain Technol.* 25: 181, 1950.
- Bartholomew, J.W. & Mittwer, T.: The mechanism of the Gram reaction. III. Solubilities of dye-iodine precipitates and further studies of primary dye substitutes. *Stain Technol.* 26: 231, 1951.
- Bartholomew, J.W. & Mittwer, T.: The Gram stain. *Bact. Rev.* 16: 1, 1952.
- Bartholomew, J.W.: Variables influencing results, and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. *Stain Technol.* 37: 139, 1962.
- Bender, W.: Zur Technik des Nachweises der Tuberkelbazillen in Sputum. *Centralbl. Bakt.* I. Abt. Orig. 86: 461, 1921.
- Bender, W.: Zur Tuberkelbazillenfärbung, insbesondere zur Unterscheidung der tuberkelbazillenähnlichen Stäbchen. *Dtsch. med. Wschr.* 48: 381, 1922.
- Benians, T.H.C.: A further investigation into the principles underlying Gram's stain, with special reference to the bacterial cell membrane. *J. Path. Bact.* 23: 401, 1920.
- Bennedsen, J. & Olesen Larsen, S.: Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Scand. J. resp. Dis.* 47: 114, 1966.
- Bennedsen, J.: The specificity of circulating antibodies in experimental infections with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* demonstrated by immunofluorescence. *Acta path. microbiol. scand.* 76: 245, 1969.
- Billroth, Th. & Ehrlich, P.: Untersuchungen über *Coccobacteria septica*. *Langenbecks Arch. Chir.* 20: 403, 1877.
- Bishop, P.J. & Neumann, G.: The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle (Lond.)* 51: 196, 1970.
- Biswas, B.B. & Basu, P.S.: Gram staining and its molecular mechanism. *Int. Rev. Cytol.* 29: 1, 1970.
- Bulloch, W. & Macleod, J.J.R.: The chemical constitution of the tubercle bacillus. *J. Hyg. (Lond.)* 4: 1, 1904.
- Burdash, N.M., West, M.E. & Bannister, E.R.: Automatic Gram-staining with the micro-stainer II. *Hlth. Lab. Sci.* 13: 20, 1976.
- Burke, V. & Barnes, M.W.: The cell wall and the Gram reaction. *J. Bact.* 18: 69, 1929.
- Clancey, J.K., Allen, B.W., Rogers, D.T., Smith, L.S., Aber, V. & Mitchison, D.A.: Comparison of machine and manual staining of direct smears for acid-fast bacilli by fluorescence microscopy. *J. clin. Path.* 29: 931, 1976.
- Collard, P.: The Development of Microbiology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1976.
- Cowan, S.T.: Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge Univ. Press, 1974.

- Cruickshank, R.: Medical Microbiology. A guide to the laboratory diagnosis and control of infection. 11th ed. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1969.
- Culling, C.F.A.: Handbook of Histopathological Techniques. Butterworths, London 1963.
- Ehrlich, P.: Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. Arch. mikr. Anat. 1877. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, New York, *I*: 19, 1956).
- Ehrlich, P.: Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Thesis, Leipzig 1878. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, New York, *I*: 29, 1956).
- Ehrlich, P.: Über das Methylenblau und seine klinisch-bakterioskopische Verwerthung. Z. klin. Med. 1881. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, New York, *I*: 287, 1956).
- Ehrlich, P.: Referate aus dem Verein für innere Medicin zu Berlin. Dtsche med. Wschr. 8: 269, 1882.
- Ehrlich, P.: Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. Charité-Ann. 11: 123, 1886.
- Engbæk, H.C., Bennedsen, J. & Olesen Larsen, S.: Comparison of various staining methods for demonstration of tubercle bacilli in sputum by direct microscopy. Bull. 42, Int. Union against Tuberculosis, 1969, p. 94.
- Engbæk, K., Stæhr Johansen, K. & Egholm Jensen, M.: Gramfarvning af bakterier i formalinfikseret paraffinsnit. En sammenligning af 5 metoder med en ny modifikation. Ugeskr. Læg. 139: 2385, 1977.
- Friedberger, E. & Reiter, H.: Das mikroskopische Präparat. I: Kollé, W. & von Wassermann, A. (eds.): Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bind I, Gustav Fisher, Jena 1912, p. 293.
- Goepfert, H.R. & Cohn, F.: Ueber die Rotation des Zellinhaltes in *Nitella flexilis*. Bot.Ztg. 7: 665, 681, 697, 713, 1849.
- Goren, M.B.: Mycobacterial lipids: selected topics. Bact. Rev. 36: 33, 1972.
- Gram, C.: Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. Fortschr. Med. 2: 185, 1884.
- Greenwood, N. & Fox, H.: A comparison of methods for staining tubercle bacilli in histological sections. J. clin. Path. 26: 253, 1973.
- Grimme, A.: Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. Centralbl. Bakt. I. Abt. Orig. 32: 1, 81, 161, 241, 321, 1902.
- Gross, M.: Rapid staining of acid-fast bacteria. Amer. J. clin. Path. 22: 1034, 1952.
- Gurr, E.: Encyclopædia of Microscopic Stains. Leonard Hill Ltd., London 1960.
- Gurr, E.: Staining Animal Tissues. Practical and Theoretical. Leonard Hill Ltd., London 1962.
- Gurr, E.: The Rational Use of Dyes in Biology and General Staining Methods. Leonard Hill Ltd., London 1965.
- Heimer, G.V., Joseph, N. & Taylor, C.E.D.: Staining clinical specimens for acid-fast bacilli by means of a mechanical conveyor system. J. clin. Path. 31: 185, 1978.
- Hoffmann, H.: Ueber Bacterien. Bot. Ztg, 27: 233, 249, 265, 281, 305, 321, 1869.
- Hopwood, D.: Fixatives and fixation: a review. Histochemical J. 1: 323, 1969.
- Hucker, G.J. & Conn, H.J.: Methods of Gram Staining. N.Y. Agric. Exp. Sta. Techn. Bull. No. 93, 1923.
- Jensen, K.A.: Grundrids af den organiske kemi. J. Gjellerups Forlag, København 1964, p. 390.

- Jensen, K.A.: Tuberkelbacillens Forekomst i Spinalvædsken undersøgt ved Dyrkning paa Petroff's Substrat. Ugeskr. Læg. 87: 710, 1925.
- Jensen, K.A.: Towards a standardisation of laboratory methods. Bull. int. Un. Tuberc. 24: 78, 1954.
- Jensen, V.: Om en Modifikation af Grams Farvning, særlig med Hensyn til Gonokokdiagnosen. Hospitalstidende 55: 568, 1912.
- Kandler, O. & König, H.: Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of Methanogenic bacteria. Arch. Microbiol. 118: 141, 1978.
- Koch, R.: Verfahren zur Untersuchung, zum Konservieren und Photographieren der Bakterien. Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 2: 399, Breslau 1877, J.U. Kerns Verlag (Gesammelte Werke von Robert Koch, I. Band, p. 27, Leipzig 1912).
- Koch, R.: Die Ätiologie der Tuberkulose. Berl. klin. Wschr. 19: 221, 1882. (Gesammelte Werke von Robert Koch, I. Band, p. 428, Leipzig 1912).
- Koch, R.: Ueber neue Tuberkulinpräparate. Dtsche med. Wschr. 23: 209, 1897.
- Kotani, S., Kitaura, T., Hirano, T. & Tanaka, A.: Isolation and chemical composition of the cell walls of BCG. Biken's J. 2: 129, 1959.
- Kristensen, M.: Zettnow's flagella staining as a routine method. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 111, p. 130, 1955.
- Lamanna, C.: The nature of the acid-fast stain. J. Bact. 52: 99, 1946.
- Lautrop, H. & Jessen, O.: On the distinction between polar monotrichous and lophotrichous flagellation in green fluorescent pseudomonads. Acta path. microbiol. scand. 60: 588, 1964.
- Lechevalier, H.A. & Solotorovsky, M.: Three Centuries of Microbiology. Dover Publications, New York 1974.
- Lederer, E.: The mycobacterial cell wall. Pure appl. Chem. 25: 135, 1971.
- Leifson, E.: A method of staining bacterial flagella and capsules together with a study of the origin of flagella. J. Bact. 20: 203, 1930.
- Leifson, E.: Staining of bacterial flagella. J. Bact. 36: 656, 1938.
- Leifson, E.: Staining, shape, and arrangement of bacterial flagella. J. Bact. 62: 377, 1951.
- Leifson, E. & Hugh, R.: Variation in shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bact. 65: 263, 1953.
- Leifson, E., Carhart, S.R. & Fulton, M.: Morphological characteristics of flagella of *Proteus* and related bacteria. J. Bact. 69: 73, 1955.
- Leifson, E.: Atlas of Bacterial Flagellation. Acad. Press, N.Y. and London, 1960.
- Leifson, E.: The effect of formaldehyde on the shape of bacterial flagella. J. gen. Microbiol. 25: 131, 1961.
- Lillie, R.D.: The Gram stain I. A quick method for staining Gram-positive organisms in the tissues. Arch. Path. 5: 828, 1928.
- Loeffler, F.: Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 2: 421, 1884.
- Loeffler, F.: Die Aetiologie der Rotzkrankheit. Arb. Gesundh.-Amte (Berl.) I: 141, 1886.
- Loeffler, F.: Vorlesungen über die geschichtliche Entwicklung der Lehre von den Bakterien. Erster Theil bis zum Jahre 1878. Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig 1887.
- Loeffler, F.: Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen, im besonderen ihrer Wimperhaare und Geisseln. Centralbl. Bakt. 6: 209, 1889.

- Loeffler, F.: Weitere Untersuchungen über die Beizung und Färbung der Geisseln bei den Bakterien. *Centralbl. Bakt.* 7: 625, 1890.
- Magee, C.M., Rodeheaver, G., Edgerton, M.T. & Edlich, R.F.: A more reliable Gram staining technic for diagnosis of surgical infections. *Amer. J. Surg.* 130: 341, 1975.
- Mayfield, C.I. & Inniss, W.E.: A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Canad. J. Microbiol.* 23: 1311, 1977.
- Mittwer, T., Bartholomew, J.W. & Kallman, B.J.: The mechanism of the Gram reaction. II. The Function of iodine in the Gram stain. *Stain Technol.* 25: 169, 1950.
- Mudd, S., Winterscheid, L.C., De Lamater, E.D. & Henderson, H.J.: Evidence suggesting that the granules of mycobacteria are mitochondria. *J. Bact.* 62: 459, 1951.
- Muller, H.E. & Chermock, R.L.: A rapid staining technique for acid-fast organisms. *J. Lab. clin. Med.* 30: 169, 1945.
- Murohashi, T., Kondo, E. & Yoshida, K.: The role of lipids in acid-fastness of mycobacteria. *Amer. Rev. resp. Dis.* 99: 794, 1969.
- Neelsen, F.: Ein casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. *Centralbl. med. Wiss.* 21: 497, 1883.
- Neide, E.: Die Alkoholentfärbung der nach Gram gefärbten Bakterien als Speciesdiagnose, in Verbindung mit einer Untersuchung der für die Gram-Färbung in Betracht kommenden Faktoren. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 35: 508, 1904.
- Neisser, A.: Versuche über die Sporenbildung bei Xerosebacillen, Streptokokken und Chole-raspirillen. *Z. Hyg. Infekt. -Kr.* 4: 165, 1889.
- Nicolle, M.: Pratique des colorations microbiennes (Méthode de Gram modifiée et méthode directe). *Ann. Inst. Pasteur* 9: 664, 1895.
- Norris, J.R. & Swain, H.: Staining bacteria. In: Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (eds.): *Methods in Microbiology*, vol. 5 A. Academic Press, N.Y. 1971, p. 105.
- Plimmer, H.G. & Paine, S.G.: A new method for the staining of bacterial flagella. *J. Path. Bact.* 24: 286, 1921.
- Porter, K.R. & Yegian, D.: Some artifacts encountered in stained preparations of tubercle bacilli. II. Much granules and beads. *J. Bact.* 50: 563, 1945.
- Pottz, G.E., Rampey, J.H. & Benjamin, F.: A method for rapid staining of acid-fast bacteria in smears and sections of tissue. *Amer. J. clin. Path.* 42: 552, 1964.
- Pybus, A.: The use of BCG as a source of acid and alcohol fast bacilli for staining purposes. *Ann. trop. Med. Parasit.* 68: 483, 1974.
- Randolph, T.G. & Mikell, R.F.: Carbol fuchsin in propylene glycol for rapid staining of the tubercle bacillus. *Amer. Rev. Tuberc.* 49: 109, 1944.
- Ryan, R.W., Sedgwick, A.K. & Tilton, R.C.: Laboratory evaluation of an automatic Gram staining machine. *HLth Lab. Sci.* 10: 82, 1973.
- Salomonsen, C.J.: Studier over Blodets Forraadnelse. G. Torsts Boghandel, Kjøbenhavn 1877.
- Salomonsen, C.J.: Bakteriologisk Teknik for Medicinere. P.G. Philipsens Forlag, Kjøbenhavn 1894.
- Salomonsen, C.J.: Carl Weigert (Nekrolog i Berliner klinische Wochenschrift, nr. 35, 1904). i "Smaa-Arbejder", Kjøbenhavn 1917, p. 353.
- Salton, M.R.J.: The anatomy of the bacterial surface. *Bact. Rev.* 25: 77, 1961.
- Salton, M.R.J.: The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain. *J. gen. Microbiol.* 30: 223, 1963.
- Scales, F.M.: A new method for differential staining of bacteria. *J. infect. Dis.* 31: 494, 1922.

- Takeya, K., Hisatsune, K. & Inoue, Y.: Mycobacterial cell walls. II. Chemical composition of the "basal layer". *J. Bact.* 85: 24, 1963.
- Tamura, S.: Zur Chemie der Bakterien. I. Mitteilung. *Z. phys. Chemie* 87: 85, 1913.
- Thomsen, Oluf: Farvning af Gonococcer og Meningococcer. I: Festskrift for Prof. C.J. Salomonsen, København 1917, p. 173. (Communications de l'Institut Sérotherapique de l'Etat Danois, Tome IX, 1917).
- Thjøtta, T. & Kåss, E.: Pseudo-flagella in bacteria. *Acta path. microbiol. scand.* 23: 215, 1946.
- Tucker, F.L. & Bartholomew, J.W.: Variations in the Gram staining results caused by air moisture. *Stain Technol.* 37: 157, 1962.
- Unna, P.G.: Die Entwicklung der Bakterienfärbung. Eine historisch-kritische Uebersicht. *Centralbl. Bakt.* 3: 22, 61, 93, 120, 153, 189, 218, 254, 285, 312, 345, 1888.
- Varughese, P., Helbecque, D.M., McRae, K.B. & Eidus, L.: Comparison of strip and Ziehl-Neelsen methods for staining acid-fast bacteria. *Bull. Wld. Hlth Org.* 51: 83, 1974.
- Weigert, C.: Über eine Mykose bei einem neugeborenen Kinde. 53. Jahres-Bericht der Schlesischen Gesellschaft für Vaterländische Cultur 1875, p. 229. (G.P. Aderholz Buchhandlung 1876, Breslau).
- Weigert, C.: Ueber eine neue Methode zur Färbung von Fibrin und von Microorganismen. *Fortschr. Med.* 5: 228, 1887.
- Wensinck, F. & Boevé, J.J.: Quantitative analysis of the Gram reaction. *J. gen. Microbiol.* 17: 401, 1957.
- Yegian, D. & Porter, K.R.: Some artifacts encountered in stained preparations of tubercle bacilli. I. Non-acid-fast forms arising from mechanical treatment. *J. Bact.* 48: 83, 1944.
- Yegian, D. & Vanderlinde, R.J.: The nature of acid-fastness. *J. Bact.* 54: 777, 1947.
- Zettnow, E.: Ueber Geisselfärbung bei Bakterien. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 30: 95, 1899.
- Ziehl, F.: Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Dtsche med. Wschr.* 8: 451, 1882.
- Ziehl, F.: Ueber die Färbung des Tuberkelbacillus. *Dtsche med. Wschr.* 9: 247, 1883.



## **Prøver for kulturelle og andre egenskaber**



## *Kapitel 6*

### **Hæmolyseprøver (streptokokker)**

(Dette kapitel er udarbejdet i nært samarbejde med overlæge dr.med., Ebbe Kjems, Streptokokafdelingen)

Ved hjælp af en hæmolyseprøve afgør man, om en bakterie danner særlige stoffer, hæmolysiner, som er i stand til at fremkalde hæmolyse af røde blodlegemer, dvs. at få hæmoglobinet til at træde ud af blodlegemet som følge af en delvis eller total ødelæggelse af cellemembranen.

Skønt mange bakterier danner hæmolysiner, er det kun inden for streptokokgruppen at hæmolyseprøven har afgørende differentialdiagnostisk betydning. Visse streptokokker fremkalder på blodplade en omdannelse af blodlegemerne, som kaldes  $\alpha$ -hæmolyse. Det er ikke en hæmolyse i ovennævnte forstand, men den omtales her på grund af dens praktiske betydning i streptokokdiagnostik.

#### **1. Historisk indledning**

De gode erfaringer med serumbehandling af difteri i begyndelsen af 1890'erne gav hurtigt anledning til forsøg med fremstilling af antisera mod andre infektioner. På Institut Pasteur, hvor Roux havde været ledende i arbejdet med fremstilling af difteriserum, var man i Metchnikoff's laboratorium i gang med at fremstille et antistreptokokserum. I arbejdet deltog de tre forskere, Marmorek, Besredka og Bordet, og et af resultaterne blev deres påvisning af streptokokkers evne til at danne hæmolysin. Marmorek (1895) viste, at ved skiftevis at passere streptokokkerne i kaniner og dyrke dem i serumbouillon kunne man opnå højvirulente kulturer, der var velegnede til immunisering af heste. Bordet (1897), som bl.a. undersøgte det opnåede antiserums betydning for fagocytose af bakterierne, bemærkede, at hos de kaniner, som anvendtes i passageforsøgene, fandtes kort før dødens indtræden en næsten total intravaskulær hæmolyse af blodet, og Besredka (1901) fremstillede i serumbouillon et "streptococcolysin" med kraftig hæmolytisk virkning og andre egenskaber, som viser, at det svarer til det man idag kalder streptolysin S. I et klassifikatorisk arbejde

fra 1902 angav Marmorek, at hæmolyse var en karakteristisk egenskab for humanpatogene streptokokker, og at den kunne påvises i bouillonkulturer tilsat defibrineret blod eller på agarplader, som var dækket af et tyndt lag defibrineret blod, ved at der opstod "elegante" opklaringszoner i blodet omkring streptokokkolonierne. Lignende opklaringszoner på blodplade var i 1901 påvist af Eijkman med *Vibrio cholerae*.

Større praktisk betydning end disse iagttagelser fik imidlertid et arbejde af Schottmüller fra 1903 om artsadskillelsen af humanpatogene streptokokker ved hjælp af blodagar. Det var dels Pfeiffer's påvisning i 1892 af nødvendigheden af blodtilsætning til medierne for at få vækst af *Haemophilus influenzae*, dels forsøg på at dyrke bakterier direkte fra blodet hos patienter og ved autopsier, der i løbet af 1890'erne førte til udvikling af blodpladen i den form, hvori vi nu kender den. Schotmüller fremhævede generelt, hvor værdifuld en sådan blodplade var i differentialdiagnostisk arbejde, og angav som specielt eksempel dens nytte i streptokokdiagnostikken. Han viste, at kolonier af den klassiske humanpatogene streptokok, *S. pyogenes*, var omgivet af kredsrunder, helt lyse opklaringer i blodpladen, mens andre streptokokker i stedet fremkaldte en grønlig farve i blodet under og omkring kolonierne. Den grønne farve fandt han dels hos streptokokker, som han kaldte *S. mitior seu viridans* (*seu* betyder "eller" og *viridans* betyder "grøn"), dels hos pneumokokker.

Brown (1919) viste, at de lyse opklaringer i blodpladen skyldtes, at hæmoglobinet træder ud af blodlegemet og diffunderer frit til alle sider, således at der opstår en farvekontrast mellem de steder, hvor blodlegemerne har mistet farvestoffet, og de steder hvor det er bevaret i cellen. Kolonier, der gav disse opklaringer, betegnede han som værende af  $\beta$ -typen, mens kolonier, der gav grønfarvning, betegnede som  $\alpha$ -type. De kolonier, der ingen ændringer fremkaldte i blodet, var af  $\gamma$ -type efter Brown's nomenklatur. Heraf er afledt de gængse betegnelser  $\beta$ - og  $\alpha$ -hæmolyse, men det må bemærkes, at  $\alpha$ -hæmolyse ikke er en egentlig hæmolyse.

Mange har i tidens løb søgt at finde en forklaring på, hvordan den grønne farve opstår. Man har ment, at den kunne skyldes syredannelse (Ruediger 1906), methæmoglobindannelse (Rieke 1904, Cole 1914 og flere andre citeret efter Brown 1919) eller en samtidig virkning af syre og brintoverilte (Hagan 1925). At brintoveriltedannelse spiller en vigtig rolle, er overvejende sandsynligt (Todd 1928; Fuller & Maxted 1939; Isaacs 1947, 1948), men fuld forståelse af, hvad der sker, har man ikke.

For nærmere at undersøge et hæmolysins natur og virkemåde, må man kunne fremstille det i større mængde i opløsning. Det viste sig for streptokokhæmolysinets vedkommende at være en vanskelig opgave, som først blev løst i 1930'erne, især takket være undersøgelser af Todd i England (1932, 1934,

1938, 1939) og Julia Weld i USA (1934, 1935). Først viste Todd, at der var forskel på et hæmolysin dannet i de sædvanligt anvendte serumholdige kulturer og et hæmolysin dannet i et gærekstraktholdigt medium, som Neill & Mallory (1926) havde brugt, og efter langstrakte undersøgelser endte han med at fastslå, at streptokokker danner både et iltlabilt hæmolysin – kaldet streptolysin O – som kun er aktivt, hvis det behandles med reduktionsmidler, og et iltstabilt hæmolysin – kaldet streptolysin S – der bl.a. dannes i serumholdige medier (derfor betegnelsen S); bortset fra at det ikke påvirkes af ilt, er det i øvrigt meget ustabil, specielt i vandig opløsning, men kan opbevares i frysetørret form. Streptolysin O er immunogent og kan efter Todd's anvisning bruges til påvisning af antistreptolysin-titerstigninger i patientblod efter visse streptokokinfektioner (AST-prøven). Streptolysin S er ikke immunogent, men er blandt andet på grund af sin iltstabilitet det hæmolysin, som fremkalder de  $\beta$ -hæmolytiske forandringer i aerobt inkuberede blodplader, hvilket har kunnet vises definitivt med mutanter, som kun producerer eet af de to streptolysiner.

Begge streptolysiner dannes af streptokokker hørende til de serologiske grupper A, C og G, og muligvis danner nogle streptokokker af grupperne E, H og L alene streptolysin S. Da mange andre streptokokker end de nævnte fremkalder  $\beta$ -hæmolyse på blodplader, må der findes andre hæmolysiner, men de er foreløbig ikke kendt. Lidt af en undtagelse udgør dog streptokokker af serologisk gruppe B, som danner et stof, der udløser hæmolyse af røde blodlegemer, der i forvejen er påvirkede af  $\beta$ -toksin, dvs. sphingomyelinase C, fra stafylokokker.

Dette forhold blev i 1944 tilfældigt opdaget af tre bakteriologer i Australien (Christie et al. 1944; Munch-Petersen et al. 1945), som observerede, at på blodplader hvor der samtidig var vækst af stafylokokker og gruppe B streptokokker, var streptokok-kolonierne omgivet af opklarede zoner de steder, hvor de lå lige i nærheden af stafylokok-kolonierne. De forsøgte, men uden held, at finde ud af, hvad det var for et stof, der udløste hæmolysen, og man ved det stadig ikke. Fænomenet udnyttedes i den såkaldte CAMP-test til identificering af gruppe B streptokokker; sit navn har prøven fået efter forbogstaverne på de tre bakteriologer, som beskrev fænomenet: Christie, Atkins og Munch-Petersen.

De to kendte streptolysiner har ikke blot evne til at hæmolysere blod, men har vist sig at beskadige mange andre slags celler, dvs. de er ikke blot hæmolysiner, men cytolsiner eller cytotoxiner. Som sådan har de længe været studeret og sammenlignet med andre cytolsiner af toksinologisk engagerede biokemikere, i de senere år særligt med henblik på deres angrebspunkt i cellemembraner. Nogle af resultaterne er kort omtalt i afsnittet *Biokemisk*

baggrund og mere udførlig omtale findes hos Bernheimer (1977), Freer & Arbuthnott (1977) og Ginsburg (1970).

## 2. Biokemisk baggrund

### a) *Streptolysin O*

Dette streptolysin er et proteinstof med en molekylvægt på ca. 60.000, der forekommer ekstracellulært i kulturer af streptokokker tilhørende de serologiske grupper A, C og G. Foruden at hæmolysere erythrocytter ødelægger det mange andre celletyper, fx. leukocyter, makrofager og fibroblaster, og virker i små doser som en dødelig gift på forsøgsdyr som mus, kaniner og marsvin.

Streptolysin O er biokemisk beslægtet med flere andre toksiner produceret af grampositive bakterier, fx. pneumolysin fra pneumokokker, tetanolysin fra *Cl. tetani*, perfringolysin O fra *Cl. perfringens*, cereolysin fra *Bacillus cereus* og listerialysin fra *L. monocytogenes*. Det er vist, at alle disse toksiners angrebssted er cellemembranernes kolesterol, og at der dannes huller i membranerne som følge af toksinpåvirkningen.

Det er karakteristisk for alle disse toksiner, at de hurtigt inaktiveres af ilt, og at de kan reaktiveres ved behandling med reducerende stoffer som cystein, glutathion, thioglykollat etc. Man har derfor været tilbøjelig til at mene, at den toksiske virkning var afhængig af frie SH grupper, men denne teori er senere draget i tvivl.

På grund af den udtalte iltfølsomhed spiller streptolysin O ingen rolle ved dannelse af hæmolyssezoner på aerobt inkuberede blodplader; her er det udelukkende streptolysin S, som er virksomt. Nogle (Topley & Wilson, 6. udg. 1975, p. 717) mener, at ved anaerob inkubation, hvor streptolysin O ikke er inaktiveret, bidrager også dette hæmolysin til zonedannelsen, men det er ikke almindeligt accepteret. En mere detaljeret beskrivelse af streptolysin O's egenskaber findes hos Bernheimer (1977).

### b) *Streptolysin S*

Dette hæmolysin dannes af de samme streptokokker (de serologiske grupper A, C og G), som producerer streptolysin O, men det findes angiveligt også i nogle stammer af de serologiske grupper E, H og L (Okamoto 1962, cit. af Ginsburg 1970). Formodentlig er den hæmolytisk aktive komponent i streptolysin S et lille peptid med en molekylvægt på ca. 2.800, der dannes i bakteriens cytoplasma-membran. Herfra kan det overføres ved direkte kontakt til erythrocytmembraner, eller det kan under forudsætning af aktivt stofskifte overføres til så forskellige stoffer som serumalbumin, RNA og tween, der

virker som bærestoffer for det aktive peptid, og fra bærestoffet kan det igen overføres til forskellige cellemembraner. Da streptolysin S altså er et kompleks af en lille aktiv gruppe og et større bæremolekyle, er de forskellige streptolysin S præparationers egenskaber noget varierende, afhængigt af det aktuelle bæremolekyle. En renfremstilling af det hæmolytisk aktive peptid er hidtil ikke lykkedes på grund af dets instabilitet. Også streptolysin S præparationer af forskellig slags er instabile, især i vandig opløsning og ved højere temperaturer; derimod virker ilt ikke ødelæggende. I tørfrosset tilstand er det holdbart. Angiveligt er det kun streptolysin S, som er virksomt også i prøven for opløseligt hæmolysin.

Streptolysin S angriber mange slags celler og virker dødeligt giftigt på visse forsøgsdyr. Virkningen skyldes en binding til cellemembranernes fosfolipider og deraf følgende lækage, hvis størrelse er dosisafhængig. Drejer det sig om erythrocytter, trækker hæmoglobinet på grund af osmotisk effekt tilsidst så meget vand ind i cellen, at membranen sprænges og hæmoglobinet frigøres. En detailleret fremstilling af streptolysin S' egenskaber og virkninger findes hos Ginsburg (1970).

*c) Biokemisk kommentar til dannelsen af  $\alpha$ -hæmolyse på blodplader*

Man ved som sagt ikke bestemt, hvordan de grønne  $\alpha$ -zoner opstår, men der er enighed om, at det af bakterierne dannede brintoverilte ( $H_2O_2$ ) spiller en vigtig rolle. Den forandring, blodlegemerne undergår, er ikke alene en farveændring fra rød til grøn, men samtidig bliver de påvirkede blodlegemer resistente over for virkningen af streptolysin S, så der ikke indtræder nogen lyses af blodlegemet. Ud fra dette må man antage, at der på en blodplade kan forekomme en slags konkurrence mellem den egentlige hæmolyseproces og "grønfarvningsprocessen". Man ser faktisk også, at streptokokker, som normalt danner  $\beta$ -zoner, kan optræde i en form, hvor de danner  $\alpha$ -zoner (Todd 1928; Fry 1933; Colebrook et al. 1942), og det er kendt, at nogle streptokokker viser en grønfarvet zone umiddelbart rundt om kolonien og uden for denne en smal opklaret zone (Brown 1919).

Næsten alle bakterier danner  $H_2O_2$  ved vækst under aerobe forhold, men da de fleste bakterier indeholder katalase, vil brintoverilten spaltes lige så hurtigt som den dannes. Det er ikke tilfældet hos streptokokker, som netop er karakteriserede ved ikke at danne katalase; de kan ganske vist danne såkaldte atypiske peroxidaser, som også kan spalte en vis mængde  $H_2O_2$ , men dette forhold er dårligt undersøgt. Når der ikke i alle streptokok-kolonier på blodplader sker en  $H_2O_2$  ophobning, skyldes det, at der ved hæmolysen frigøres katalase fra de ødelagte røde blodlegemer, og denne katalase spalter omgående tilstedeværende  $H_2O_2$ . Man kan derfor antage, at dannelse af en

$\beta$ -zone eller en  $\alpha$ -zone i hvert fald delvis er et spørgsmål om den relative hastighed, hvormed hæmolysinkoncentrationen og  $H_2O_2$  koncentrationen når en kritisk størrelse, og herved vil substratsammensætningen, specielt glukoseindholdet, og inkubationsatmosfæren og inkubationstemperaturen spille en afgørende rolle. Hvis den rette hæmolysinkoncentration bliver nået først, vil der dannes en ren  $\beta$ -zone, idet frigjort katalase vil hindre  $H_2O_2$  ophobning. Hvis, omvendt, en tilstrækkelig  $H_2O_2$  koncentration nås først, vil der dannes en ren  $\alpha$ -zone, fordi de  $H_2O_2$  påvirkede erythrocytter bliver resistente over for hæmolysinets virkning.

De tilfælde, hvor man inderst har en  $\alpha$ -zone og uden for denne en  $\beta$ -zone, kan måske forklares ved at  $H_2O_2$  dannelsen i begyndelsen er dominerende, mens hæmolysindannelsen senere bliver så stor, at der dannes et overskud som derefter kan diffundere gennem den grønne zone og hæmolysere erythrocytterne udenfor denne, så der frigøres tilstrækkelig katalase til at standse den grønne omdannelse.

Disse kommentarer støtter sig på observationer af Brown (1918), Todd (1928), Fuller & Maxted (1939) og Isaacs (1947, 1948).

### 3. Valg af metode eller hvorfor man bruger prøven for opløseligt hæmolysin

De fleste steder i verden definerer man en hæmolytisk streptokok som en streptokok, der på blodplade danner  $\beta$ -hæmolytiske zoner. Her i landet defineres den som en streptokok, der danner "opløseligt hæmolysin" i flydende medier. Det som skal kommenteres her er, hvorfor man i Danmark foretrækker denne definition og derfor betragter en prøve for opløseligt hæmolysin som et ønskeligt supplement til undersøgelsen for pladehæmolyse.

Oprindeligt var begrebet en hæmolytisk streptokok mere eller mindre synonymt med begrebet en humanpatogen streptokok. Senere, dvs. efter Lancefield's serologiske gruppeinddeling i 1933, viste der sig en tendens til at underforstå, at en hæmolytisk streptokok var det samme som en streptokok af serologisk gruppe A. Efter vor nuværende viden er hverken den ene eller den anden af disse opfattelser tilfredsstillende, men fordi gruppe A streptokokker er den dominerende årsag til humane infektioner og praktisk talt alle gruppe A streptokokker både giver  $\beta$ -hæmolyse på plade og danner opløseligt hæmolysin og fordi man i ikke-specialiserede laboratorier gerne vil undgå den serologiske gruppebestemmelse, har man til praktisk klinisk brug holdt fast ved en skelen mellem hæmolytiske og ikke-hæmolytiske streptokokker.

Hvis man ved hæmolytiske streptokokker forstår stammer, der danner  $\beta$ -hæmolytiske zoner på plade, vil det betyde, at streptokokker af næsten alle serologiske grupper (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, O, P, R, S, T, U og V)

foruden de benævnte arter *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. milleri* og *S. mutans*, vil kunne være repræsenteret. Selv om langt fra alle stammer inden for hver af de nævnte grupper og arter giver  $\beta$ -hæmolyse, er det klart, at begrebet en hæmolytisk streptokok på denne måde bliver meget udflydende.

En lille smule bedre stiller sagen sig, hvis man definerer en hæmolytisk streptokok ud fra evnen til at danne opløseligt hæmolysin, idet nogle stammer med Lancefield antigen B, D, H, K, O og M samt *S. mutans*, *S. mitior* og *S. milleri* vil falde fra, men alligevel er det en meget heterogen gruppe.

Når det overhovedet stadig er rimeligt at bruge betegnelsen en hæmolytisk streptokok, skyldes det to ting: (1) Det rent statistiske, at i humant materiale, og ganske særligt i svælgpodninger, udgør streptokokker af serogrupperne A, C og G det overvejende flertal, og (2) det forhold, at stammer af disse tre serogrupper over for antibiotika stort set forholder sig så ensartet, at en indbyrdes differentiering ikke har terapeutisk betydning.

Det er af ovenstående årsager også indlysende, at hvis man ønsker en mere præcis identificering af isolerede streptokokker, kommer man ikke uden om de serologiske og biokemiske metoder, der står til rådighed i et speciallaboratorium for streptokokdiagnostik, og betydningen af en præcis diagnose må ikke undervurderes, fordi det i tidens løb har vist sig, at flere slags streptokokker end oprindeligt antaget kan være humanpatogene.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

##### A) Undersøgelse for hæmolyse på blodplader = pladehæmolyse

###### Substrat

###### 5% Blodagarplader

Til blodagarplader anvendes et grundsubstrat, hvortil der umiddelbart før ophældningen tilsættes opløsninger af 0,2 ml 25% cysteinhydroklorid (Millipore sterilfiltreret), 9,4 ml 27% Na-pyruvat (autoklaveret) og 5% blod (defibrineret hesteblood). pH bør være 7,3–7,4.

###### Grundsubstrat til 5% blodagarplader

Demineraliseret vand	1000	ml
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,1	g
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,0067	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,12H <sub>2</sub> O	8,0	g
NZ-amin, type B (Sheffield)	5,0	g
Oxoid gærekstrakt L21	3,0	g
Oxoid Lab Lemco powder L29	5,0	g
KCl	6,67	g
Sæbe	0,01	g
Agar	10–12	g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  og  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  opløses i vandet under opvarmning, hvorefter de øvrige pulvere tilsættes, og pH indstilles til 7,4 med HCl.

Som erstatning for svind tilsættes 50 ml demineraliseret vand, og der autoklaveres ved  $121^\circ C$ .

Det er vigtigt, at pladen kun indeholder 5% blod og ophældes som kun ca. 3 mm tykke plader, da man ellers ikke får tydelige  $\beta$ -zoner. Glukosemængden i kødekstrakt og hesteblood må tilsammen ikke overskride 0,05%, da gruppe A streptokokkers  $\beta$ -zoner ellers ikke bliver tydelige.

I stedet for hesteblood kan anvendes fåre- eller menneskeblood.

### *Udførelse*

Pladen tilsås enten direkte med prøvemateriale eller fra en isoleret koloni på en primærplade, således at der både kommer sammenflydende vækst og enkeltkolonier. Pladerne inkuberes under aerobe forhold, helst i  $CO_2$  atmosfære ved  $35^\circ C$ . I særlige tilfælde, fx. ved mistanke om gruppe A streptokokker, som ikke har givet tydelige  $\beta$ -zoner, inkuberes anaerobt.

### *Aflæsning*

Aflæsningen foretages normalt efter 24 timer og igen efter 48 timer, men nogle streptokokker, fx. gruppe F, giver først tydelige zoner efter 48-96 timer, med mindre de er inkuberet i  $CO_2$  atmosfære. Man observerer, om der omkring enkeltkolonier er helt lyse opklaringer ( $\beta$ -zoner), en grønlig-brunlig misfarvning ( $\alpha$ -zoner) eller slet ingen forandringer ( $\gamma$ -kolonier). Normalt aflæses makroskopisk eller med lup. Ved aflæsning under mikroskop med objektiv 45 kan man se, at  $\beta$ -zonerne er næsten helt uden bevarede røde blodlegemer, mens man i  $\alpha$ -zonerne ser misfarvede og deformerede erythrocytter.

Der forekommer blandingszoner med en grønlig zone nærmest kolonien og fuld opklaring i en zone udenfor. Hvis pladen skiftevis har været i termostat og køleskab, kan man se ringe af  $\alpha$ - og  $\beta$ -type alternere.

### *Fortolkning*

Ved en fuldt opklaret zone betegnes stammen som  $\beta$ -hæmolytisk og undersøges derefter for opløseligt hæmolysin. Ved en grønlig-brunlig misfarvet zone betegnes stammen som en  $\alpha$ -streptokok. Blandingszoner beskrives, undersøgelsen gentages under anaerobe forhold, og der udføres prøve for opløseligt hæmolysin.

*B) Undersøgelse for hæmolyse i flydende substrat = prøve for opløseligt hæmolysin*

*Substrat*

”Serumbouillon”: filtreret oksebouillon tilsat 5% hesteserum, 0,1% glukose og 3,3% hæmolyseret, defibrineret hesteblood (1 del hesteblood + 9 dele vand), hvorefter der sterilfiltreres (Millipore) og aftappes sterilt i 155 x 14/15 mm glas.

Oksebouillon filtreret:

1 l postevand

0,5 kg oksekød

10 g Orthana pepton

3 g NaCl

2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O

Oksekødet hakkes, tilsættes halvdelen af vandet og stilles i køleskab natten over. Derefter koges i 15 minutter, kødvandet sies fra og resten af vandet sættes til kødet og der koges i 10 minutter. Det afkogte kødvand hældes sammen og måles op til 1 liter. Pepton, NaCl og Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tilsættes og koges 10 minutter. pH indstilles med NaOH til 7,5., der koges 5 minutter efter hver NaOH tilsætning. Filtreres gennem papirfilter og måles op til 1 liter med demineraliseret vand og Seitzfiltreres. Der aftappes i steril 1,5 L kolbe og koches. pH er da 7,4.

*Reagens*

5% vaskede kaninblodlegemer

Den færdige suspension rekvireres i streptokokafdelingen eller laboratoriet bruger til fremstillingen en tilsendt suspension af blodlegemer i Alsevers væske i forholdet 1+3. Ved køleskabstemperatur er suspensionen i Alsevers væske holdbar mindst 1 uge, sandsynligvis 2–3 uger. Der fremstilles herfra en 5% suspension i stødpudesaltvand (pH 7,38), idet man først vasker blodlegemerne i stødpudesaltvand mindst 2 gange eller indtil vaskevandet er farveløst. Af de pakkede celler efter sidste vask udtages fx. 0,25 ml celler til 4,75 ml stødpudesaltvand.

*Udførelse*

Den tilsæede serumbouillon inkuberes ved ca. 35°C i 16–18 timer, men ikke længere, da hæmolysinproduktionen på dette tidspunkt er gået i stå og destruktationen begyndt, så man risikerer, at endnu ældre kulturer ikke indeholder hæmolysin. 1 ml af denne kultur blandes med 1 ml blodlegemesuspension

i et Widalglass og henstilles ved ca. 35°C i 1 time, hvorefter glasset centrifugeres.

#### *Aflæsning og fortolkning*

Hvis hele væsken er rød og gennemskinnelig, betyder det at blodlegemerne er hæmolyserede. Det er det udtrådte hæmoglobin, der giver væsken denne karakteristiske lakfarve. Et sådant udseende betyder, at prøven er positiv. Hvis der derimod er fremkommet et bundfald af mørkerøde blodlegemer og en ovenstående uklar, men farveløs bouillon, er prøven negativ. Der kan ses glas med svag rødfarvning af den nederste del af væsken over et rødligt bundfald. En sådan reaktion registreres også som negativ.

#### *C) CAMP-test til påvisning af gruppe B streptokokker*

##### *Substrat*

En lagkageplade fremstille med

bundlag af:

oksebouillon  
æskulin 0,2%  
agar

toplag:

1,5 mm tykt af 5% vaskede fåreblodlegemer i 0,9% saltvand i pulveragar.

##### *Udførelse*

Tværs over pladens midte udsås i en bred streg en  $\beta$ -hæmolysin-producerende stafylokok. Vinkelret på dette strøg udsås streptokokkerne, der skal undersøges, i strøg som skal gå helt op til stafylokokstrøget, men uden at berøre det og i en indbyrdes afstand på mindst 1 cm. Den tilsæede plade inkuberes aerobt eller anaerobt i 20 timer.

##### *Aflæsning*

Man ser dels efter hæmolytiske opklaringer dels efter streptokokkulturernes farve. De hæmolytiske opklaringer ses på grund af diffusionsforholdene som pilespidsformede eller afrundede områder for enden af streptokokstrøget, hvor det støder op til stafylokokstrøget. Streptokokstrøgene kan enten have deres normale hvide farve eller på grund af æskulinspaltningen være gullig-brune.

*Fortolkning*

Hvis der ses en pilespidsformet hæmolytisk opklaring, og kulturen har den sædvanlige hvidlige farve, tolkes prøven som udtryk for at streptokokkerne er af serologisk gruppe B. Hvis der er hæmolytisk opklaring samtidig med, at kulturen er blevet gulligbrun, kan det betyde, at streptokokkerne tilhører en af de serologiske grupper E, P, U eller V, eller er en *S. uberis* som alle i modsætning til gruppe B er i stand til at spalte æskulin. Undertiden kan gruppe B streptokokker være så stærkt pigmenterede, at de ikke kan skelnes fra æskulin-farvede kulturer; ved mistanke herom kan man udføre en separat æskulinprøve i halvflydende medium (se kapitel 22). Hvis der ikke findes hæmolytiske opklaringer, giver prøven ingen positive oplysninger om diagnosen, men gruppe B kan betragtes som udelukket med ca. 98% sikkerhed.

**5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Ingen særlige, men husk at streptokokker nemt fremkalder infektioner, hvis man har sår eller rifter på fingre og hænder.

**6a. Fortegnelse over vigtige grupper af streptokokker fra humant materiale, som kan optræde med  $\beta$ -hæmolyse på blodplade**

Fortegnelsen medtager ikke alle  $\beta$ -hæmolytiske streptokokker fundet hos mennesker, idet flere grupper, som især forekommer hos dyr, men i sjældne tilfælde kan optræde hos mennesker, er udeladt. Det gælder fx. de serologiske grupper E, P, U, V, og R, S, T, samt nogle stammer med gruppeantigen K og M.

Artsnavn	Lancefield gruppeantigen	$\beta$ -zoners hyppighed inden for art eller gruppe og deres særlige karakter
<i>S. pyogenes</i>	A	Næsten alle
<i>S. agalactiae</i>	B	Næsten alle, smalle, uskarpe
<i>S. equi</i>	C	Næsten alle, meget store
<i>S. equisimilis</i>	C	Næsten alle
<i>S. faecalis</i>	D	En del (ca. 25%)
<i>S. durans</i>	D	Alle pr. definition
<i>S. anginosus</i>	F	Næsten alle, først tydelige efter 48-96 timer i alm. atmosfære, men efter 24-48 timer i CO <sub>2</sub> atmosfære
Ubenævnt "minute"	F, G eller ingen	Alle
Ubenævnt	G	Næsten alle
Ubenævnt	L	Næsten alle
<i>S. sanguis</i>	H eller flere	En del
<i>S. mitior</i>	Flere (K, O)	En del
<i>S. milleri</i>	Flere (A, C, G, F, L eller ingen)	Undtagelsesvis
<i>S. mutans</i>	Ingen	Undtagelsesvis

### 6b. Fortegnelse over vigtige grupper af streptokokker fra humant materiale, som kan optræde med $\alpha$ -hæmolyse

Artsnavn	Lancefield gruppeantigen
<i>S. faecium</i>	D
<i>S. avium</i>	D
<i>S. bovis</i>	D
<i>S. pneumoniae</i>	Ingen
<i>S. sanguis</i>	H eller flere andre
<i>S. mitior</i>	K, M, O eller ingen
<i>S. milleri</i>	Flere
Ubenævnt	H
Ubenævnt	K

Nogle af streptokokkerne i de anførte arter eller grupper danner ingen zoner eller undtagelsesvis  $\beta$ -zoner.

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Ud over det i afsnittet *Valg af metode* anførte kan man sammenfattende sige:

Prøven for pladehæmolyse tjener som en første vigtig diagnostisk orientering, der afgør gangen i den videre undersøgelse.

Prøven for opløseligt hæmolysin er et videre led i undersøgelsen af stammer, der har vist  $\beta$ -hæmolyse på plade. En positiv prøve kan, især ved undersøgelse af halspodninger hos mennesker, anvendes som en grov, dvs. kun tilnærmelsesvis pålidelig prøve for tilstedeværelse af streptokokker af serogrupperne A, C og G.

CAMP-testen kan anvendes som en hurtig og sikker metode til påvisning af gruppe B streptokokker.

*Corynebacterium haemolyticum* og sjældnere *C. pyogenes* er visse steder ret hyppige i halspodninger og kan på blodplade let forveksles med streptokokker. *C. haemolyticum* er karakteristisk ved på CAMP-plader at hæmme stafylokokkens hæmolyse (man kan sige den fremkalder et "anti-CAMP fænomen"), mens *C. pyogenes* ikke har denne virkning.

### 8. Referencer

- Besredka, A.: De l'hémolysine streptococcique. Ann. Inst. Pasteur. 15: 880, 1901.  
 Bernheimer, A.W.: Sulfhydryl activated toxins. In: Bernheimer, A.W. (ed.): Perspectives in Toxinology. John Wiley & Sons, N.Y. 1977, p. 85.  
 Bordet, J.: Contribution a l'étude du sérum antistreptococcique. Ann. Inst. Pasteur 11: 177, 1897.

- Brown, J.H.: The use of blood agar for the study of streptococci. Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research. No. 9, 1919, p. 65.
- Christie, R., Atkins, N.E. & Munch-Petersen, E.: A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 22: 197, 1944.
- Colebrook, L., Elliott, S.D., Maxted, W.R., Morley, C.W. & Mortell, M.: Infection by non-haemolytic group-A streptococci. Lancet 2: 30, 1942.
- Eijkman, C.: Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Centralbl. Bakt. I. Abt. Orig. 29: 841, 1901.
- Freer, J.H. & Arbuthnott, J.P.: Biochemical and morphologic alterations of membranes by bacterial toxins. In: Bernheimer, A.W. (ed.): Perspectives in Toxinology. John Wiley & Sons, N.Y. 1977, p. 169.
- Fry, R.M.: Anaerobic methods for the identification of haemolytic streptococci. J. Path. Bact. 37: 337, 1933.
- Fuller, A.T. & Maxted, W.R.: The production of haemolysin and peroxide by haemolytic streptococci in relation to the non-haemolytic variants of group A. J. Path. Bact. 49: 83, 1939.
- Ginsburg, I.: Streptolysin S. In: Montie, T.C., Kadis, S. & Ajl S.J. (eds.): Microbial Toxins, Vol. III. Academic Press, New York, 1970, p. 99.
- Hagan, W.A.: The green coloration by certain streptococci on blood agar. J. infect. Dis. 37: 1, 1925.
- Isaacs, A.: The production of *viridans* variants of haemolytic streptococci. J. Path. Bact. 59: 487, 1947.
- Isaacs, A.: Anti-haemolytic action of *viridans* ( $\alpha$ ) variants of haemolytic streptococci. J. Path. Bact. 60: 199, 1948.
- Marmorek, A.: Le streptocoque et le sérum antistreptococcique. Ann. Inst. Pasteur 9: 593, 1895.
- Marmorek, A.: L'unité des streptocoques pathogenes pour l'homme. Ann. Inst. Pasteur 16: 172, 1902.
- Munch-Petersen, E., Christie, R., Simmons, R.T. & Beddome, H.A.: Further notes on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 23: 193, 1945.
- Neill, J.M. & Mallory, T.B.: Studies on the oxidation and reduction of immunological substances. IV. Streptolysin. J. exp. Med. 44: 241, 1926.
- Pfeiffer, R.: Vorläufige Mitteilungen über die Erreger der Influenza. Dtsch. med. Wschr. 18: 28, 1892.
- Ruediger, G.F.: The cause of green coloration of bacterial colonies in blood-agar plates. J. infect. Dis. 3: 663, 1906.
- Schottmüller, H.: Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. Münch. med. Wschr. 50: 849, 909, 1903.
- Todd, E.W.: The conversion of hemolytic streptococci to non-hemolytic forms. J. exp. Med. 48: 493, 1928.
- Todd, E.W.: Antigenic streptococcal hemolysin. J. exp. Med. 55: 267, 1932.
- Todd, E.W.: A comparative serological study of streptolysins derived from human and from animal infections, with notes on pneumococcal haemolysin, tetanolysin and staphylococcus toxin. J. Path. Bact. 39: 299, 1934.

- Todd, E.W.: The differentiation of two distinct serological varieties of streptolysin, streptolysin O and streptolysin S. *J. Path. Bact.* 47: 423, 1938.
- Todd, E.W.: The streptolysins of various groups and types of haemolytic streptococci; a serological investigation. *J. Hyg. (Lond.)* 39: 1, 1939.
- Weld, J.T.: The toxic properties of serum extracts of hemolytic streptococci. *J. exp. Med.* 59: 83, 1934.
- Weld, J.T.: Further studies with toxic serum extracts of hemolytic streptococci. *J. exp. Med.* 61: 473, 1935.
- Wilson, G.S. & Miles, A.A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 6. ed., vol. I, p. 717, 1975.

## Kapitel 7

### Symbioseprøver (*Haemophilus*)

Ved et symbioseforsøg undersøger man, om væksten af en ukendt bakterie, specielt en formodet *Haemophilus*, fremmes i nærheden af kolonier af en til dette formål på en blodplade udsået stafylokok. Et positivt symbioseforsøg, dvs. forøget kolonistørrelse i nærheden af stafylokokken, kan som regel tolkes som manglende evne hos den ukendte bakterie til at syntetisere coenzymet nikotinamid-adenin-dinukleotid, kaldet NAD.

#### 1. Historisk indledning

Under influenzapandemien i begyndelsen af 1890'erne isolerede R. Pfeiffer, der arbejdede hos Robert Koch, i 1892 den bakterie, der nu kendes under navnet *Haemophilus influenzae*. Pfeiffer kaldte den "Influenzabazillus", fordi han mente den var sygdommens årsag; ofte kaldes den blot Pfeiffer's bacil. Som noget særligt karakteristisk for bakterien fremhævedes Pfeiffer, at den kun kunne vokse i næringssubstrater, der indeholdt blod (Pfeiffer 1893).

Analysen af dette særlige næringskrav har siden været genstand for utallige undersøgelser, der bl.a. har ført til den erkendelse, at bakterien for at vokse kræver tilførsel udefra af to forskellige vækststoffer, som for nemheds skyld siden 1921 er blevet betegnet som X-faktoren og V-faktoren (Thjötta & Avery 1921).

Påvisning af X-faktorkravet sker nu ved hjælp af porfyrinprøven og V-faktorkravet ved symbioseprøven. I det historiske perspektiv er undersøgelser angående de to faktorer naturligvis ikke klart adskilt i den første tid indtil omkring 1920'erne. Alligevel har vi i dette afsnit om symbioseprøven samlet de undersøgelser, som man retrospektivt kan se særlig angår V-faktorkravet, mens de tilsvarende undersøgelser over X-faktorkravet er omtalt under porfyrinprøven (se kapitel 8).

Blandt de mange undersøgelser, som Pfeiffer's opdagelse gav stødet til, er Grassberger's (1897) af særlig interesse i denne sammenhæng. Ved udsæd af ekspektorater på blodagar opdagede han, at kolonier af influenzabaciller

blev meget større end normalt, hvis de voksede i nærheden af stafylokokkolonier, som tilfældigt befandt sig på samme plade. Af sine videre undersøgelser drog Grassberger den konklusion, at der forelå en symbiose, idet han mente, at stafylokokkerne indvirkede på blodet i substratet på en sådan måde, at bakterierne lettere kunne optage det uundværlige stof, som man vidste fandtes i blodet. Grassberger og mange senere forfattere viste, at det ikke specielt var stafylokokker, som fremkaldte symbiosefænomenet, men at det gjaldt næsten alle arter af bakterier. Grassberger's observation blev hurtigt bekræftet (se fx. Cantani 1901 og Ghon & Preyss 1902, 1904), og hurtigt opstod der uenighed om, hvad der egentlig foregik, men denne ældre del af litteraturen er ret uigennemskuelig og mest oplysende ved at demonstrere de vanskeligheder af forsøgsteknisk og fortolkningsmæssig art, der kan opstå ved analysen af komplekse vækstkrav (se fx. oversigter hos Scott 1929 og Lucile Anderson 1931).

Som følge af den næste influenzapandemi, der begyndte i 1918, blev hele problematikken igen taget op mange steder; særlig må fremhæves arbejder af Davis i Chicago (1917, 1921a, b), Fildes i London (1920, 1921, 1922), Otto Olsen i Hamborg (1920a, b), Thjötta (1921), Thjötta & Avery på Rockefeller instituttet i New York (1921a, b) og Martin Kristensen på Seruminstittet (1922).

Det vigtigste resultat var den sikre påvisning af, at der var to forskellige stoffer, som var nødvendige for væksten (Davis 1917, 1921a, b; Fildes 1920, 1921, 1922; Thjötta & Avery 1921a, b). Thjötta & Avery kaldte dem V-faktor og X-faktor og viste, ligesom Davis, at den vigtigste forskel var deres forskellige resistens over for høje temperaturer: X-faktoren tålte autoklavering ved 120°C, mens V-faktoren blev ødelagt. Det blev også ved kvantitative undersøgelser vist, at den krævede mængde af de to stoffer var så ringe, at der ikke kunne være tale om, at de blev udnyttet som næringsstoffer, og da man på det tidspunkt var begyndt at erkende mangelsygdomme hos dyr og mennesker, der kunne forebygges ved hjælp af såkaldte accessoriske vækststoffer eller vitaminer, lå den tanke nær, at X- og V-faktorerne var sådanne vækststoffer. Andre, især Fildes og Olsen, hævdede dog, at stofferne havde en direkte katalytisk funktion i mediet.

Det blev vist, at begge faktorer var til stede i blod, og at de begge, men navnlig V-faktoren, desuden fandtes i forskellige friske plante- og dyrevæv. Af praktisk betydning var påvisningen af, at forudgående moderat varmebehandling eller pepsinfordøjelse af blodet i høj grad begunstigede væksten af Pfeiffer's bacil. Desuden blev betingelserne for udførelsen af symbioseforsøget, som man tillagde stor diagnostisk betydning, nærmere fastlagt, især af Martin Kristensen (disputats 1922). Fra denne tid stammer også opdagelsen af, at

der var beslægtede bakterier, som kun krævede den ene af de to vækstfaktorer, og dermed begyndte den stadig gældende systematiske inddeling af de hæmoglobinofile bakterier.

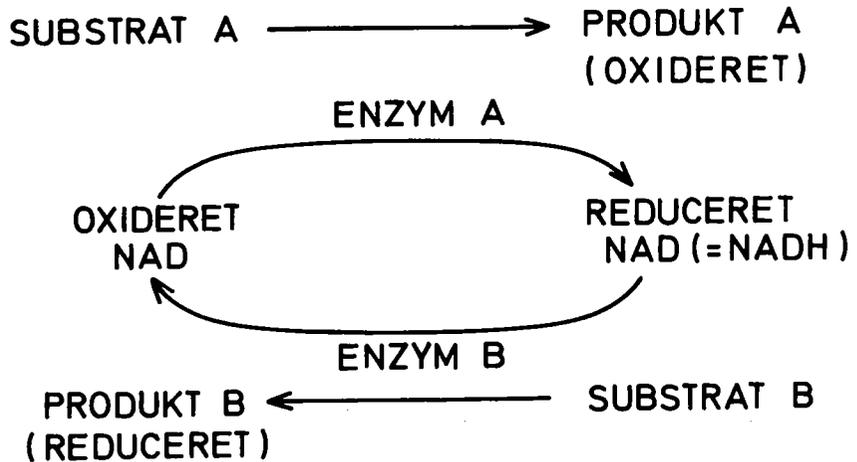
Trods disse mange fremskridt var X- og V-faktorerens kemiske natur stadig helt ukendt, men i 1937 opklarede ægteparret Lwoff dette spørgsmål for V-faktorens vedkommende (A. & M. Lwoff 1937a). De fremstillede af gær et ekstrakt, der var aktivt som V-faktor i fortyndingen 1:50.000, og forsøgte at udfælde det aktive stof med alkohol og forskellige metalsalte ved forskellig pH. Da resultaterne forelå, blev de af en kollega gjort opmærksom på, at de samme karakteristika fandtes hos cozymase — det dengang anvendte navn for coenzymet NAD. Da de derpå undersøgte et højt rensat præparat af cozymase fra gær, fandt de en V-faktoraktivitet af størrelsesordenen 1:270.000.000. Flere senere forsøg bekræftede, at V-faktoren kunne erstattes af NAD, og da det dernæst blev vist, at tilsætning af adenylsyre og nikotinamid, som er bestanddele af NAD, ikke kunne erstatte NAD i vækstforsøgene, kunne man slutte, at V-faktorkravet måtte skyldes manglende evne til at syntetisere selve nikotinamid-adenin-dinukleotid-molekylet af komponenterne. I en efterfølgende forsøgsrække (A. & M. Lwoff 1937b) kunne de vise, at Pfeifferbaciller, der var dyrket med et minimalt tilskud af V-faktor, udviste stærkt nedsat evne til at udføre en række biokemiske reaktioner, som var kendt for at være afhængige af tilstedeværelsen af coenzymet NAD for at forløbe på normal måde, og på den måde blev det bekræftet, at V-faktoren og NAD har samme funktion i bakteriestofskiftet.

## 2. Biokemisk baggrund

Stoffet NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid) og det samme molekyle med en ekstra fosforgruppe, NADP (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat), er cozymer med den særlige funktion at overføre brint, dvs. brintjoner + elektroner, mellem forskellige stoffer som led i en organismes biokemiske omsætninger. De fungerer ved, at de reversibelt kobles til et stort antal forskellige enzymer med evne til specifik binding til bestemte substratmolekyler og derefter reversibelt oxideres og reduceres.

Oxidationen foregår ved, at der dannes et kompleks af oxideret coenzym + specifikt enzym (fx. en dehydrogenase) + substratmolekyle A; i komplekset frigøres elektroner og brintjoner fra substratmolekylet og overføres til coenzymet. Coenzymet, der nu er i reduceret form, frigøres fra komplekset og kan derefter deltage i en reduktion et andet sted, som foregår ved, at der igen dannes et kompleks, nu bestående af reduceret coenzym + et andet specifikt enzym + substratmolekyle B, og i dette kompleks overføres brintjoner og elek-

troner fra coenzymet til substratmolekyle B. Coenzymet er derefter i oxideret form, og efter at være frigjort kan det påny deltage i en oxidationsproces. Disse processer er skematisk vist i Fig. 1.



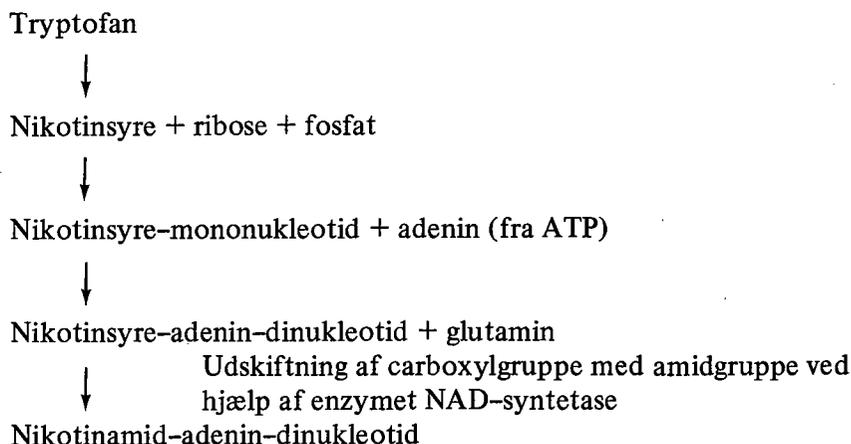
Figur 1  
NAD's funktion som coenzym

Nettoresultatet er, at brintjoner og elektroner er overført fra substratmolekyle A til substratmolekyle B, dvs. at A er blevet oxideret, mens B er blevet reduceret; dette er en såkaldt oxidationsreduktionsproces.

Da en stor del af en organismes stofskifte består i sådanne oxidationsreduktionsprocesser, er de to omtalte coenzymmer uundværlige for livets opretholdelse. Ganske vist findes der andre coenzymmer med tilsvarende funktion, men da de fleste specifikke enzymer som regel kun fungerer sammen med et bestemt coenzym, er NAD og NADP livsvigtige stoffer.

I hovedtrækkene er det kendt, hvordan syntesen af disse coenzymmer foregår hos højere organismer, selv om der synes at være visse variationer, men præcis hvordan forholdene er hos de enkelte arter af bakterier vides ikke.

Startmaterialet synes at være aminosyren tryptofan, der omdannes til nikotinsyre. Den videre syntese fremgår af følgende skema:



Muligvis er det enzymet NAD-syntetase, som *H. influenzae* ikke er i stand til at danne.

Hvis man tilsætter nikotinamid-ribosid til vækstsubstratet, syntetiserer *Haemophilus*-arter normalt NAD, formentlig fordi ovennævnte sidste led i processen bliver overflødig, når nikotinsyre på forhånd er erstattet af nikotinamid. Det er dog muligt, at disse bakterier også mangler andre enzymer end NAD-syntetase, for tilsætning af nikotinsyre eller nikotinamid alene fører ikke til dannelse af NAD, således som tilfældet er hos visse andre bakterier, men forklaringen kan også ligge i de forskellige molekylers varierende evne til at trænge ind i cellerne.

Det hævdes fra biokemisk side (White et al. 1973), at der hos dyr og planter ikke kendes noget enzym, som direkte kan danne nikotinamid af nikotinsyre; omdannelsen kan kun ske ad en omvej, idet der først må dannes NAD på den allerede beskrevne måde, og derefter kan nikotinamid fraspaltes fra NAD. Måske er det forklaringen på den overraskende måde, hvorpå NAD dannes.

Som omtalt mente Thjötta & Avery, at V-faktoren var af vitaminagtig natur; det var derfor de brugte bogstavet V. Dette er for så vidt blevet bekræftet, som det i 1937 blev vist, at nikotinamid fungerer som et vitamin, der forebygger mod sygdommen pellagra. Nødvendigheden af stoffet hos mennesker skyldes, at på en tryptofan-fattig kost kan der ikke dannes tilstrækkelig NAD, hvis der ikke gives et tilskud af nikotinsyre eller nikotinamid. Også mange bakterier har vist sig at kræve tilsætning af nikotinsyre eller et af de ovennævnte intermediærprodukter, men kun arter af slægten *Haemophi-*

*lus* er så specielle, at de kræver tilsætning af det færdige coenzym. Det er denne særstilling hos *Haemophilus*-arterne, man udnytter, når symbiosefænomenet anvendes som diagnostisk prøve. Da næsten alle bakterier, der er i livlig vækst, danner NAD i overskud, og dette overskud diffunderer ud i mediet, vil der i substratet i en vis zone uden om en voksende bakteriekoloni findes frit tilgængeligt NAD, som kan optages og udnyttes af de bakterier af slægten *Haemophilus*, som vokser i nærheden. Om det er færdigt NAD eller forstadier, der diffunderer ud, er ikke kendt med sikkerhed. Kolonierne i denne diffusionszone bliver større end andre steder på substratet, hvis der kun findes utilstrækkelige mængder NAD, i mediet. Det sidste er et vigtigt punkt, for naturligvis bliver der ingen forskel i kolonistørrelse at aflæse, hvis substratet i sig selv indeholder så meget NAD, at kolonierne alle vegne kan vokse ud til maximal størrelse.

Derfor er viden om V-faktorens forekomst og egenskaber nødvendig ved fremstilling af substrater til udførelse af symbioseforsøg.

V-faktor findes både i serum og i blodlegemer, men i størst mængde i blodlegemerne. I en plade fremstillet med frisk hesteblood hæmmes aktiviteten dog af en serumfaktor, så væksten af *H. influenzae* bliver meget sparsom. Ved moderat opvarmning af blodet som ved fremstilling af Levinthalagar eller chokoladeagar frigøres V-faktoren fra blodlegemerne, og serumhæmningen ophæves, så væksten bliver maximal; derfor er disse to substrater uegnede til symbioseforsøg (men velegnede til dyrkning).

V-faktoren findes også i mange planter, bl.a. i betydelig mængde i gær og kartofler, der som ekstrakter tilsættes visse substrater, fx. gærekstrakt til særlige blodplader og kartoffelekstrakt til kighosteplader. For så vidt planteekstrakterne er steriliseret ved autoklavering, burde V-faktoren på grund af sin varmfølsomhed være destrueret, men øjensynlig gælder det ikke altid i praksis under de givne forhold, og uden særlig kontrol bør man i hvert fald ikke anvende kighosteplader og blodplader med gærtilsætning til symbioseforsøg. (I 1978 har substratafdelingen ændret 5% blodpladen, så den indeholder 0,3 % gærekstrakt. Konsekvensen af dette for symbioseforsøgene er i øjeblikket uafklaret).

For inaktivering af V-faktor ved temperaturer på 100°C eller lavere gælder, at den er meget pH-afhængig. Ved pH 7,5 eller højere sker inaktiveringen hurtigt; ved lav pH, fx. 4,5, sker den langsomt. V-faktoren er dialysabel, og der tabes ikke nævneværdige mængder ved filtrering. Ved udførelse af et symbioseforsøg må man ved valg af substrat naturligvis sørge for, at X-faktoren er til stede i tilstrækkelig mængde, så alle andre forudsætninger for maximal vækst omkring stafylokokkolonierne er til stede. Se nærmere herom under porfyrintestens afsnit om biokemisk baggrund.

### 3. Valg af metode

Man kan bruge filtrerpapirskiver imprægneret med NAD til at lægge på dyrkningsmediet i stedet for pletvis udsåning af stafylokokker (Evans et al. 1975). Denne fremgangsmåde sikrer mod falsk positive reaktioner, som kan skyldes andre vækstfaktorer end NAD, men sådanne uspecifikke reaktioner synes at være sjældne. Derfor vil vi til rutinebrug anbefale det klassiske symbioseforsøg med en stafylokokstamme som NAD-kilde og forbeholde discmetoden til kontrol i tilfælde, hvor der er opstået formodning om en falsk positiv reaktion.

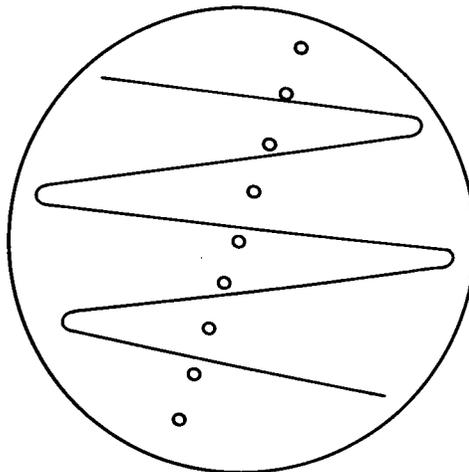
### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Substrat:* En 5 eller 10% hestblods-agarplade med tilsætning af 0,3% gær-ekstrakt (se i øvrigt angående substratvalg stykket om biokemisk baggrund i dette afsnit om symbioseprøver og i afsnittet om porfyrinprøven).

*Ammebakterie:* Den "grå kok" eller en hvilken som helst anden bakterie, som i forsøg har vist sig egnet. Den "grå kok" er en stafylokokstamme, som i årevis har været holdt i live i diagnoseafdelingen ved stadige omsåninger i ekstraktagarstik.

#### *Udførelse*

Blodpladen kan tilsås med en isoleret enkeltkoloni fra en primærplade, men bedre er en renkultur af den bakterie, der skal undersøges. Fremgangsmåden ved udsåningen er vigtig. En øsken med kun lidt kultur trækkes hen over overfladen i ret få zig-zag-strøg med store mellemrum. Det ideelle er at opnå tætliggende enkeltkolonier i de fleste strøg.



Figur 2  
Udsåningsteknik ved symbioseundersøgelse

Derefter udsås den "grå kok" ved hjælp af en lige nål på den måde, at man stikker nålen ned i agaren 6–8 steder. Stikkene skal ligge på en omtrent ret linie, så man senere altid har styr på, hvad man selv har udsået og hvad der evt. er kommet til som kontamination, og stikkene skal placeres midt imellem strøgene (se tegningen). Gør man det på denne måde, vil man som regel opnå mindst eet sted at få enkeltkolonier af den udsåede bakterie og kolonier af ammebakterien i en passende afstand fra hinanden. Både for kort og for lang afstand imellem de to slags kolonier kan gøre symbioseforsøget utydeligt eller i uheldigste tilfælde føre til, at symbiosen slet ikke opdages. Pladen inkuberes ved 35°C i almindelig atmosfære eller i CO<sub>2</sub>-atmosfære, afhængig af bakte-riens krav til inkubationsatmosfære.

### *Aflæsning*

Aflæsningen vil i de fleste tilfælde kunne ske efter 20–24 timer, men er resultatet usikkert, kan man inkubere 1 døgn mere. Man observerer, om kolonierne af den udsåede bakterie viser variation i størrelsen, således at man i nærheden af stafylokokkolonierne finder relativt store kolonier og i stigende afstand derfra faldende kolonistørrelse, til man når ned på den samme lille størrelse, som findes i strøgene længst fra stafylokokkerne. Det hele afspilles inden for en afstand af 0,5 til 1 cm fra randen af stafylokokkolonien.

Selv om der ikke noget sted er opnået enkeltkolonier i en passende afstand fra stafylokokkolonierne, kan forsøget i nogle tilfælde alligevel aflæses, fordi vækststimulationen vil vise sig ved, at vækststrøget tæt ved stafylokokkerne er fyldigere og har en mere gråhvid farve end de øvrige steder, hvor væksten er nærmest farveløs. Her må man dog passe på, da variationer i det afsatte inoculum kan påvirke strøgets udseende.

*Advarsel:* Teknikken ved udsåningen er altafgørende; ofte har et oprindeligt negativt symbioseforsøg vist sig at blive positivt, når udsåningen bliver foretaget korrekt!

### *Fortolkning*

En tydelig stimulation af den ukendte bakteries vækst i umiddelbar nærhed af stafylokokkolonierne – også hvor der kun er tale om en mere diffus vækstforøgelse af selve strøget – kan tolkes som et positivt symbioseforsøg og dermed i de fleste tilfælde som et V-faktorkrav. Der må tages et lille forbehold, fordi mange andre stoffer end NAD diffunderer ud fra en stafylokokkoloni, og ved tilfældighedernes spil kan det forekomme, at den undersøgte bakterie netop stimuleres i sin vækst af et af disse stoffer. Som eksempel herpå kan specielt nævnes visse streptokokker isoleret fra endocarditistilfælde (Cayeux et al. (1971), MacCarthy & Bottone (1974), George (1974), Carey et al (1975)).

Et teknisk korrekt udført negativt symbioseforsøg tages som udtryk for, at bakterien ikke har noget V-krav. Men her bør man altid tænke på, at et negativt udfald får man også trods tilstedeværende V-krav, hvis substratet indeholder for meget V-faktor.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Følgende arter af slægten *Haemophilus* giver ifølge Kilian (1976) positivt udfald af symbioseforsøget: *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis*, *H. parasuis*, *H. pleuropneumoniae*, *H. paragalinarum* og desuden ubenævnte *Haemophilus* spp svarende til Kilians taxon A, B og C som ialt kun omfatter 13 stammer.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Da alle kendte bakterier med V-faktorkrav hører til slægten *Haemophilus*, men ikke alle arter af slægten har dette krav, er prøven værdifuld som et middel til at differentiere mellem arterne i slægten og ved et positivt prøveudfald som et kriterium for, at den pågældende stamme hører til slægten *Haemophilus*.

Både falsk positive og falsk negative prøveudfald kan forekomme, men er sjældne, uden at nøjagtige tal kan opgives.

## 8. Referencer

- Anderson, L.R.: A study of bacilli of the genus *Hemophilus* with regard to the X- and V-growth factors under aerobic and anaerobic conditions. *Amer. J. Hyg.* 13: 164, 1931.
- Cantani, A. jr.: Ueber das Wachstum der Influenzabacillen auf hämoglobinfreien Nährböden. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 36: 29, 1901.
- Carey, R.B., Gross, K.C. & Roberts, R.B.: Vitamin B<sub>6</sub>-dependent *Streptococcus mitior* (*mitis*) isolated from patients with systemic infection. *J. Infect. Dis.* 131: 722, 1975.
- Cayeux, P., Acas, J.F. & Chabbert, Y.A.: Bacterial persistence in Streptococcal endocarditis due to thiol-requiring mutants. *J. Infect. Dis.* 124: 247, 1971.
- Davis, D.J.: Food accessory factors (vitamins) in bacterial culture with especial reference to hemophilic bacilli. *I. J. infect. Dis.* 21: 392, 1917.
- Davis, D.J.: Food accessory factors in bacterial growth. III. Further observations on the growth of Pfeiffer's bacillus (*B. influenzae*). *J. infect. Dis.* 29: 170, 1921a.

- Davis, D.J.: The accessory factors in bacterial growth. IV. The "satellite" or symbiosis phenomenon of Pfeiffer's bacillus (*B. influenzae*). *J. infect. Dis.* 29: 178, 1921b.
- Evans, N.M., Bell, S.M. & Smith, D.D.: New satellitism test for isolation and identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in sputum. *J. clin. Microbiol.* 1: 89, 1975.
- Fildes, P.: A new medium for the growth of *B. influenzae*. *Brit. J. exp. Path.* 1: 129, 1920.
- Fildes, P.: The nature of the effect of blood-pigment upon the growth of *B. influenzae*. *Brit. J. exp. Path.* 2: 16, 1921.
- Fildes, P.: The nature of the action of potato upon the growth of *B. influenzae*. *Brit. J. exp. Path.* 3: 210, 1922.
- George, R.H.: The isolation of symbiotic streptococci. *J. med. Microbiol.* 7: 77, 1974.
- Ghon, A. & v. Preyss, W.: Studien zur Biologie des Influenzabacillus. I. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 32: 90, 1902.
- Ghon, A. & v. Preyss, W.: Studien zur Biologie des Influenzabacillus. II. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 35: 531, 1904.
- Grassberger, R.: Beiträge zur Bakteriologie der Influenza. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 25: 453, 1897.
- Kilian, M.: A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. (Disputats), *J. gen. Microbiol.* 93: 9, 1976.
- Kristensen, M.: Investigations into the Occurrence and Classification of the Haemoglobophilic Bacteria. (Disputats.) Levin & Munksgaard Publ., Copenhagen 1922.
- Lwoff, A. & Lwoff, M.: Studies on codehydrogenases. I. Nature of growth factor "V". *Proc. roy. Soc. B* 122: 352, 1937a.
- Lwoff, A. & Lwoff, M.: Studies on codehydrogenases. II. Physiological function of growth factor "V". *Proc. roy. Soc. B* 122: 360, 1937b.
- McCarthy, L.R. & Bottone, E.J.: Bacteremia and endocarditis caused by satelliting streptococci. *Am. J. Clin. Pathol.* 61: 585, 1974.
- Olsen, O.: Untersuchungen über den Pfeifferschen Influenzabazillus während der Grippepandemie 1918-1920. I. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 84: 497, 1920a.
- Olsen, O.: Untersuchungen über den Pfeifferschen Influenzabazillus während der Grippepandemie 1918-19-20. II. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 85: 12, 1920b.
- Pfeiffer, R.: Vorläufige Mittheilungen über die Erreger der Influenza. *Dtsch. med. Wschr.* 18: 28, 1892.
- Pfeiffer, R.: Die Aetiologie der Influenza. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 13: 357, 1893.
- Thjötta, T.: Studies on bacterial nutrition. I. Growth of *Bacillus influenzae* in hemoglobin-free media. *J. exp. Med.* 33: 763, 1921.
- Thjötta, T. & Avery, O.T.: Studies on bacterial nutrition. II. Growth accessory substances in the cultivation of hemophilic bacilli. *J. exp. Med.* 34: 97, 1921a.
- Thjötta, T. & Avery, O.T.: Studies on bacterial nutrition. III. Plant tissue, as a source of growth accessory substances, in the cultivation of *Bacillus influenzae*. *J. exp. Med.* 34: 455, 1921b.
- Scott, W.M.: In: Medical Research Council: A System of Bacteriology, vol. 2, p. 332, 1929.
- White, A., Handler, P. & Smith, E.: Principles of Biochemistry, 5. ed. The Proteins IV: Chapter 8. Hemoproteins and porphyrins. McGraw-Hill, 1973, p. 166.

## Kapitel 8

### Porfyrinsynteseprøver (*Haemophilus*)

Ved hjælp af porfyrinprøven undersøger man i en direkte enzymtest, om en bakteriesuspension ud fra  $\delta$ -aminolævulinsyre (ALA) kan syntetisere porfyrin. Denne prøve kan med fordel træde i stedet for et kontrolleret vækstforsøg, der undersøger, om bakterierne kræver den såkaldte X-faktor. Både manglende porfyrinsyntese i den direkte enzymtest og manglende vækst uden tilsat X-faktor tages som udtryk for en syntesedefekt hos bakterierne, der medfører, at de livsvigtige stoffer cytokromerne ikke kan dannes. (Nogle biokemikere betegner cytokromerne som enzymer, andre gør det ikke).

#### 1. Historisk indledning

I 1892 lykkedes det Pfeiffer at få vækst af influenzabaciller ved at sætte blod til substratet. Nærmere undersøgelser viste, at det var blodlegemene og ikke serum, som var nødvendigt, og at det var hæmoglobinet og ikke cellestroma, som var den aktive bestanddel. Bakterierne kaldtes derfor hæmoglobinofile. Da Pfeiffer kunne vise, at hæmoglobinet evne til reversibel binding af ilt var uden betydning i denne sammenhæng, nåede han den konklusion, at det var hæmoglobinet jernindhold, som gjorde det til en effektiv vækstoffaktor (Pfeiffer 1893).

Grassberger (1897) bekræftede, at hæmoglobin var det aktive stof i blod, men viste samtidig, at væksten yderligere begunstigedes af et diffusibelt stof fra andre bakteriekolonier på pladen (om denne såkaldte symbiose, se kapitel 7).

Cantani (1901) forsøgte uden held at bruge hæmatin som substrattilsætning, men Ghon & Preyss (1903) viste, at hæmatin var meget effektivt, hvis det brugtes sammen med det aktive stof fra andre bakterier, som Grassberger havde påvist.

Tolkningen af disse og utallige andre tilsyneladende modstridende forsøg blev først mulig, da det lykkedes at vise, at influenzabakterier krævede to af hinanden uafhængige vækstoffaktorer (Davis 1917; Fildes 1921; Thjötta & Avery 1921a, b), dels X-faktoren, der tålte autoklavering og især fandtes

i hæmatin, men desuden i mindre mængde i dyre- og plantevæv, dels V-faktoren, som ikke tålte autoklavering og fandtes i blodlegemer og andre friske væv fra dyr foruden i planter og de fleste bakterier.

Et vigtigt bidrag til forståelse af X-faktorens funktion i cellestofskiftet skyldes A. & M. Lwoff (1937). I begyndelsen af 1930'erne havde de beskæftiget sig med protozoers næringskrav *in vitro* og bl.a. vist, at trypanozomer kræver hæmin for at syntetisere enzymerne i deres respirationskæde, og de viste forøvrigt også, at protoporfyrin kunne erstatte hæmin. De kom derfor på den tanke, at influenzabakteriernes X-faktorkrav kunne have samme betydning. For at undersøge dette bestemte de først den mindste mængde hæmin, som lige netop kunne få influenzabakterier til at vokse, og derefter bestemte de hos bakterier, som var dyrket på dette minimum, størrelsen af iltoptagelsen i et Warburg-apparat og den forøgelse i iltoptagelsen, som blev resultatet af at tilsætte små ekstra mængder hæmin. Da de fandt god parallellitet mellem størrelsen af iltoptagelsen og de tilsatte hæminmængder, drog de den slutning, at hæmin brugtes af bakterierne ved syntese af respirationsenzymer som cytochrom, catalase og peroxidase.

Cytokromerne var genopdaget af Keilin i 1925, og kort efter fremsatte Warburg den formodning, at de indeholdt jernporfyriner (se Warburg 1932). I begyndelsen af 1950'erne var man nået til en delvis forståelse af, hvordan porfyrinerne syntetiseres i den levende organisme. Ved disse undersøgelser benyttede man også mikroorganismer som modeller (se fx. June Lascelles 1956), og dermed var det blevet nærliggende nærmere at undersøge *H. influenzae* som en af de få kendte organismer, der krævede porfyrin som vækstfaktor.

I undersøgelser, der i øvrigt havde et andet hovedformål, var det allerede af Granick og Gilder vist, at protoporfyrin kunne erstatte jernporfyrin som vækstfaktor for *H. influenzae* (Granick & Gilder 1946; Gilder & Granick 1947).

Brumfitt (1959) viste i substitutionsforsøg, at ingen af de andre forstadier til porfyrin, dvs.  $\delta$ -aminolævulinsyre, porfobilinogen, uroporfyrin III eller coproporfyrin III kunne erstatte X-faktoren, men bekræftede, at jernfrit protoporfyrin var virksomt, omend mindre effektivt end hæmatin. White & Granick bekræftede i 1963 Brumfitt's resultater, men opdagede, at deres stamme af *H. aegyptius* ikke kunne udnytte protoporfyrin, men krævede hæmin — en iagttagelse der senere er bekræftet af Kilian et al. (1976) for to andre stammer af *H. aegyptius*. White & Granick foretog desuden de første synteseforsøg med *Haemophilis*-stammer og  $\delta$ -aminolævulinsyre som udgangsmateriale. Forsøgene viste, at hæmin-uafhængige stammer dannede porfobilinogen og uro- og coproporfyrin, mens de hæminafhængige stammer ikke dannede disse intermedieærprodukter.

White foreslog derefter Biberstein at undersøge ukendte *Haemophilus*-stammers evne til at omdanne  $\delta$ -aminolævulinsyre i relation til deres vækstkrav. Biberstein et al. (1963) brugte Lascelles' fremgangsmåde med suspension af kulturerne direkte i substratet og påvisning af dannede porfyriner ved hjælp af fluorescens i ultraviolet lys. De undersøgte 37 stammer af 6 forskellige *Haemophilus*-arter og udførte samtidig vækstforsøg til bestemmelse af NAD- og hæminkrav. Resultatet viste, at alle hæmin-uafhængige stammer dannede porfyrin af  $\delta$ -aminolævulinsyre, og alle ikke-porfyrindannende stammer krævede hæmin i vækstforsøget.

Skønt Biberstein et al. fremhævede vanskelighederne i forbindelse med vækstforsøgene, anbefalede de dog ikke i stedet for at bruge porfyrinpåvisning i den bakteriologiske diagnostik. Det gjorde derimod Kilian (1974), som ved at undersøge over hundrede stammer med enkelte undtagelser kom til samme resultat som Biberstein. Kilian fastlagde de nærmere betingelser for anvendelse af porfyrinprøven til praktisk brug ved differentiering af *Haemophilus*-stammer og fremhævede dens hurtighed og gode reproducerbarhed i modsætning til vækstforsøgene. Lund & Blazevic (1977) har bekræftet Kilians resultater og opfattelsen af porfyrinprøven som en velegnet rutineprøve.

Både Biberstein et al. og Kilian undersøgte muligheden for i samme system at påvise porfobilinogen – det første intermediærprodukt efter  $\delta$ -aminolævulinsyre – ved hjælp af Ehrlich's eller Kovacs' reagens, der påviser et molekyle med een pyrrolring. Det kan lade sig gøre, men Lund & Blazevic's erfaringer gik ud på, at en sådan prøve var for upraktisk til rutinebrug i de tilfælde, hvor der i kulturen dannes indol, som i nogle tilfælde måtte ekstraheres særskilt for at det kunne afgøres, om reaktionen skyldtes indol eller porfobilinogen. I diagnoseafdelingen har vi gjort samme erfaring.

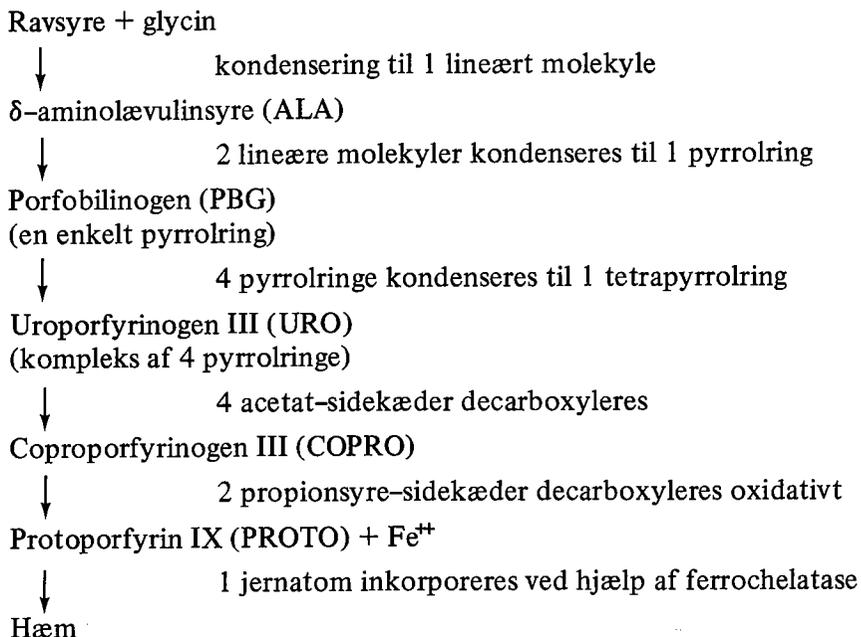
Selv om hæmin og NAD som vækstfaktorer kun kræves i små mængder, har det vist sig, at den nødvendige mængde varierer ret betydeligt. Det er bl.a. vist, at *H. influenzae* og *H. parainfluenzae* kræver forskellig mængde NAD for at give optimal kolonistørrelse, hvilket kan udnyttes diagnostisk (Evans et al. 1974), og det er vist, at *H. ducreyi* kræver betydelig større hæminmængder end andre *Haemophilus*-arter, hvilket måske delvis forklarer de vanskeligheder, der altid har været ved dyrkning af denne bakterie (Hammond et al. 1978).

## 2. Biokemisk baggrund

I hovedtrækkene er det kendt, hvordan porfyrinringen syntetiseres, og man ved, at det sker på samme måde i dyr, planter og mikroorganismer (White & Granick 1963), men det må tilføjes, at flere detaljer stadig er uopklarede

(se fx. Jacobs et al. 1969, 1970, 1971, 1972; Russell 1974; Frydman et al. 1975).

Følgende skema viser stadierne i syntesen. I parentes er anført de almindeligt anvendte forkortelser for intermediærprodukterne, og ud for pilene beskrives elementært, hvad der sker:



Uroporfyrinogen og coproporfyrinogen vil *in vitro* hurtigt autooxideres til uroporfyrin og coproporfyrin.

Det færdige enzym dannes ved, at hæm og det specifikke protein bindes sammen; i cytokrom c for eksempel sker det ved to bindinger fra jernatomet og to bindinger fra porfyrinets vinyl-sidekæder til bestemte aminosyrer i peptidkæden (om cytokromers funktion, se kapitel 14).

Hæmoglobin består af hæm koblet til proteinet globin og kan let spaltes i disse to komponenter. I *hæm* er jernet i divalent form, og hæm er altså ferroprotoporfyrin. Ferriprotoporfyrin kaldes *hæmin*. I fri form er hæm ustabil og iltes hurtigt til hæmin, der som regel forekommer som et kloridsalt og nemt kan opnås i krystallinsk form. *Hæmatin* er ferriprotoporfyrinhydroxyd, som fremstilles af hæmin ved opløsning i overskud af alkali og påfølgende udfældning ved tilbagetitrering med syre.

Alle porfyriner indeholder tetrapyrrolkomplekset og er derfor farvede forbindelser med evne til at fluorescere i ultraviolet lys. Påvisning af fluorescens oplyser ikke noget om, hvilke af de mulige porfyrinforbindelser der er til stede, men ved en kombination af forskellige opløsningsprocedurer og papirkromatografi kan de adskilles og delvis identificeres ved sammenligning med kendte forbindelser.

White & Granick (1963) og Biberstein et al. (1963) er de eneste, som i forsøg med *Haemophilus* og ALA har prøvet at bestemme intermediærprodukterne præcist, og deres resultater er ikke kvantitative. De påviste porfobilinogen og et dipyrrol-lignende produkt, der mentes at være et artefakt af dette, og desuden uroporfyrin, coproporfyrin og porfyrinogener med forskelligt antal frie carboxylgrupper. Protoporfyrin blev ikke med sikkerhed påvist. Resultaterne sandsynliggør i høj grad, at de hæmin-uafhængige *Haemophilus* syntetiserer hæg på stort set samme måde som andre bakterier og højere organismer. Med de hæmin-afhængige stammer kunne ingen af de nævnte intermediærprodukter påvises, og dette i forbindelse med substitueringssøgene synes at vise, at der hos disse stammer er tale om en syntesedefekt omfattende 4-5 enzymer i række.

Da alle porfyriner fluorescerer, vil i Kilians porfyrinprøve allerede den første tetrapyrrolforbindelse i rækken, dvs. uroporfyrin, give en positiv reaktion, og man kan så ikke afgøre, om desuden senere trin i syntesen har fundet sted. I et vækstforsøg er det tilstedeværelsen af det færdige cytokrom, der afgør, om prøven vurderes som positiv eller negativ. Der kan altså teoretisk være syntesedefekter liggende på vejen mellem URO og det færdige enzym, som vil afsløres ved vækstforsøget, men ikke ved porfyrinprøven. De hidtidige erfaringer, omfattende mange hundrede stammer, viser dog, at der i praksis er god overensstemmelse mellem de to prøver. De uoverensstemmelser, der er fundet (Kilian 1974; Lund & Blazevic 1977), går i begge retninger, men er i øvrigt ikke nærmere undersøgt; man er tilbøjelig til at give de dårligt reproducerbare vækstforsøg skylden for dem.

### 3. Valg af metode

Valget står mellem Kilians porfyrinprøve og et vækstforsøg med kontrol over mængden af hæmin og NAD i medierne. Alle er enige om at påpege vanskeligheden ved at udføre tilfredsstillende vækstforsøg af denne art, selv om brugen af discs med hæmin og NAD vel kan siges at have gjort opgaven lettere, men heller ikke sådanne plader fungerer altid (Kilian 1976). Evans & Smith (1972) kom til det resultat, at på grund af disse vanskeligheder blev over 30% af *H. influenzae*-stammer fejldificeret som *H. parainfluenzae*. Da

porfyrinprøven på den anden side er simpel, hurtig og ifølge Kilian har en god reproducerbarhed, kan der ikke være tvivl om, at den bør foretrækkes. Den tidligere anførte teoretiske indvending mod prøven, at en positiv reaktion må kunne forekomme hos stammer med hæminkrav, synes i praksis at være betydningsløs.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Kilians porfyrinprøve* (Kilian 1974)

*Enzymsubstratet*

δ-aminolævulinsyreklorid (ALA)	2 mM (33,5 mg)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,8 mM (19,7 mg)

opløst i 0,1 M fosfatbuffer (Sørensen) med pH 6,9

Aftappes i mængder på 0,5 ml i Widalglass (70 x 10/11 mm). Som kontrol et tilsvarende glas uden tilsat ALA.

Til *fluorescenspåvisningen* anvendes en Woods lampe, fx. en Philips HPW, 125 W med maximum-emmission ved 360 nm.

*Udførelse:* Stammen, der skal undersøges, dyrkes på et substrat, fx. chokoladeagarplade, som giver god vækst på 24 timer. Ældre kulturer bør ikke anvendes (Lund & Blazevic 1977). Kulturen høstes og opslemmes i enzymsubstratet og kontrolglasset til en tæt suspension. Kilian anbefaler en øskenudd pr. glas, men tættere suspension giver hurtigere positive prøver. Glassene henstilles ved 35°C.

*Aflæsning:* Med tilstrækkelig tætte suspensioner kan aflæsningen foretages efter 4 timer; fortsat inkubering efter dette tidspunkt og senere aflæsning nårsomhelst er mulig. Aflæsningen skal foregå i et mørkt rum eller i en mørk kasse. Lampen tændes og holdes i en afstand af 10–20 cm fra glassene. Positive glas udsender en rødlig fluorescens, som sammenholdt med farven i et kontrolglas ikke er vanskelig at erkende, men den uøvede bør altid bruge kontrolglas.

*Fortolkning:* Glas, der fluorescerer, er positive, glas uden fluorescens er negative. En positiv reaktion betyder, at den ukendte stamme kan syntetisere porfyrin af ALA og derfor sandsynligvis også kan danne cytokrom; den har altså intet vækstkrav. (Læg mærke til at i diagnostiske tabeller har der ud for *H. influenzae*'s vækstfaktor krav tidligere stået et +, hvor der nu ud for porfyrinprøven vil komme til at stå et -).

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige ud over de sædvanlige ved omgang med tætte bakteriesuspensioner. Man bør huske, at ultraviolet lys kan fremkalde irritation af øjnene ved for lang tids udsættelse.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med negativ reaktion, dvs. bakterier som har X-faktorkrav

Så vidt vides, er slægten *Haemophilus* den eneste gruppe bakterier, hvor denne syntesedefekt forekommer. Kilian (disputats 1976) anfører følgende *Haemophilus*-arter, som giver negativ porfyrinprøve: *H. influenzae*, alle biotyper; *H. haemolyticus*; *H. haemoglobinophilus* og *H. ducreyi*.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Da en negativ porfyrinprøve så vidt vides kun forekommer hos visse arter af slægten *Haemophilus*, kan prøven anvendes til umiddelbar erkendelse af X-faktorkrævende *Haemophilus*, og det vil i de fleste tilfælde betyde *H. influenzae*. I øvrigt er resultatet af porfyrinprøven det primære taxonomiske inddelingsgrundlag i slægten *Haemophilus* (se Tabel 4 i Kilians disputats).

## 8. Referencer

- Biberstein, E.L., Mini, P.D. & Gills, M.G.: Action of *Haemophilus* cultures on  $\delta$ -amino-levulinic acid. *J. Bact.* 86: 814, 1963.
- Brumfitt, W.: Some growth requirements of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus pertussis*. *J. Path. Bact.* 77: 95, 1959.
- Cantani, A. jr.: Ueber das Wachstum der Influenzabacillen auf hämoglobinfreien Nährböden. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 36: 29, 1901.
- Davis, D.J.: Food accessory factors (vitamins) in bacterial culture with especial reference to hemophilic bacilli I. *J. infect. Dis.* 21: 392, 1917.
- Evans, N.M. & Smith, D.D.: The effect of the medium and source of growth factors on the satellitism test for *Haemophilus* species. *J. med. Microbiol.* 5: 509, 1972.
- Evans, N.M., Smith, D.D. & Wicken, A.J.: Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J. med. Microbiol.* 7: 359, 1974.
- Fildes, P.: The nature of the effect of blood-pigment upon the growth of *B. influenzae*. *Brit. J. exp. Path.* 2: 16, 1921.
- Frydman, B., Frydmand, R.B., Valasinas, A., Levy, S. & Feinstein, G.: The mechanism of uroporphyrinogen biosynthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244: 371, 1975.

- Ghon, A. & v. Preyss, W.: Studien zur Biologie des Influenzabacillus. I. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 32: 90, 1902.
- Gilder, H. & Granick, S.: Studies on the *Haemophilus* group of organisms. Quantitative aspects of growth on various porphyrin compounds. J. gen. Physiol. 31: 103, 1947.
- Granick, S. & Gilder, H.: The porphyrin requirements of *Haemophilus influenzae* and some functions of the vinyl and propionic acid side chains of heme. J. gen. Physiol. 30: 1, 1946.
- Grassberger, R.: Beiträge zur Bakteriologie der Influenza. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 25: 453, 1897.
- Hammond, G.W., Lian, C.-J., Wilt, J.C., Albritton, W.L. & Ronald, A.R.: Determination of the hemin requirement of *Haemophilus ducreyi*: Evaluation of the porphyrin test and media used in the satellite growth test. J. clin. Microbiol. 7: 243, 1978.
- Jacobs, N.J., Jacobs, J.M. & Sheng, G.S.: Effect of oxygen on heme and porphyrin accumulation from  $\delta$ -aminolevulinic acid by suspensions of anaerobically grown *Staphylococcus epidermidis*. J. Bact. 99: 37, 1969.
- Jacobs, N.J., Jacobs, J.M. & Brent, P.: Formation of protoporphyrin from coproporphyrinogen in extracts of various bacteria. J. Bact. 102: 398, 1970.
- Jacobs, N.J., Jacobs, J.M. & Brent, P.: Characterization of the late steps of microbial heme synthesis: Conversion of coproporphyrinogen to protoporphyrin. J. Bact. 107: 203, 1971.
- Jacobs, N.J., Jacobs, J.M. & Morgan, H.E. jr.: Comparative effect of oxygen and nitrate on protoporphyrin and heme synthesis from  $\Delta$ -amino levulinic acid in bacterial cultures. J. Bact. 112: 1444, 1972.
- Keilin, D.: On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants. Proc. roy. Soc. B 98: 312, 1925.
- Kilian, M.: A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. The porphyrin test. Acta path. microbiol. scand. Sect. B 82: 835, 1974.
- Kilian, M.: A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J. gen. Microbiol. 93: 9, 1976.
- Kilian, M., Mordhorst, C.-H., Dawson, C.R. & Lautrop, H.: The taxonomy of haemophili isolated from conjunctivae. Acta path. microbiol. scand. Sect. B 84: 132, 1976.
- Lascelles, J.: The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas spheroides*. Biochem. J. 62: 78, 1956.
- Lund, M.E. & Blazevic, D.J.: Rapid speciation of *Haemophilus* with the porphyrin production test versus the satellite test for X. J. clin. Microbiol. 5: 142, 1977.
- Lwoff, A. & Lwoff, M.: Role physiologique de l'hémine pour *Haemophilus influenzae* Pfeiffer. Ann. Inst. Pasteur. 59: 129, 1937.
- Pfeiffer, R.: Vorläufige Mittheilungen über die Erreger der Influenza. Dtsch. med. Wschr. 18: 28, 1892.
- Pfeiffer, R.: Die Aetiologie der Influenza. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 13: 357, 1893.
- Russell, C.S.: Biosynthesis of porphyrins. II. J.theor. Biol. 47: 145, 1974.
- Thjötta, T. & Avery, O.T.: Studies on bacterial nutrition. II. Growth accessory substances in the cultivation of hemophilic bacilli. J. exp. Med. 34: 97, 1921a.
- Thjötta, T. & Avery, O.T.: Studies on bacterial nutrition. III. Plant tissue, as a source of growth accessory substances, in the cultivation of *Bacillus influenzae*. J. exp. Med. 34: 455, 1921b.
- Warburg, O.: Das sauerstoffübertragende Ferment der Atmung. (Nobel-föredrag). Angew. Chem. 45: 1, 1932.
- White, D.C. & Granick, S.: Hemin biosynthesis in *Haemophilus*. J. Bact. 85: 842, 1963.

## Kapitel 9

### Koagulaseprøver (stafylokokker)

Prøver, der undersøger stafylokokkers evne til at koagulere stabiliseret plasma, og prøver, der påviser plasmas evne til at fremkalde sammenklumpning i suspensioner af stafylokokker. Med førstnævnte slags prøver påvises bakterieproduktet koagulase og med sidstnævnte et bakterieprodukt, der kaldes "clumping factor". De to produkter er af forskellig natur, men meget ofte er de begge samtidigt til stede. Begge slags prøver anvendes til identifikation af *Staphylococcus aureus*.

#### 1. Historisk indledning

Opdagelsen af stafylokokkoagulase tilskrives almindeligvis Much fra Hamborg i et arbejde fra 1908, men faktisk var Leo Loeb i Canada den første, som påviste reaktionen. Under arbejde med koagulationsproblemer fik Loeb den ide, at han ville undersøge fibrinudfældningernes betydning ved lokale inflammationer, og begyndte med at undersøge, hvordan forskellige bakterier virkede på plasma (Loeb 1903/04). Herunder opdagede han, at *Staphylococcus aureus* fremkaldte en kraftig koagulation af gåseplasma, mens en række andre bakterier, især *Enterobacteriaceae*, enten virkede svagt eller slet ikke. Much, der tilsyneladende ikke kendte Loeb's iagttagelse, var interesseret i serum-bactericidi og opdagede under sit arbejde, at *S. aureus* koagulerede citratplasma fra mennesker og heste, mens en række andre bakterier, deriblandt andre slags stafylokokker, ikke fremkaldte koagulation. Han observerede også, at tilsætning af *S. aureus* til en opløsning af fibrinogen ikke fremkaldte koagulation, men medførte en sammenklumpning af bakterierne. Much havde altså uden at gøre sig det klart påvist både koagulase og "clumping factor". Han mente, at koagulationen fremkaldtes af en særlig stafylokoktrombokinas, som han gav navnet stafylokinase.

Først fra midten af 1920'erne synes Much's iagttagelser at være blevet udnyttet praktisk. Det skyldtes især Darányi fra Budapest (1926). Han anvendte citratblod fra kaniner uden at fjerne blodlegemerne og opslemmede i 0,5-1,0 ml citratblod en øsefuld agarkultur og inkuberede 3-6 timer.

Darányi's fortjeneste er, at han på et større materiale viste, at de stafylokokker der gav en positiv koagulaseprøve stammede fra purulente processer, mens de koagulase-negative stafylokokker stammede fra menneskets hud og omgivelserne. Undersøgelser fra de følgende år (Gross 1927; Kemkes 1928; Darányi 1935) bekræftede i det store og hele Darányi's iagttagelser, og efterhånden blev koagulaseprøvens værdi som et middel til at skelne mellem patogene og apatogene stafylokokker etableret.

De nævnte undersøgelser var alle udført som en koagulationsprøve i et reagensglas (tube-test), men i 1934 genoptog Luise Birch-Hirschfeld den agglutinationsprøve på objektglas (slide-test), som Much også havde anvendt i 1908. Hun anvendte plasma fra forskellige dyr stabiliseret på forskellig måde og fandt, at tube-test og slide-test i næsten alle tilfælde gav samme resultat, selv om hun iøvrigt mente, at der var tale om to uafhængige reaktioner.

Cadness-Graves et al. (1943) bekræftede Birch-Hirschfeld's resultater og indførte betegnelsen "clumping factor" for det stof, som fremkaldte en positiv slide-test, altså agglutination. Forholdet mellem tube-test og slide-test har også været undersøgt af Elek (1959) og Munch-Petersen (1961), og det fremgår, at trods vidtgående overensstemmelse findes der en del stammer, som kun er positive i den ene eller den anden af de to slags prøver. Duthie (1954a, b) undersøgte mere indgående de to slags reaktioner og kunne vise, at det stof som udløste koagulationen var forskelligt fra det, som fremkaldte agglutinationen. Han foreslog at kalde det første stof fri koagulase og det andet bundet koagulase, fordi det ikke fandtes frit i kulturerne men bundet til bakteriernes overflade. Andre mener, at betegnelsen bunden koagulase er vildledende og foretrækker betegnelsen "clumping factor".

Som nævnt havde Loeb iagttaget, at visse gramnegative stave kunne fremkalde en plasmakoagulation, og også senere undersøgere har gjort samme iagttagelse. Forklaringen herpå blev fundet i 1948 af Harper & Conway og bekræftet af Mushin & Kerr i 1954. Det som sker i et sådant tilfælde er, at bakterierne udnytter det tilsatte citrat som kulstof- og energikilde, og når citratet, der virker som antikoagulans ved at binde calciumjoner, gradvis forsvinder, indtræder der af sig selv en fysiologisk plasmakoagulation.

Siden Smith & Hale (1944) gjorde opmærksom på analogien mellem den koagulase-inducerede plasmakoagulation og den fysiologiske blodkoagulation har man fra biokemisk side udført et stort antal undersøgelser for nærmere at præcisere lighedspunkter og forskelligheder (se herom i næste afsnit).

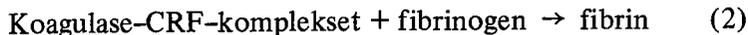
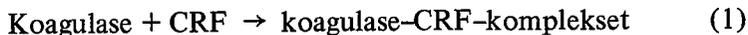
Ifølge en oversigt fra 1958 (cit. af Tager & Drummond 1965) fandtes der på det tidspunkt mindst 45 forskellige metoder til påvisning af koagulase. Blandt nyere modifikationer kan nævnes plademetoder, hvor de enkelte koloniers koagulasedannelse kan iagttages umiddelbart (se Elek 1959; Munch-Petersen 1961; Abramson 1972; Parisi et al. 1973).

## 2. Biokemisk baggrund

Skønt man siden 1948 har haft højt rensede, men dog ikke helt rene koagulasepræparationer fra stafylokokker, er det endnu ikke definitivt afklaret, om koagulase som sådan skal betragtes som et enzym eller et aktivt molekyle af anden natur. Det er i hvert fald et protein, men der er usikkerhed angående molekylestørrelsen, som angives at ligge mellem 5000 og 44.000, hvilket muligvis betyder, at molekylet under rensningsproceduren delvis nedbrydes i mindre komponenter (Tager & Drummond 1965; Tager 1974).

I 1954 viste Sherry & Troll som noget fælles for stoffer som trombin, trypsin og slangegift, der alle kan udløse den fysiologiske koagulationsproces, at de var i stand til at spalte en metylester af tosylarginin (Hartley 1960).

Det blev derefter vist, at koagulase alene manglede denne hydrolyserende evne, men at efter tilsætning af en plasmafaktor, kaldet CRF (coagulase reacting factor) fandt denne specielle spaltning sted ligesom med de andre igangsættere af koagulationsprocessen. Det blev taget som udtryk for, at koagulase-CRF-komplekset fungerer ligesom trombin, og at den koagulase-inducerede plasmakoagulation har væsentlige lighedspunkter med de sidste stadier af den fysiologiske blodkoagulation. Man opstillede følgende model for processen:



Koagulase-CRF-komplekset betegnes i senere arbejder som koagulase-trombin for på samme tid at antyde dets funktion som trombin og dets forskellighed fra bio-trombin, det trombin som fungerer ved den fysiologiske blodkoagulation. Denne model godtages ikke af alle; bl.a. hævdes det af nogle forskere, at den indledende reaktion sker direkte mellem koagulase og fibrinogen.

Et væsentligt argument for ligheden mellem den koagulase-inducerede koagulation og den fysiologiske koagulation er påvisningen af, at blodets protrombin fungerer som CRF. Problemet er blot, at andre stoffer i blodet, som mangler protrombinaktivitet, også kan fungere som CRF (Abramson 1972; Tager 1974; Zajdel et al. 1976).

Foruden lighedspunkterne mellem de to koagulationsprocesser er der grund til at fremhæve, at koagulasekoagulationen er noget særligt ved ikke at kræve tilsætning af calciumjoner og ved at foregå i nærvær af antikoagulantia som citrat, oxalat, heparin og hirudin (Tager & Drummond 1970). Det vides også, at der ved koagulasekoagulation ikke sker nogen aktivering af den såkaldte faktor XIII, hvis funktion er at stabilisere fibrinet, hvilket medfører, at koagu-

lasekoaglet ikke bliver så fast som et normalt blodkoagel. Man kan altså sige, at trods væsentlige lighedspunkter er de to processer ikke i alle detaljer identiske, og at en fuldstændig biokemisk forståelse af stafylokokkoagulasens virkningsmekanisme stadig mangler.

Stafylokokkoagulase forekommer som et ekstracellulært produkt i kulturerne. Det dannes både under lag-fase og i logaritmisk væksthase, og mængden er som regel større, hvis kulturen indeholder serum eller albumin. Hvad der er baggrunden for denne "stimulation" vides ikke. I nogle kulturer dannes et enzym, sandsynligvis en protease, som ødelægger koagulasen, og det har været formodet, at albumin beskyttede koagulasen mod proteasens virkning, men forsøg taler imod denne forklaring. Ved immunologiske forsøg er det vist, at der er fire antigenet forskellige koagulasen (Duthie 1952, 1954 a, b).

Den ekstracellulære eller fri koagulase er efter de flestes opfattelse forskellig fra den såkaldte "clumping factor", hvorfor betegnelsen bundet koagulase for sidstnævnte er uheldig og bør undgås. Den afgørende forskel er, at "clumping factor" findes bundet til cellevæggen og reagerer direkte med fibrinogen uden medvirken af en plasmfaktor. Resultatet af reaktionen er, at fibrinogenet bindes til bakteriernes overflade, og at der derefter kan foregå en sammenklumpning af cellerne. Også serologisk er "clumping factor" forskellig fra koagulaserne. Man har fremstillet "clumping factor" ved at ekstrahere vaskede, frysetørrede bakterier med myresyre og fælde med acetone og herefter koncentrere det ved adsorption til cellulosefosfat efterfulgt af eluering med salt-syre. Produktet er et stærkt basisk protein med isoelektrisk punkt ved 10,2-10,7, men en nærmere karakterisering af proteinet mangler (Brückler et al. 1974).

### 3. Valg af metode

Det er en afgørende betingelse for at kunne udføre pålidelige koagulaseprøver at råde over egnet plasma. Fire krav bør plasmaet teoretisk opfylde (Tager & Drummond 1965):

- 1) et tilstrækkeligt indhold af CRF;
- 2) et tilstrækkeligt indhold af fibrinogen;
- 3) lav fibrinolytisk evne, og
- 4) kun små mængder inhibitorer.

Orth et al. (1971) har vist, at plasma fra homo, kanin og svin har større indhold af CRF end hesteplasma, og at mængden i de førstnævnte slags plasma gør dem egnede til brug i koagulaseprøver. Individuel mangel på CRF kan forekomme på grund af den genetisk bestemte konstitution (Smith & Hale 1944).

Orth et al. viste også, at den fibrinolytiske aktivitet var mindst i svineplasma og humant plasma. Med hensyn til inhibitorer fandt Tager & Hales (1948), at 20% af humane plasmaprøver gav hæmning, men om det skyldtes specifikke antistoffer eller uspecifikke hæmmestoffer blev ikke afgjort.

I praksis vil valg af plasma tildels være bestemt af, hvor nemt man kan skaffe sig en bestemt slags blod. Hvis hver ny batch af plasma kontrolleres for egnethed med udvalgte positive og negative stammer, skulle man være på den sikre side, men man bør i denne forbindelse ikke glemme, at forskellige phaggrupper har antageligt forskellige koagulasere, dvs. at de positive kontrolstammer skal repræsentere alle de hyppigt forekommende phaggrupper. Da man på Seruminstittuttet har nem adgang til hesteblood, og da Martin Kristensen i 1930'erne viste, at det var bedre egnet end humant blod, har hestecitratplasma siden været anvendt.

Standardmetoden i diagnoseafdelingen er reagensglasprøven med påvisning af koageldannelse. Ønsker man i særlige tilfælde et resultat omgående, kan man udføre en "clumping test" på objektglas, men resultatet bør – i hvert fald ved negativt udfald – bekræftes med standardmetoden.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

##### *A. Koagulaseprøve i reagensglas*

*Substrat:* Hestecitratplasma fremstilles ved at tappe 90 ml hesteblood i 10 ml af en 10% opløsning af natriumcitrat i destilleret vand. Blandingen henstår 2 døgn i køleskab, hvorefter plasma skilles fra og aftappes i 1 ml portioner i høje, tynde glas (155 x 10/11 mm) (man kan ifølge litteraturen uden skade fortynde plasma væsentligt). Kontrollen af plasma foregår i stafylokoklaboratoriet i afdelingen for hospitalsinfektioner. Glassene kan i hvert fald holde sig i flere uger ved 4°C.

*Udførelse:* Glassene tilsås med en hel koloni fra en døgngammel pladekultur eller med 0,5 ml fra en flydende kultur, fx. også direkte fra et af bloddykningsmedierne. Til korrekt udførelse bør der medtages et utilsået kontrolglas, et kontrolglas tilsået med en koagulase-positiv stamme og et kontrolglas tilsået med en koagulase-negativ stamme. Glassene inkuberes ved 35°C.

*Aflæsning:* Glassene aflæses efter 4 og 24 timer med henblik på dannelse af et koagel ved at man vipper dem forsigtigt og iagttagende, om plasmaet er flydende eller stivnet. Glasset må ikke rystes, da man derved kan ødelægge en begyndende koageldannelse. Hvis koaglet bliver siddende i bunden når glasset vendes på hovedet, er det en oplagt positiv reaktion, og efter nogles opfattelse skal kun så udtalte reaktioner regnes som positive (Sperber & Tatini 1975). Det almindeligste er dog, at ethvert tydeligt tegn på koageldannelse,

selv om den ikke omfatter hele plasmamængden, regnes for en positiv reaktion. Af hensyn til den mulighed, at bakterierne kan aktivere det i plasma forekommende plasminogen til plasmin, som kan opløse et allerede dannet koagel (Orth et al. 1971; Zajdel et al. 1976), har det været anbefalet at foretage aflæsningen efter 1, 2, 4, 8 og 24 timers inkubering (Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci 1965).

*Fortolkning:* Med en renkultur af stafylokokker er en positiv reaktion pr. definition udtryk for, at stammen er en *Staphylococcus aureus*. Man kan ikke slutte omvendt, at *S. aureus* er udelukket fordi reaktionen er negativ, da der findes et mindre antal koagulase-negative *S. aureus*. Man kan få en falsk positiv reaktion, hvis der som forurening findes en gramnegativ stav som kan udnytte det tilsatte citrat. Det vil navnlig kunne blive aktuelt, hvis reaktionen udføres direkte fra et bloddykningsglas eller anden flydende kultur uden forudgående rendyrkning. Er prøven udført under disse betingelser, må en mikroskopisk renhedskontrol af glasset derfor anbefales.

#### *B. Objektglasprøve for "clumping factor"*

*Reagens:* Humant citratplasma, som fremstilles ved at blande 4,5 ml frisk-tappet blod med 0,5 ml af en 3,13% opløsning af natriumcitrat i destilleret vand. Ved  $-20^{\circ}\text{C}$  er reagentet holdbart i længere tid, ved  $+4^{\circ}\text{C}$  kun i få dage.

*Udførelse:* Fra en pladekultur fremstilles en tæt suspension af stafylokokker i en dråbe destilleret vand på et objektglas. Tætheden skal være ca.  $10^{11}$  bakterier pr. ml. Til bakteriesuspensionen tilsættes en dråbe ufortyndet citratplasma. (Man kan også bruge en 1% fibrinogenopløsning som reagens (Brückler et al. 1974)). Suspension og reagens blandes omhyggeligt i 5 sekunder.

*Aflæsning:* Hvis der indtræder en makroskopisk synlig sammenklumpning af bakterierne, er prøven positiv; hvis suspensionen forbliver homogen, er den negativ. Sammenklumpningen skal finde sted i løbet af 10–15 sekunder, og det er en fejl at betragte en senere indtrædende klumpning som en svagt positiv reaktion.

*Fortolkning:* Falsk positive reaktioner kan forekomme på grund af spontan autoagglutination. Det sikrer man sig imod ved parallelt at observere en dråbe af bakteriesuspensionen, som i stedet for reagens har fået tilsat en dråbe vand.

### **5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Risikoen ved at arbejde med tætte suspensioner af *S. aureus* i det hele taget og specielt ved at manipulere store dråber på et objektglas må ikke undervurderes. Der er mulighed både for aerosoldannelse og direkte kontamination af hænderne.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Kun *S. aureus* er positiv, men koagulase-negative *S. aureus* forekommer undtagelsesvis (Korman 1963; se også Bergey's Manual, 8. udg. 1974, p. 486).

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Forudsat at man anvender et kontrolleret, velegnet plasma har koagulaseprøven god reproducerbarhed. Prøven anvendes udelukkende til differentiering inden for slægten *Staphylococcus*, hvor den betragtes som den afgørende egenskab til identifikation af *S. aureus*.

## 8. Referencer

- Abramson, C.: Staphylococcal enzymes. In: Cohen, J.O. (ed.): The Staphylococci. John Wiley & Sons, New York 1972, p. 187.
- Birch-Hirschfeld, L.: Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile des Säugetierblutplasmas. Klin. Wschr. 13: 331, 1934.
- Brückler, J., Schaeg, W. & Blobel, H.: Untersuchungen am "Clumping Factor" von Staphylokokken. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 227: 228, 1974.
- Cadness-Graves, B., Williams, R., Harper, G.J. & Miles, A.A.: Slide-test for coagulase-positive staphylococci. Lancet 1: 736, 1943.
- Darányi, J.v.: Pathogenität und Einteilung der Staphylokokken. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 99: 74, 1926.
- Darányi, J.v.: Ueber den Nachweis der Pathogenität der Staphylokokken. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 134: 13, 1935.
- Duthie, E.S.: Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase. J. gen. Microbiol. 7: 320, 1952.
- Duthie, E.S.: Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. J. gen. Microbiol. 10: 427, 1954a.
- Duthie, E.S.: The production of free staphylococcal coagulase. J. gen. Microbiol. 10: 437, 1954b.
- Elek, S.D.: *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. Chapter VIII: Staphylocoagulase. Livingstone Ltd., London 1959, p. 178.
- Gross, H.: Über Virulenz und Virulenz-Prüfungsmethoden von Staphylokokken. Klin. Wschr. 6: 2281, 1927.
- Harper, E.M. & Conway, N.S.: Clotting of human citrated plasma by Gramnegative organisms. J. Path. Bact. 60: 247, 1948.
- Hartley, B.S.: Proteolytic Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 29: 45, 1960.
- Kemkes, B.: Plasmakoagulase und Pathogenität der Staphylokokken. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 109: 11, 1928.
- Korman, R.Z.: Coagulase-negative mutants of *Staphylococcus aureus*: Genetic studies. J. Bact. 86: 363, 1963.

- Loeb, L.: The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J. med. Res.* 10: 407, 1903-04.
- Much, H.: Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *Staphylokokkus aureus*. *Biochem. Z.* 14: 143, 1908.
- Munch-Petersen, E.: Staphylococcal coagulase. A survey of contributions during the last two decades. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 178: 377, 1961.
- Mushin, R. & Kerr, V.J.: Clotting of citrated plasma and citrate utilization by intestinal Gram-negative bacilli. *J. gen. Microbiol.* 10: 445, 1954.
- Orth, D.S., Chugg, L.R. & Anderson, A.W.: Comparison of animal sera for suitability in coagulase testing. *Appl. Microbiol.* 21: 420, 1971.
- Parisi, J.T., Baldwin, J.N. & Sottile, M.: Pour-plate method for the detection of coagulase production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 25: 558, 1973.
- Sherry, S. & Troll, W.: The action of thrombin on synthetic substrates. *J. biol. Chem.* 208: 95, 1954.
- Smith, W. & Hale, J.H.: The nature and mode of action of staphylococcus coagulase. *Brit. J. exp. Path.* 25: 101, 1944.
- Sperber, W.H. & Tatini, S.R.: Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 29: 502, 1975.
- Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci: Recommendations. *Int. Bull. bact. Nomencl. and Tax.* 15: 109, 1965.
- Tager, M. & Hales, H.B.: Differences in the resistance of human plasmas to staphylocoagulase. *Yale J. Biol. Med.* 21: 91, 1948.
- Tager, M. & Drummond, M.C.: Staphylocoagulase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 128: 92, 1965.
- Tager, M. & Drummond, M.C.: Implications of Staphylocoagulase-thrombin and fibrinogen interaction. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) Suppl.* 39: 291, 1970.
- Tager, M.: Current views on the mechanisms of coagulase action in blood clotting. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 236: 277, 1974.
- Zajdel, M., Wegrzynowicz, Z., Sawicka, J., Jeljaszewicz, J. & Pulverer, G.: Mechanism of action of staphylocoagulase. *Zbl. Bakt. I. Abt. Reihe A, Suppl.* 5: 549, 1976.

# **Toleransprøver**



## Kapitel 10

### Galdeopløselighedsprøver

Prøver der påviser opløsning (lyse) af bakterieceller induceret af galde eller galdesure salte.

#### 1. Historisk indledning

Under arbejdet med at bekæmpe kvægpest (Rinderpest) i Sydafrika i 1896–97 observerede Koch, at hvis man injicerede galde fra kvæg, der var død af kvægpest, subkutant på raske dyr, så fik de kun ganske lette tilfælde af sygdommen og var derefter beskyttet i længere tid mod letalt forløbende kvægpest (Koch 1896–97). Neufeld (1900), der var elev af Koch, undersøgte, om lignende forhold gjorde sig gældende ved andre septiske infektioner, og observerede herunder, at galde fra normale dyr havde en specifik opløsende virkning på pneumokokker, mens en række andre bakteriearter, heriblandt streptokokker, ikke opløstes, men tværtimod voksede i galde. Ved tilsætning af 0,1 ml kanningalde til 1–2 ml bouillonkultur af pneumokokker blev disse opløst og dræbt inden for et tidsrum, der lå mellem 3–4 minutter og 15 minutter. Neufeld fandt endvidere, at galdens lytiske effekt varierede betydeligt, og at galden tålte  $\frac{1}{2}$  times kogning uden at miste evnen til at opløse pneumokokkerne. Lysen kunne foregå ved temperaturer fra 1–2°C op til 38°C, men når pneumokokkerne først var dræbt ved opvarmning, kunne de ikke opløses af galde. Han viste, at udfældede glykol- og taurokolsure galdesalte havde samme virkning som ukoblede galdesalte. Nicolle & Adil-Bey (1907) synes allerede i 1900–01 at have bekræftet de væsentligste af Neufeld's observationer.

I 1907 bekræftede Levy fra Berlin, at rent galdesurt salt (2,5% Na-taurocholat) havde samme lytiske effekt som galde, og beskrev en metode til undersøgelse for bakteriers opløselighed i galdesurt salt. Han fandt, at denne metode ved siden af patogenitetsforsøg på dyr var den bedste af de foreliggende tests til at skelne mellem pneumokokker og streptokokker og anbefalede den som en pålidelig prøve (i dag regnes pneumokokker til genus *Streptococcus*, men tidligere blev disse to grupper henført til hver sin genus).

Prøvens anvendelighed blev hurtigt bekræftet af bl.a. Schultze (1907), Mandelbaum (1907) og Aschner (1917). Mair (1917) fandt, at deoxycholat virkede endnu bedre end taurocholat, og viste desuden, at ved stærkt sur reaktion i kulturerne på grund af glukoseforgæring skete der en udfældning af galdesaltet, som forstyrrede aflæsningen; han foreslog derfor at bruge Na-deoxycholat i stedet for galde. Kozlowski (1925) viste, at oksegalde indeholdt sæber (estere) af højere umættede fedtsyrer (Na-oleat, -linoleat og -linolenat), som var 100 gange mere effektive end galdesure salte til at lysere pneumokokker, men disse forbindelser er ikke senere blevet anvendt. Downie et al. (1931) undersøgte 20 forskellige galdesaltes lytiske virkning og fandt, at deres aktivitet syntes at være afhængig af antal og position af OH-grupper. Han mente, at deres lytiske effekt ikke udelukkende kunne forklares ud fra deres virkning på overfladespændingen. Klein (1935) foreslog at anvende saponin i stedet for galde; her er der dog formentlig tale om en helt anden proces, da der kræves tilsætning af kolesterol.

Ikke alle de nævnte forfattere fandt galdeopløselighedstesten pålidelig til at skelne mellem pneumokokker og streptokokker, hvilket ifølge Kelly & Gussin (1924) formentlig skyldtes forskelle i testens udførelse (frisk galde, opvarmet galde, forskellige galdesalte, forskellige fortyndinger, forskellige vækstmedier etc.). Selv fandt Kelly & Gussin, at naturlig uopvarmet oksegalde gav de bedste resultater. En anden grund til usikkerhed angående testens pålidelighed i begyndelsen af århundredet var, at type III pneumokokker fejlagtigt klassificeredes som streptokokker under navnet *Streptococcus mucosus*, mens de i galdetesten naturligvis opførte sig som de pneumokokker de var (Neufeld & Schnitzer 1928).

I 1925 fandt Reiman, at R-pneumokokker (R = Rough = kapselløse) var mere resistente over for galdens lytiske effekt end S-pneumokokker (S = Smooth = med kapsel). Denne observation blev siden udbygget af Downie et al. (1931) og især af Erna Lund (1959), som fandt, at 50 undersøgte S-pneumokokker var galdeopløselige, mens 3 af 15 R-pneumokokker var uopløselige ligesom 80 streptokokker. Lund (1959) viste også, at hvis hun gjorde S-pneumokokker kapselløse (R-variant) ved gentagne passager i homologt antiserum, så blev de uopløselige i galde efter første passage, men hun fandt i øvrigt, at efter yderligere passager i homologt antiserum blev alle R-varianterne igen følsomme for galde.

Det havde længe været kendt, at pneumokokker havde en udpræget tendens til autolyse, og Lord & Nye (1922a, b) foreslog, at dette kunne skyldes et endocellulært enzym, og at galdens lytiske effekt forårsagedes af, at galden aktiverede dette autolytiske enzym. Dette synspunkt støttedes af Atkin (1926), mens Avery & Cullen (1920a, b) og Goebel & Avery (1929), som i studiet af

pneumokokkenzymer benyttede galde til at opløse pneumokokker ved køleskabstemperatur, fremlagde resultater, der tydede på, at galdens lytiske effekt var uafhængig af pneumokokkernes enzymaktivitet. Dubos (1937) viste – i delvis modsætning til den herskende opfattelse – at pneumokokker, der behandlede så forsigtigt med små koncentrationer af jod eller med organiske syrer ved surt pH, at de ikke længere var formeringsdygtige, dog stadigvæk var opløselige i galde og stadigvæk undergik autolyse efter drabet. Dubos tolkede disse resultater således at galdeeffekten kun involverede ét eller nogle få af de enzymer, der deltager i autolyseprocessen. Dette støttes af nyere undersøgelser (Mosser & Tomasz 1970; Høltje & Tomasz 1975; se *Biokemisk baggrund*).

Hawn & Beebe (1965) udarbejdede en tidsbesparende direkte plademethode, hvor enkeltkolonier dækkes med en øsefuld 2% Na-deoxycholat, og denne metode viste fuld overensstemmelse med den konventionelle reagensglasmetode. En lignende fremgangsmåde anvendtes af Drew (1977) til primær screeningsmetode.

## 2. Biokemisk baggrund

Galdesyre er steroider, som syntetiseres fra kolesterol, og de omfatter bl.a. cholsyre (3,7,12-trihydroxycholansyre), chenodeoxycholsyre (3,7-dihydroxycholansyre), deoxycholsyre (3,12-dihydroxycholansyre) og lithocolsyre (3-hydroxycholansyre). De findes som salte i galden konjugeret til glycin og taurin ved hjælp af amidbindinger, kaldet glycocholsyre og taurocholsyre. De rene galdesyre er tungt opløselige i vand og let opløselige i alkohol, hvormod alkalisaltene er let opløselige i vand og nedsætter vandets overfladespænding, dvs. virker som detergens med stærkt emulgerende egenskaber over for lipider. Galdesaltene er galdens vigtigste bestanddel med den fysiologiske opgave at fremme fordøjelse og absorption af fedtstoffer fra tarmen. Forholdet mellem taurocholsyre og glycocholsyre i galden varierer fra dyreart til dyreart.

Galdesalte er som anført detergenser, og andre detergenser, fx. saponiner og sæber af højere umættede fedtsyrer, forårsager også lyse af pneumokokker, men kun under særlige omstændigheder. Der er en sammenhæng mellem den kemiske struktur af galdesaltene og deres evne til at inducere lyse af pneumokokker, idet aktivitet forudsætter tilstedeværelse af mindst én hydroxylgruppe, og den stiger ved tilstedeværelse af to hydroxylgrupper på kulstofatom 3 og 12 (Downie et al. 1931).

Mekanismerne, der ligger bag lysten af pneumokokker i nærvær af galdesalte, er ikke fuldt opklarede, idet tolkningen af galdesaltes lytiske effekt vanskeliggøres ved, at pneumokokker har en udpræget tendens til autolyse.

Meget tyder dog på, at galdesaltene virkning skyldes, at de påvirker den naturlige autolytiske proces. Autolysen tilskrives et kompleks af intracellulære enzymer, under eet kaldet autolysin. Der indgår i komplekset bl.a. en amidase = N-acetylmuramyl-L-alanindase = mucopeptid amidohydrolase, som spalter amidbindingen mellem alanin og muraminsyre i peptidoglycan (Mosser & Tomasz 1970). Nye undersøgelser (Höltje & Tomasz 1975) tyder på, at autolysins aktivering og aktivitet hæmmes i bakteriecellen af lipoteichoinsyre, og at deoxycholat ophæver den hæmning, som lipoteichoinsyre har på pneumokokautolysin. Det er foreslået, at mekanismen kunne være, at deoxycholat og andre detergentia specifikt spalter et autolysin-lipoteichoinsyre-kompleks.

Galdeopløselighedsprøven foregår bedst og er lettest aflæselig ved pH 6,8-7,6, hvorfor pneumokokkerne teoretisk set ikke bør dyrkes i tilstedeværelse af forgærbart kulhydrat. Dette sidste betyder dog næppe ret meget i praksis ifølge Kelly & Gussin (1924), da pH ikke kommer under 5-5,5 ved vækst af pneumokokker i et glukoseglas, og ved dette pH kan galdetesten godt gennemføres. Reaktionen foregår bedst ved 37°C og med unge, levende kulturer, da døde celler ikke lyserer. Reaktionen kan dog foregå ved lavere temperaturer. Klorid med monovalente katjoner, fx. NaCl, hæmmer reaktionen i små koncentrationer (0,004-1%), men fremmer reaktionen i højere koncentrationer (2-4%); klorid med divalente katjoner, fx. CaCl<sub>2</sub>, virker lige omvendt (Falk & Yang 1926a, b).

### 3. Valg af metode

I diagnoseafdelingen og i pneumokoklaboratoriet anvendes galdeopløselighedstesten ikke, idet man i stedet anvender optochintesten til at diagnosticere pneumokokker, da denne test ifølge Lund (1959) er bedre til dette formål. I pneumokoklaboratoriet suppleres proceduren som regel med en undersøgelse for kapselreaktion i omniserum. I nogle andre laboratorier anvendes imidlertid galdeopløselighedstesten i form af en hurtig plademethode. I det følgende skal derfor den klassiske reagensglasmetode (som referencemetode) og et par hurtige plademethoder beskrives.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### A. Reagensglasmetoden (Lund 1959, 1960)

*Substrat:* 5% serumbouillon eller oksebouillon med 1% glukose.

*Reagens:* 10% Na-taurocholat i filtreret oksebouillon.

*Udførelse:* Serumbouillon eller glukosebouillon tilsås med stammen, der skal undersøges og dyrkes ved 35–37°C i 1 døgn. Derefter afpipetteres 1 ml kultur i to Widalglasser. Til det ene sættes 1 ml 10% Na-taurocholat og til det andet (kontrolglasset) 1 ml utilsået bouillon. Herved opnås samme fortynding af kulturen i begge glas og dermed ensartet udgangsturbiditet. Prøveglas og kontrolglas sættes i 10 minutter ved 35°C før aflæsningen.

*Aflæsning og fortolkning* sker ved at sammenligne turbiditeten i de to glas. Hvis prøveglasset er helt opklaret fordi cellerne er opløst, er prøven positiv, dvs. kulturen er galdeopløselig. Hvis turbiditeten er ens i begge glas, er prøven negativ, dvs. kulturen er ikke galdeopløselig. Hvis der kun er delvis opklaring af prøveglasset sammenlignet med kontrolglasset, regnes prøven også for negativ. Man kan yderligere sikre resultatet ved før aflæsningen at foretage udsåning af en øsefuld fra begge glas på en blodplade. Ved en positiv prøve vil man finde vækst fra kontrolglasset, men ikke fra prøveglasset. Ved en negativ prøve kommer der ensartet vækst fra begge glas. Ved delvis opklaring vil man finde fuld vækst fra kontrolglasset og sparsom vækst fra prøveglasset; dette tolkes som et negativt udfald af prøven.

#### *B. Plademetoden* (Hawn & Beebe 1965)

*Substrat:* 10% eller 5% blodagarplade

*Reagens:* 2% Na-deoxycholat (pH 7,0) i bouillon eller fysiologisk saltvand

*Udførelse:* En øsefuld eller en dråbe af galdesaltopløsningen anbringes oven på en suspekt koloni, og pladen inkuberes ved 37°C i 30 minutter.

*Aflæsning og fortolkning:* Hvis kolonien er forsvundet efter inkubationen, kun efterladende den  $\alpha$ -hæmolytiske zone hvor den lå, kaldes bakterien for galdeopløselig.

En variation af ovenstående metode anvendes i nogle laboratorier; reagenset er dehydreret frisk oksegalde (Bacto-Ox-Gal fra Difco), hvoraf en knivspids anbringes oven på en suspekt koloni. Inkubation, aflæsning og fortolkning følger Hawn & Beebe's metode.

### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

### 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

I Bergey's Manual, 8. udg., er der kun anført oplysninger om pneumokokker og andre streptokokker.

Genus *Streptococcus*: Alle smooth-varianter af *S. pneumoniae* er opløselige

i galdsure salte. 20% af rough-varianter af *S. pneumoniae* og alle andre streptokok-species er uopløselige i galde.

Genus *Haemophilus*: kan angiveligt være galdeopløselig (se Blazevic & Ederer 1975).

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven anvendes udelukkende til at skelne smooth-varianter af pneumokokker fra andre  $\alpha$ -hæmolytiske streptokokker og er her lige så god som optochintesten og kapselsvulsttesten. Ved rough-varianter af pneumokokker må optochintesten foretrækkes.

### 8. Referencer

- Aschner, P.W.: Studies on pneumococci and streptococci. *J. infect. Dis.* 21: 409, 1917.
- Atkin, E.E.: The rationale of the bile solubility of pneumococcus. *Brit. J. exp. Path.* 7: 167, 1926.
- Avery, O.T. & Cullen, G.E.: Studies on the enzymes of pneumococcus. I. Proteolytic enzymes. *J. exp. Med.* 32: 547, 1920a.
- Avery, O.T. & Cullen, G.E.: Studies on the enzymes of pneumococcus. II. Lipolytic enzymes: esterase. *J. exp. Med.* 32: 571, 1920b.
- Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. John Wiley & Sons, New York, 1975, p. 7.
- Downie, A.W., Stent, L. & White, S.M.: The bile solubility of pneumococcus, with special reference to the chemical structure of various bile-salts, *Brit. J. exp. Path.* 12: 1, 1931.
- Drew, W.L.: Value of sputum culture in diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J. clin. Microbiol.* 6: 62, 1977.
- Dubos, R.J.: Mechanism of the lysis of pneumococci by freezing and thawing, bile, and other agents. *J. exp. Med.* 66: 101, 1937.
- Falk, I.S. & Yang, S.Y.: Studies on respiratory diseases. XXV. The influence of certain electrolytes and nonelectrolytes in the bile solubility of pneumococci. *J. infect. Dis.* 38: 1, 1926a.
- Falk, I.S. & Yang, S.Y.: Studies on respiratory diseases. XXVI. The lysis of pneumococci by sodium oleate. *J. infect. Dis.* 38: 8, 1926b.
- Goebel, W.F. & Avery, O.T.: A study of pneumococcus autolysis. *J. exp. Med.* 49: 267, 1929.
- Hawn, C.V.Z. & Beebe, E.: Rapid method for demonstrating bile solubility of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bact.* 90: 549, 1965.
- Höltje, J.-V. & Tomasz, A.: Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 72: 1690, 1975.
- Kelley, F.B. & Gussin, H.: Studies on respiratory diseases. XIX. Untreated bile as a solvent for pneumococci. *J. infect. Dis.* 35: 327, 1924.
- Klein, S.J.: Studies on the solubility of pneumococcus in saponin. II. Sensitization by ergosterol. *J. Bact.* 26: 215, 1933.

- Klein, S.J.: Studies on the solubility of pneumococcus in saponin. III. The saponin-lysis reaction as a means of differentiating pneumococcus and streptococcus. *J. Bact.* 30: 43, 1935.
- Koch, R.: Reiseberichte über Rinderpest, Bubonenpest in Indien und Afrika, Tsetse- oder Surrakrankheit, Texasfieber, tropische Malaria, Schwarzwasserfieber. Verlag von Julius Springer, Berlin 1898. (Gesammelte Werke von Robert Koch, II. Band, p. 688, Leipzig 1912).
- Kozlowski, A.: Comparative studies of the action on the pneumococcus of bile acids and unsaturated fatty acids, found in bile in the form of soaps. *J. exp. Med.* 42: 453, 1925.
- Levy, R.: Differentialdiagnostische Studien über Pneumokokken und Streptokokken. *Virchows Arch. path. Anat.* 187: 327, 1907.
- Lord, F.T. & Nye, R.N.: Studies on the pneumococcus. II. Dissolution of pneumococci at varying hydrogen ion concentrations. Effect of temperature, previous killing of the organisms, and fresh human serum on the phenomenon. Behavior of other organisms. *J. exp. Med.* 35: 689, 1922a.
- Lord, F.T. & Nye, R.N.: Studies on the pneumococcus. IV. Effect of bile at varying hydrogen ion concentrations on dissolution of pneumococci. *J. exp. Med.* 35: 703, 1922b.
- Lund, E.: Diagnosis of pneumococci by the optochin and bile tests. *Acta path. microbiol. scand.* 47: 308, 1959.
- Lund, E.: Laboratory diagnosis of *Pneumococcus* infections. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 23: 5, 1960.
- Mair, W.: A contribution to the serological classification of the bile-soluble diplococci. *J. Path. Bact.* 21: 305, 1917.
- Mandelbaum, M.: Ueber die Wirkung von taurocholsaurem Natrium und tierischer Galle auf Den Pneumokokkus, *Streptococcus mucosus* und auf die andern Streptokokken. *Münch. med. Wschr.* 54: 1431, 1907.
- Mosser, J.L. & Tomasz, A.: Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. biol. Chem.* 245: 287, 1970.
- Neufeld, F.: Ueber eine spezifische bakteriolytische Wirkung der Galle. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 34: 454, 1900.
- Neufeld, F. & Schnitzer, R.: Pneumokokken. In: W. Kolle, R. Kraus & P. Uhlenbuth (eds.): *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*. Gustav Fischer, Jena, & Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien. Band IV: 926, 1928.
- Nicolle, M. & Adil-Bey: Action de la bile sur le pneumocoque. *Ann. Inst. Pasteur.* 21: 20, 1907.
- Reimann, H.A.: Variations in specificity and virulence of pneumococci during growth in vitro. *J. exp. Med.* 41: 587, 1925.
- Schultze, W.H.: Zur Differentialdiagnose der menschenpathogenen Streptokokken. *Münch. med. Wschr.* 54: 1167, 1907.

## *Kapitel 11*

### **Optokinprøven**

Optokinprøven undersøger bakteriers følsomhed over for kininderivatet optokin.

#### **1. Historisk indledning**

Inspireret af kliniske iagttagelser af kinins gunstige effekt på forløbet af lobær pneumoni undersøgte Morgenroth & Levy i Tyskland i 1911 forskellige kininderivaters effekt på mus med pneumokokinfektion. De fandt, at injektioner af kininderivatet ætylhydrokupraein (= optokin) kunne beskytte og helbrede mange af musene. Senere forsøgte man at anvende stoffet til mennesker med pneumokokinfektioner (bl.a. Moore & Chesney 1917), men det blev hurtigt forladt på grund af alvorlige bivirkninger (døvhed og blindhed) og den tvivlsomme effekt, når det blev givet i ikke-toksiske doser.

På Rockefeller Institute i New York undersøgte Moore (1915) optokins effekt på forskellige bakterier *in vitro* og fandt, at pneumokokker var stærkt følsomme, selv i store fortyndinger (1:50.000), mens de øvrige streptokokker og andre bakterier først blev hæmmet ved langt højere koncentrationer. På grund af denne forskel i følsomhed foreslog han at bruge optokinfølsomhed som en diagnostisk test for pneumokokker.

Først da de engelske bakteriologer Bowers & Jeffries i 1955 indførte optokin-imprægnerede discs og foreslog at kvantitere resultatet ved at måle hæmningszonens størrelse på fast substrat, blev pneumokokdiagnosticering ved hjælp af optokinfølsomhed almindeligt anvendt. Ved sammenligning af denne metode og den traditionelle prøve for galdeopløselighed fandt Bowers & Jeffries næsten fuld overensstemmelse. De viste desuden, at man ved passager i stigende optokinkoncentrationer kan gøre en pneumokok optokinresistent; samtidig med erhvervelse af optokinresistens tabte pneumokokkerne deres virulens for mus, men bevarede evnen til at opløses i galde.

Bowen et al. fra Johns Hopkins Hospital i Baltimore (1957) vurderede metoden til rutinebrug og fandt, at alle undersøgte pneumokokker var optokinfølsomme, og at alle  $\alpha$ -hæmolytiske streptokokker var resistente eller gav en

hæmningszone, der var tydeligt mindre end pneumokokkernes. De fandt ingen korrelation mellem hæmningszonens størrelse og den serologiske type. Erna Lund, der arbejdede i Seruminstittets pneumokokafdeling, omtalte allerede i sin disputats (Mørch 1943) optokinprøven, og i 1959 undersøgte hun nærmere brugen af disc og tablet og fandt, dels at zonestørrelsen omkring pneumokokker og streptokokker aldrig overlapper, dels at visse kapselløse (rough) pneumokokker er galdeopløselige men optokinfølsomme, således at optokinprøven er mere sikker end galdeopløselighedsprøven. Hun undersøgte discs imprægneret med forskellige koncentrationer af optokin og fandt, at 0,05% var den mest egnede koncentration.

I 1971 viste Ragsdale & Sanford, at inkubering i en 5% CO<sub>2</sub>-atmosfære i stedet for atmosfærisk luft giver hæmningszonediametre, der for både pneumokokkers og andre streptokokkers vedkommende er 5 mm mindre.

## 2. Biokemisk baggrund

Optokins kemiske navn er ætylhydrokupleinhydroklorid. Dets nærmere virkningsmekanisme er ukendt, men det er muligt, at det virker ved at interferere med DNA syntesen (Blazevic & Ederer 1975).

Pnemokokker er særligt følsomme for og hæmmes af optokin i flydende substrat i koncentrationer på 0,08–5 µg/ml, mens andre streptokokker først hæmmes af koncentrationer på 20 µg/ml eller højere. På fast substrat hæmmes pneumokokker af koncentrationer på 0,6–2,5 µg/ml og de øvrige streptokokker først af 20 µg/ml eller højere. Andre bakterier som er undersøgt af Moore (1915), fx. *Enterobacteriaceae*, er endnu mere resistente over for optokin.

## 3. Valg af metode

Optokinfølsomheden kan undersøges i flydende eller på fast substrat, men til rutinebrug er en diffusionsmetode på fast substrat at foretrække (Lund 1959). Som depot kan anvendes optokin i tabletform eller discs. På Seruminstittet benyttes en agardiffusionsmetode med optokin i en 6 mm disc (Lund 1959). Optokinprøven har nu næsten helt erstattet den tidligere anvendte prøve for galdeopløselighed.

## 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Substrat:* 5% eller 10% blodagarplade.

*Reagens:* 6 mm papirdiscs, som indeholder 0,02 ml af en 0,05% optokinopløsning. Disc'ene fremstilles i antibiotika-afdelingen. De mættes med en

0,05% optokinopløsning og tørres derefter i varmeskab. Disc'ene kan tåle 120°C i autoklave i  $\frac{1}{2}$  time. De opbevares i køleskab, men holdbarheden er god også ved stuetemperatur, ifølge litteraturen op til 9 måneder (Bowers & Jeffries 1955).

*Udførelse:* Blodpladen tilsås med tætte strøg, optokindisc'en påsættes og pladen inkuberes i atmosfærisk luft ved 35°C i 1 døgn. Dyrkes pneumokokkerne i CO<sub>2</sub>-atmosfære, vil hæmningszonen omkring optokindisc'en blive mindre, ifølge litteraturen ca. 5 mm (Ragsdale & Sanford 1971). Man bør derfor normalt ikke inkubere pneumokokker i CO<sub>2</sub>-atmosfære, når der prøves for optokinfølsomhed. Kan pneumokokkerne ikke vokse uden CO<sub>2</sub>, bør man inkludere kontrolplader med en pneumokok og en streptokok.

*Aflæsning og fortolkning:* Diametren af den væksthøje zone omkring disc'en, måles. Pneumokokker har hæmningszoner på  $\geq 20$  mm, andre streptokokker  $\leq 15$  mm. Rough (akapsulate) og smooth (kapsulate) pneumokokker giver samme zonestørrelse. Ved udførelse på 5% i stedet for 10% blodagarplade vil der være nogle få falsk positive resultater (Jørgen Henrichsen, upublicerede observationer).

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

De sædvanlige ved omgang med potentielt patogene bakterier.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste optokinfølsomme bakterier

Pneumokokker er de eneste kendte bakterier, som med de valgte følsomhedsgrænser er optokinfølsomme.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven anvendes udelukkende til at differentiere mellem pneumokokker og andre streptokokker.

## 8. Referencer

- Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. John Wiley & Sons, New York, 1975, p. 87.
- Bowen, M.K., Thiele, L.C., Stearman, B.D. & Schaub, I.G.: The optochin sensitivity test: a reliable method for identification of pneumococci. J. Lab. clin. Med. 49: 641, 1957.
- Bowers, E.F. & Jeffries, L.R.: Optochin in the identification of *Str. pneumoniae*. J. clin. Path. 8: 58, 1955.

- Lund, E.: Diagnosis of pneumococci by the optochin and bile tests. *Acta path. microbiol. scand.* 47: 308, 1959.
- Moore, H.F.: The action of ethylhydrocuprein (optochin) on type strains of pneumococci in vitro and in vivo, and on some other microorganisms in vitro. *J. exp. Med.* 22: 269, 1915.
- Moore, H.F. & Chesney, A.M.: A study of ethylhydrocuprein (optochin) in the treatment of acute lobar pneumoniae. *Arch. intern. Med.* 19: 611, 1917.
- Morgenroth, J. & Levy, R.: Chemotherapie der Pneumokokkeninfektion. *Berl. klin. Wschr.* 48: 1560, 1911a.
- Morgenroth, J. & Levy, R.: Chemotherapie der Pneumokokkeninfektion. II. *Mitt. Berl. klin. Wschr.* 48: 1979, 1911b.
- Mørch, E.: Serological Studies on the Pneumococci. *Disputats, Munksgaard, Copenhagen* 1943, p. 17.
- Ragsdale, A.R. & Sanford, J.P.: Interfering effect of incubation in carbon dioxide on the identification of pneumococci by optochin discs. *Appl. Microbiol.* 22: 854, 1971.

## *Kapitel 12*

### **Tellurresistensprøven**

Prøver, der påviser bakteriers evne til at vokse i tilstedeværelse af små mængder tellurit, og deres evne til at reducere dette.

#### **1. Historisk indledning**

I begyndelsen af 1800-tallet blev det vist, at levende organismer omdannede selen- og tellurforbindelser til substanser med en karakteristisk lugt, og senere, at denne omdannelse bevirkede en "pigmentering" af de involverede celler (se Gosio 1905, p. 72-73).

Også bakteriologer begyndte at interessere sig for dette fænomen, og i 1900 offentliggjorde Klett efter tilskyndelse fra Scheurlen (1900) et arbejde om bakteriers reducerende virkning på natriumselenit og -tellurit. Ud fra forsøg med 27 forskellige bakterier, bl.a. difteribakterien, konkluderede han, at alle bakterier havde evne til at reducere de to forbindelser, dog i forskellig grad afhængig af væksten. Der dannedes metallisk selen og tellur, og dette medførte en farveændring af kulturene til henholdsvis rød og gråsort.

På baggrund af Klett's observationer og på grund af den tids problemer med at fremstille sterile sera, vacciner og andre injektionsvæsker foreslog Gosio fra Rom (1905), at bruge telluritreaktionen til at kontrollere, om injektionsvæsker var sterile. Han tilsatte en ringe mængde kaliumtellurit (0,001%) til forskellige væsker, og ved at udså fra dem, kunne han vise, at der var god korrelation mellem sortfarvning af væsken og tilstedeværelse af levende bakterier, hvorimod sporer ikke kunne opdages. Telluritreduktionen udeblev desuden, hvis der ikke var tilstrækkelig næring i injektionsvæsken til at bakterierne kunne vokse. Ved dyreforsøg påvistes, at en så lille mængde kaliumtellurit ikke havde nogen toksisk virkning og uden fare kunne injiceres i mennesker.

King & Davis (1914) fra Parke, Davis & Co. bekræftede Klett's og Gosio's resultater, og i 1915 udviklede Corper fra Chicago på grundlag af telluritreduktionen en metode til hurtigt at afgøre, om en kultur af tuberkelbakterier var levende, hvilket ved en almindelig dyrkning kunne tage flere uger. En

klump bakterier blev sat til en bouillon, der indeholdt 0,01% natriumtellurit, og inkuberet ved 37°C. Hvis bakterierne var levende, ville klumpen i løbet af 30 minutter til 2 timer antage en gråsort farve.

Den største betydning fik tellurprøven dog inden for difteridiagnostikken. Loeffler havde i 1884 opdaget difteribakterien og påvist, at den var patogen for marsvin. I årene herefter anvendtes Loeffler's medium (dvs. varmetivnet okseserum) til påvisning af difteribakterier fra patienter med difteri. Det mikroskopiske billede af difteribakterierne fra dette medium var tildels karakteristisk, men bortset herfra var mediet ikke særligt tilfredsstillende, da difterikolonierne ikke havde noget særpræget udseende og meget let blev overvokset af andre bakterier. I 1912 indførte Conradi & Troch (1912a, b) ved universitetet i Halle tellurmediet i difteridiagnostikken. På et Loeffler-medium tilsat 0,02% kaliumtellurit blev de fleste bakterier hæmmet i deres vækst, hvorimod difteribakterierne voksede godt med karakteristiske sorte kolonier på grund af reduktionen af tellurit. Enkelte stafylokokker, streptokokker og coryneforme stave (andre end difteribakterier) reducerede også tellurit i stærkere eller svagere grad, men kunne skelnes fra difteribakterierne ved koloniform og ved hjælp af Neisser's farvning med en blanding af metylenblåt og krystalviolet. Den mikroskopiske diagnose var imidlertid usikker, idet difteribakterierne på tellurmediet voksede med korte, plumpe stave, der lignede andre coryneforme stave. Conradi & Troch angav, at de med deres nye medium fik mange flere positive difteriprøver end med Loeffler's medium.

Dette blev indledningen til fremstilling og brug af en lang række forskellige tellurmedier, hvor man varierede basalmediet, den anvendte tellurforbindelse og telluritkoncentrationen (fra 0,011% til 0,16%; de fleste foretrak 0,04%) (Smith 1914; Douglas 1922; Allison & Ayling 1929; Clauberg 1929, 1931; Pesch & Krämer 1930; Anderson et al. 1931; Horgan & Marshall 1932; McGuigan & Frobisher 1936; Cooper et al. 1940; Hoyle 1941). Problemet var at sammensætte et medium, der var let at lave og hvorpå difteribakterierne voksede hurtigt og karakteristisk, samtidig med at de fleste andre bakterier blev hæmmet. Desuden skulle den mikroskopiske morfologi helst være typisk, således at en sekundær udsåning på Loeffler's medium ikke var nødvendig. Clauberg's medier fra 1929 og 1931 skulle muliggøre en makroskopisk diagnose, som kun i få tilfælde behøvede nærmere verifikation, men substratfremstillingen var kompliceret. Hoyle's medium fra 1941 skulle have den fordel, at væksten var så hurtig, at diagnosen altid kunne stilles efter 18 timers inkubation, og at cellemorfologien ikke var så atypisk som på andre tellurmedier.

Flere forfattere havde allerede omkring århundredskiftet bemærket, at difteribakterierne "spaltede ud" i forskellige typer. Dette blev i 1931 af An-

derson et al. korreleret til det kliniske forløb. Fra patienter med meget alvorlig difteri isolerede de en variantform, som de kaldte *B. diphtheriae gravis*; denne voksede på deres tellurmedium med store, flade gråsorte kolonier, der havde en uregelmæssig rand. Fra patienter med en mildere difteri isolerede de mindre kolonier, der var hvælvede, sorte, blanke og med jævn rand. Denne type kaldte de *B. diphtheriae mitis*. Endelig isolerede de en tredje type, der var meget lille og flad med mørkt centrum og tynd rand, som de kaldte *B. diphtheriae intermedius*. Oeding viste i sin disputats fra 1949, at de tre koloniformer af difteribakterier ikke var så stabile som oprindeligt antaget.

Da difterivaccinationerne påbegyndtes omkring 1950, faldt antallet af difteritilfælde i den vestlige verden hurtigt og stærkt. Derved blev tellurmediet dog ikke overflødigt. Fleming havde i 1932 undersøgt følsomheden hos forskellige bakterier over for kaliumtellurit og penicillin og vist, at penicillinfølsomme bakterier i langt de fleste tilfælde var tellurresistente og omvendt, at penicillinresistente bakterier var tellurfølsomme. En undtagelse var enterokokkerne, der var resistente overfor både penicillin og tellur. Fleming anbefalede at anvende tellurplader til isolering af fx. enterokokker og difteroider fra fæces og urin eller andet materiale med blandet flora. Bornstein efterprøvede i 1940 Fleming's resultater på enterokokker og andre streptokokker. Da han fandt, at visse "viridans" streptokokker var tellurresistente ligesom enterokokkerne, konkluderede han, at følsomhed for tellur ikke ville få stor betydning i klassifikationen af streptokokker.

Dette blev modbevist af Skadhauge i hans disputats om enterokokker fra 1950. Skadhauge viste, at Sherman's enterokokgruppe kunne deles i en telluritresistent gruppe omfattende *S. faecalis* og en tellurifølsom gruppe omfattende *S. faecium* og *S. durans*. Denne inddeling og dens praktiske betydning er senere blevet bekræftet af talrige andre forfattere (se fx. Whittenbury 1965).

Senere er tellurprøven forsøgt anvendt til at karakterisere andre bakterier, fx. stafylokokker (Brown & Evans 1963), mikrokokker (Clausen 1964) og *Moraxella* (Ryan 1964; Raeburn & Gilmour 1974), dog uden at få større betydning. Smith et al. har i 1977 foreslået at anvende en telluritreduktionsprøve ved diagnostikken af *Haemophilus vaginalis*. De foreslår at flyde en plade, hvorpå bakterierne allerede er vokset frem, med en vandig opløsning af 1% kaliumtellurit og derefter inkubere igen ved 37°C i 60 minutter. Kolonier, der har reduceret tellurit, vil herefter være gråsorte og de øvrige farveløse. Denne metode skulle være specielt egnet til i vaginalsekreter at finde kolonier af *Corynebacterium vaginale* (= *H. vaginalis*), der modsat størstedelen af den øvrige vaginalflora ikke farves sorte.

## 2. Biokemisk baggrund

Mekanismen bag tellurits væksthæmmende virkning er ikke fuldt afklaret. Elektronmikroskopiske studier af difteribakterier dyrket på kaliumtelluritplader foretaget af Morton & Anderson (1941) tydede på, at telluritsaltet blev reduceret til metallisk tellur, og dette er senere bekræftet af Tucker et al. (1962) ved røntgendiffraktionsanalyse. Hvor i cellen metallet findes er ikke sikkert afgjort. Terai et al. har i 1958 forsøgt af renfremstille det tellurit-reducerende enzym fra *Mycobacterium avium*. De fandt, at enzymet, som de kaldte telluritreduktase, er til stede i de cellefri ekstrakter af bakterierne, at det har pH optimum ved 6,5, og at det stimuleres af ferri- og ferrojoner. Thomas et al. har i 1963 vist, at cellefri ekstrakter af *S. faecalis* har høj tellurit-reducerende kapacitet. Payne & Morley (1976) undersøgte celler af *S. faecalis*, der havde overlevet varmebehandling ved 60°C i 4 minutter. Disse celler havde mistet deres resistens overfor tellur, og det blev vist, at genetablering af tellurresistensen krævede protein- og RNA-syntese, hvorimod samtidig cellevægssyntese var uden betydning.

## 3. Valg af metode

Siden 1912 har det været mest almindeligt at anvende et fast substrat tilsat 0,04% kaliumtellurit, men undersøgelsen kan også udføres i flydende eller halvflydende medium. I diagnose- og streptokokafdelingen anvendes samme slags plader til difteri- og streptokokdiagnostik.

## 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

### *McLeod's medium*

*Substrat:* 1 liter oksebouillonagar (s.61) smeltes og afkøles til ca. 75°C, tilsættes 100 ml defibrineret hesteblood og efter omslag til chokoladebrunt tilsættes 40 ml 1% kaliumtellurit og substratet ophældes med ca. 30 ml i 9 cm petriskåle.

*Udførelse:* Pladen tilsås på sædvanlig måde med prøvemateriale eller med en enkelt koloni fra en primærplade og inkuberes ved 35°C i 1-2 døgn.

*Aflæsning og fortolkning:* God vækst af sorte eller grå kolonier er udtryk for resistens overfor tellur samt reduktion af dette; ingen vækst er udtryk for følsomhed for tellur. Nogle bakterier vokser svagt med små grå kolonier som udtryk for en vis tellurfølsomhed.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste tellurresistente bakterier

*Streptobacillus moniliformis*

*Streptococcus*: *S. faecalis* (*S. faecium* og *S. avium* er svagt resistente)

*Erysipelothrix rhusiopathiae*

*Corynebacterium*: *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* og *C. equi*. Ingen oplysninger om de øvrige species.

*Mycobacterium*: Nogle species.

*Nocardia*: *N. polychromogenes* og *N. rubra*. Ingen oplysninger om de øvrige species.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Tellurprøven har især betydning i difteri- og streptokokdiagnostikken. De tre typer af difteribakterier kan kolonimorfologisk bedst skelnes fra hinanden på telluritmediet (se *Historisk indledning*), og difteribakterierne kan i mange tilfælde alene på grundlag af denne prøve adskilles fra andre coryneforme stave. *S. faecalis* vokser kraftigt på telluritmediet og kan derved skelnes fra alle andre streptokokker. Den svage vækst af *S. faecium* og *S. avium* har en vis vejledende værdi i streptokokdiagnostikken.

Her ud over har tellurprøven i dag ikke større betydning.

## 8. Referencer

- Allison, V.D. & Ayling, T.H.: An improved medium for the isolation of *Corynebacterium diphtheriae*: Trypsinised serum tellurite copper sulphate agar. *J. Path. Bact.* 32: 299, 1929.
- Anderson, J.S., Happold, F.C., McLeod, J.W. & Thomson, J.G.: On the existence of two forms for diphtheria bacillus – *B. diphtheriae gravis* and *B. diphtheriae mitis* – and a new medium for their differentiation and for the bacteriological diagnosis of diphtheria. *J. Path. Bact.* 34: 667, 1931.
- Bornstein, S.: Action of penicillin on enterococci and other streptococci. *J. Bact.* 39: 383, 1940.
- Brown, R.L. & Evans, J.B.: Comparative physiology of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 85: 1409, 1963.

- Clauberg, K.W.: Ueber einen Elektivnährboden für Diphtheriebazillen, der eine makroskopische Plattendiagnostik ermöglicht. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 114: 539, 1929.
- Clauberg, K.W.: Weitere Mitteilung zur makroskopischen Diphtheriebazillen-diagnostik. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 120: 324, 1931.
- Clausen, O.G.: The discovery, isolation, and classification of various  $\alpha$ -haemolytic micrococci which resemble aerococci. J. gen. Microbiol. 35: 1, 1964.
- Conradi, H. & Troch, P.: Ein Verfahren zum Nachweis der Diphtheriebazillen. Münch. med. Wschr. 59: 1652, 1912a.
- Conradi, H. & Troch, P.: Ein Verfahren zum Nachweis von Diphtheriebazillen. Centralbl. Bakt. I. Abt. Ref. 54: 63, 1912b.
- Cooper, K.E. Happold, F.C., Johnstone, K.I., McLeod, J.W., Woodcock, H.E. de C. & Zinnemann, K.S.: Laboratory diagnosis of diphtheria. Comparative values of various media. Lancet. 1: 865, 1940.
- Corper, H.J.: Sodium tellurite as a rapid test for the viability of tubercle bacilli. Studies on the biochemistry and chemotherapy of tuberculosis, XIII. J. infect. Dis. 16: 47, 1915.
- Douglas, S.R.: A new medium for the isolation of *B. diphtheriae*. Brit. J. exp. Path. 3: 263, 1922.
- Fleming, A.: On the specific antibacterial properties of penicillin and potassium tellurite incorporating a method of demonstrating some bacterial antagonisms. J. Path. Bact. 35: 831, 1932.
- Gosio, B.: Indicatoren des Bakterienlebens und ihre praktische Bedeutung. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 51: 65, 1905.
- Horgan, E.S. & Marshall, A.: A simple blood tellurite medium for the isolation of *C. diphtheriae*. J. Hyg. (Lond.) 32: 544, 1932.
- Hoyle, L.: A tellurite blood-agar medium for the rapid diagnosis of diphtheria. Lancet 1: 175, 1941.
- King, W.E. & Davis, L.: Potassium tellurite as an indicator of microbial life. Amer. J. publ. Hlth 4: 917, 1914.
- Klett, A.: Zur Kenntnis der reduzierenden Eigenschaften der Bakterien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 33: 137, 1900.
- McGuigan, M.K. & Frobisher, M. jr.: Media for the study of diphtheria. J. infect. Dis. 59: 22, 1936.
- Morton, H.E. & Anderson, T.F.: Electron microscopic studies of biological reactions. I. Reduction of potassium tellurite by *Corynebacterium diphtheriae*. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 46: 272, 1941.
- Oeding, P.: Difteriebasillens dissosiasjon. Thesis. A.W. Brøggers Boktrykkeri, Oslo 1949, p. 32.
- Payne, J. & Morley, J.S.: Recovery of tellurite resistance by heat injured *Streptococcus faecalis*. J. gen. Microbiol. 94: 421, 1976.
- Pesch, K. & Krämer, E.: Der KTC-Blutagar, ein neuer Anreicherungs-nährboden für Diphtheriebakterien. Centralbl. Bakt. I. Abt. Orig. 116: 518, 1930.
- Raeburn, D. & Gilmour, J.: A new *Moraxella* species isolated on tellurite medium. Med. Lab. Technol. 31: 283, 1974.
- Ryan, W.J.: *Moraxella* commonly present on the conjunctiva of guinea pigs. J. gen. Microbiol. 35: 361, 1964.
- Scheurlen, E.: Die Verwendung der selenigen und tellurigen Säure in der Bakteriologie. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 33: 135, 1900.

- Skadhauge, K.: Studies on Enterococci with Special Reference to the Serological Properties. Disputats, Munksgaard, Copenhagen 1950.
- Smith, J.F.: The isolation of *B. diphtheriae* by means of a simple medium containing potassium tellurite. J. Path. Bact. 19: 122, 1914.
- Smith, R.F., Voss, J.L. & Bailey, R.K.: Tellurite reduction test to aid in the recognition of *Corynebacterium vaginale*. J. clin. Microbiol. 5: 375, 1977.
- Teraim T., Kamahora, T. & Yamamura, Y.: Tellurite reductase from *Mycobacterium avium*. J. Bact. 75: 535, 1958.
- Thomas, J.W., Appleman, M.D. & Tucker, F.L.: Reduction of tellurite by whole cells, protoplasts, and cell-free extracts of streptococci. Bact. Proc. 1963, p. 124.
- Tucker, F.L., Walper, J.F., Appleman, M.D. & Donohue, J.: Complete reduction of tellurite to pure tellurium metal by microorganisms. J. Bact. 83: 1313, 1962.
- Whittenbury, R.: The differentiation of *Streptococcus faecalis* and *S. faecium* J. gen. Microbiol. 38: 279, 1965.

## Kapitel 13

### KCN-prøver

Med KCN-prøver påviser man bakteriers evne til at vokse eller ikke vokse i nærvær af en bestemt lav koncentration af enzymgiften kaliumcyanid (KCN).

#### 1. Historisk indledning

Blåsyre eller cyanbrinte (HCN) og dens salte cyanider har været kendt siden 1783, da de blev opdaget af den svenske kemiker Scheele. I begyndelsen af dette århundrede anvendtes stofferne hyppigt i forbindelse med fysiologiske undersøgelser af dyrisk væv, fordi man havde opdaget, at de særligt påvirkede cellernes respiration, og at cyanidfølsomhed kunne bruges som et generelt udtryk for den fysiologiske aktivitet. Man havde også opdaget, at cyanider hæmmede gærcellers evne til at danne alkohol af druesukker og hæmmede den fotosyntetiske proces hos alger. Et vigtigt skridt i retning af forståelse af cyanidernes virkemåde var Warburg's påvisning i 1919 af deres hæmmende virkning på enzymer, som indeholder jern- eller kobberatomer.

Cyaniders virkning på bakterier var undersøgt af Krönig & Paul (1897), som bestemte den desinficerende virkning overfor miltbrandsporer og fandt, at der næsten ingen virkning var, og af Meyerhof (1917), som havde vist, at de påvirkede stafylokokkers iltforbrug.

Det første virkelig betydningsfulde bidrag på dette område skyldes Burnet (senere bedst kendt som immunolog), som i 1927 fra Lister-instituttet i London publicerede en afhandling med titlen: "The action of cyanides on bacteria". Burnet viste, at ved vækstforsøg på plader, der var tilsat 0,5% kaliumcyanid, kunne de undersøgte bakterier deles i to klasser: de cyanid-følsomme, fx. *Shigella* og *Salmonella*, og de cyanid-resistente, fx. streptokokker. Han viste også, at cyanideffekten var knyttet til bakteriernes respirationsprocesser, og i sin diskussion af resultaterne omtalte han Keilin's nylige påvisning af cyanids virkning på cytokromer (Keilin 1925) og fandt det sandsynligt, at det ville vise sig, at hans cyanidfølsomme gruppe indeholdt cytokrom, og at den cyanid-resistente gruppe manglede disse enzymer.

Burnet's grundlæggende undersøgelser blev bekræftet af Braun & Guggenheimer (1932), som samtidig viste, at cyanidvirkningen var stærkt afhængig af dyrkningsbetingelserne. En nærmere undersøgelse af disse forhold foretog Braun senere (1938a, b, c, 1939), og i 1941 indførte Braun et al. en KCN-prøve til at skelne mellem *Escherichia* og *Klebsiella*. Prøven bestod i at dyrke bakterierne i en peptonagar tilsat 0,25 g KCN pr. liter substrat, dvs. i en fortynding på 1:4000. Cyanidopløsningen og inoculum blev tilsat til mediet umiddelbart før det fik lov til at stivne i et reagensglas. Det blev fremhævet, at inkuberingen ikke kunne fortsættes ud over 24 timer, fordi koncentrationen af KCN derefter ville være for lav, hvilket skyldes at cyanbrinte er så flygtig, at den let fordamper fra substratet. Ved den anvendte koncentration af KCN voksede *E. coli* overhovedet ikke, mens *Klebsiella pneumoniae* voksede på overfladen, altså aerobt, men noget hæmmet.

Braun et al.'s KCN-prøve blev anvendt af Silberstein et al. (1951), Schafnitzl (1951) og Buttiaux (1952), og alle bekræftede prøvens værdi til differentiering mellem *Escherichia* og *Klebsiella*; desuden viste Buttiaux, at den kunne benyttes til at skelne mellem *Citrobacter* (KCN-resistent) og *Salmonella* (KCN-følsom). Prøven blev også forsøgsvis anvendt af Martin Kristensen i diagnoseafdelingen i 1952, men han fandt den utilfredsstillende på grund af for store variationer i væksten; for øvrigt konstaterede han, at en reduktion af agarindholdet fra 2% til 0,2% gav langt bedre differentiering (se Møller 1954).

Braun's prøve havde den væsentlige ulempe, at der skulle fremstilles frisk substrat umiddelbart før hver undersøgelse, og det var en af grundene til, at Møller (1954) tog prøven op til kritisk revision. Møller fandt ud af, at hvis man brugte tætsluttende propper (fx. paraffinerede korkpropper) i stedet for vatpropper, brugte et flydende i stedet for et fast medium og samtidig nedsatte KCN-koncentrationen til 0.075 g pr. liter, svarende til en fortynding på 1:13300, så opnåede man samme differentiering som med Braun's medium og desuden at substratet var holdbart i 14 dage i køleskab ved 4°C. Møller fastlagde også regler for inokulering og aflæsning af glassene og bemærkede betydningen af at udvælge en egnet pepton. I et næsten samtidigt arbejde af Kauffmann & Møller (1955) blev prøvens egnethed til differentiering mellem *Citrobacter* og *Salmonella* bekræftet.

KCN-prøven i Møllers udformning blev hurtigt standardmetode ikke blot i diagnoseafdelingen, men i de fleste andre bakteriologiske laboratorier (se fx. Edwards & Fife 1956). Modifikationer er senere foreslået af Buttiaux et al. (1956), Rogers & Taylor (1961), Gershman (1961) og Munson (1974), især for at forlænge substratets holdbarhed, for at gøre prøven mindre følsom for variationer i inoculumstørrelsen og for at gøre aflæsningen lettere ved at tilsætte et tetrazoliumsalt, som reduceres til rød farve, hvis der kommer vækst i glasset. Disse varianter af prøven har ikke været anvendt i diagnoseafdelingen.

## 2. Biokemisk baggrund

Cyanbrinte er et meget aktivt molekyle, bl.a. danner det stabile komplekser med mange metaller, det reagerer med ketongrupper under dannelse af cyanohydriner, og det reducerer thiolgrupper. Derfor hæmmer det et stort antal forskellige enzymer, hvoraf mange – men ikke alle – er hæmproteiner eller andre metalholdige oxidaser. Særligt følsomt for kaliumcyanid er respirationsenzymet cytokromoxidase (se kapitel 14), som hæmmes ved koncentrationer på  $10^{-4}$  M eller lavere, mens de fleste andre enzymer for at hæmmes af kaliumcyanid skal udsættes for koncentrationer på  $10^{-4}$  –  $10^{-2}$  M. Som følge heraf opnår man ved anvendelse af lave kaliumcyanidkoncentrationer en tilsyneladende selektiv inaktivering af respirationen (Knowles 1976).

Når der findes bakterier, hvis respiration ikke hæmmes af kaliumcyanid, kan det have flere årsager: nogle bakterier kan besidde evne til at nedbryde eller afgifte cyanider, og andre kan konstitutivt have eller adaptivt danne cyanid-resistente respirationssystemer. Respirationsenzymernes cyanidresistens er vanskelig at undersøge, fordi forekomsten af bestemte enzymer i respirationskæden og de tilstedeværende enzymeres relative mængdeforhold er stærkt miljøafhængige, og desuden er forholdene vanskelige at analysere, fordi de fleste af disse enzymer er membranbundne. De hidtidige resultater viser dog, at de enkelte komponenter i en respirationskæde kan variere i deres cyanidfølsomhed, og at i forgrenede respirationskæder kan den ene gren være mindre cyanidfølsom end den anden (Knowles 1976). Disse forhold forklarer sandsynligvis generelt de forskellige bakteriers varierende følsomhed overfor KCN, men mekanismen i de enkelte tilfælde er ikke kendt.

## 3. Valg af metode

I Danmark bruges KCN-prøven kun i Møllers udformning. På grund af de vanskeligheder ved aflæsningen, som kan forekomme, hvis tilsåningen ikke er udført tilstrækkelig omhyggeligt, kunne der være grund til at prøve, om tetrazoliumtilsætning ville være i stand til at hjælpe på dette forhold.

## 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

### *Substrat*

Pepton (Orthana Special)	10 g
NaCl	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,225 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,64 g
Dest $\text{H}_2\text{O}$	ad 1000 ml
pH 7,4	

Til basalsubstratet sættes 0,075 g KCN/liter. Der aftappes 1,2 ml i smalle glas (155 x 10/11 mm) svarende til et ca. 2 cm højt lag, og glasset lukkes tæt med paraffineret korkprop. Samme substrat uden KCN anvendes som kontrol. Holdbarhed 2 uger i køleskab.

*Udførelse:* Prøve- og kontrolglas tilsås ensartet fra en døngammel kultur. Inoculumstørrelsen er kritisk, idet et for stort inoculum giver en synlig turbiditet i prøveglasset, som er forstyrrende ved aflæsningen, og et for lille inoculum kan medføre forsinket eller udeblivende vækst. Møller anbefaler at bruge en øskenfuld af en bouillonkultur, men da man af praktiske grunde ofte tilsår fra en pladekultur, skal man i dette tilfælde med lige platinnål tilså, således at synlig turbiditet undgås, men på den anden side gøre inoculum så stort som man kan, uden at det bliver synligt i glasset. Glassets paraffinprop skal lukkes omhyggeligt efter tilsåningen, dvs. øverste del af glasset skal ved flambæring varmes så meget, at paraffinen på glasset og proppen smelter sammen. Glassene inkuberes ved 35°C.

*Aflæsning og fortolkning* sker efter 2 og 4 døgns inkubering. Ved aflæsningen drejer det sig om at påvise turbiditet i glassene, og da turbiditeten i nogle tilfælde er svag, er det nødvendigt at skaffe sig de bedste aflæsningsbetingelser, dvs. glassene holdes mod en mørk baggrund belyst af en afskærmet elektrisk pære. Hvis der er synlig turbiditet = vækst af samme styrke i begge glas, er stammen KCN-resistent og prøven positiv (KCN-positiv). Manglende turbiditet i prøveglasset, men turbiditet i kontrolglasset betyder, at stammen er KCN-sensitiv og prøven negativ (KCN-negativ). Hvis der ikke er vækst i nogen af glassene, er prøven uaf læselig.

I de ikke sjældne tilfælde, hvor der er svag turbiditet i prøveglasset og kraftig turbiditet i kontrolglasset, skal prøven betragtes som uaf læselig og gøres om, og denne gang tilsås med en øsefuld af en bouillonkultur.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Blåsyre og kaliumcyanid er stærkt giftige. Den mængde KCN, der findes i et prøveglas, er dog kun ca. 0,09 mg, dvs. så ringe at der ingen risiko er forbundet med at arbejde med disse glas. Ved autoklavering af KCN-glassene efter brug vil der i autoklaven dannes cyanbrinte, men også her vil koncentrationen under almindelige forhold være så ringe, at ingen specielle forholdsregler er nødvendige. Hvis et meget stort antal glas skal autoklaveres samtidig

i en lille autoklave, kan man før autoklaveringen destruere KCN ved til hvert glas at sætte et krystal af  $\text{FeSO}_4$  og ca. 0,1 ml 40% KOH. Det er dog simplere i et sådant tilfælde at lade glassene gå til autoklavering i portioner på ca. 100 glas om dagen; så vil man altid være på den sikre side.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste KCN-resistente dvs. KCN-positive bakterier

Resultaterne fra Bergey's Manual, 8. udg., er suppleret med data fra Møllers disputats (1956), Steel & Midgley (1962) og Ewing (1973).

*Pseudomonas*: *P. aeruginosa*: alle; *P. pseudomallei*: alle; *P. mallei*: en del;

*P. maltophilia*: alle og *P. fluorescens*: en del.

*Alcaligenes faecalis*: de fleste.

*Bordetella bronchiseptica*: alle

*Citrobacter freundii*: næsten alle

*Salmonella* (inklusive *Arizona*): kun meget få stammer

*Klebsiella pneumoniae*: næsten alle

*Enterobacter*: *E. cloacae* og *E. aerogenes*: næsten alle

*Hafnia*: alle

*Serratia*: *S. marcescens* og *S. liquefaciens*: næsten alle; *S. rubidaea*: nogle stammer.

*Proteus* (inklusive *Providencia*): alle

*Vibrio cholerae*: de fleste

*Aeromonas*: de fleste

*Pasteurella*: enkelte stammer

*Haemophilus vaginalis*: alle

*Gemella*: alle

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Mens Møller (1954) vurderer KCN-prøven meget højt blandt de prøver, der anvendes til differentiering blandt taxa i familien *Enterobacteriaceae*, har det vist sig ved anvendelse af prøven i den daglige rutine i et diagnostisk laboratorium, at usikkerheden ved aflæsningen er så stor, at prøven taber i værdi. Den fungerer godt, når der ofres særlig opmærksomhed på inokulering og aflæsning, og er så en værdifuld prøve specielt ved differentiering mellem *Salmonella* og *Citrobacter freundii*. Inden for de fleste andre grupper er erfaringerne foreløbig begrænsede.

## 8. Referencer

- Braun, H.: Ueber das aerobe und anaerobe Wachstum der Bakterien unter der Einwirkung von Kaliumcyanid. 1. Mitteilung (Paratyphus-B-Bacillen). Schweiz. Z. allg. Path. u. Bakt. *1*: 201, 1938a.
- Braun, H.: Ueber das aerobe und anaerobe Wachstum der Bakterien unter der Einwirkung von Kaliumcyanid. 2. Mitteilung (Colibacillen, Bacillus lactis aerogenes, Typhus-, Dysenteriebazillen und Choleravibrionen). Schweiz. Z. allg. Path. u. Bakt. *1*: 257, 1938b.
- Braun, H.: Ueber das aerobe und anaerobe Wachstum der Bakterien unter der Einwirkung von Kaliumcyanid. 3. Mitteilung (Diphtheriebazillen, Milzbrandbazillen und Bacillus putrificus). Schweiz. Z. allg. Path. u. Bakt. *1*: 267, 1938c.
- Braun, H.: Ueber das aerobe und anaerobe Wachstum der Bakterien unter der Einwirkung von Kaliumcyanid. 4. Mitteilung (Staphylokokken, Strepto-, Entero- und Pneumokokken). Schweiz. Z. allg. Path. u. Bakt. *2*: 309, 1939.
- Braun, H. & Guggenheim, K.: Ueber Atmungstypen bei fakultativ aeroben pathogenen Bakterien. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. *127*: 97, 1932.
- Braun, H., Unat, E.K. & Delibeyoglu, Z.: Ein Beitrag zur Differentialdiagnostik von *B. coli* und *B. lactis aerogenes*. Istanbul Seririyati *23*: 143, 1941.
- Burnet, F.M.: The action of cyanides on bacteria. J. Path. Bact. *30*: 21, 1927.
- Buttiaux, R.: Distinction rapide entre *Salmonella* et bacilles paracoli du groupe *Ballerup-Bethesda*. Ann. Inst. Pasteur. *83*: 156, 1952.
- Edwards, P.R. & Fife, M.A.: Cyanide media in the differentiation of enteric bacteria. Appl. Microbiol. *4*: 46, 1956.
- Ewing, W.H.: Differentiation of *Enterobacteriaceae* by biochemical reactions. Revised. U.S. Dept. Health, Education, and Welfare, Public Health Service, DHEW Publ. No. (CDC) 74-8270, Atlanta, Georgia 1973.
- Gershman, M.: Use of a tetrazolium salt for an easily discernible KCN reaction. Canad. J. Microbiol. *7*: 286, 1961.
- Kauffmann, F. & Møller, V.: On amino acid decarboxylases of *Salmonella* types and on the KCN test. Acta path. microbiol. scand. *36*: 173, 1955.
- Keilin, D.: On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. Proc. roy. Soc. (B) *98*: 312, 1925.
- Knowles, C.J.: Microorganisms and cyanide. Bact. Rev. *40*: 652, 1976.
- Krönig, B. & Paul T.: Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfection, Z. Hyg. Infekt.-Kr. *25*: 64, 1897.
- Meyerhof, O.: Untersuchungen zur Atmung getöteter Zellen I. Mitt. Die Wirkung des Methylenblaus auf die Atmung lebender und getöteter Staphylococcen nebst Bemerkungen über den Einfluss des Milieus, der Blausäure und Narkotika. Pflügers Arch. ges. Physiol. *169*: 87, 1917.
- Munson, T.E.: Improved KCN medium. Appl. Microbiol. *27*: 262, 1974.
- Møller, V.: Diagnostic use of the Braun KCN test within the *Enterobacteriaceae*. Acta path. microbiol. scand. *34*: 115, 1954.
- Møller, V.: Bidrag til den biokemiske inddeling af *Enterobacteriaceae*. Disputats, København 1956.
- Rogers, K.B. & Taylor, J.: Laboratory diagnosis of gastro-enteritis due to *Escherichia coli*. Bull. Wld Hlth Org. *24*: 59, 1961.

- Schafnitzl, I.: Über den KCN-Test bei Klebsiellen. *Schweiz. Z. allg. Path. u. Bakt.* *14*: 730, 1951.
- Silberstein, W., Rabinowitz, K. & Bergner-Rabinowitz, S.: The presence of a *Aerogenes* as indicator of faecal pollution. *Acta med. orientalis* *10*: 57, 1951.
- Steel, K.J. & Midgley, J.: Decarboxylase and other reactions of some gram-negative rods. *J. gen. Microbiol.* *29*: 171, 1962.
- Warburg, O.: Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* *100*: 230, 1919.



# **Oxidations-reduktionsprøver**



## Kapitel 14

### Oxidaseprøver

Oxidaseprøver påviser tilstedeværelsen af enzymkomplekset cytokrom c i bakterier.

#### 1. Historisk oversigt

Oxidaseprøver i bakteriologien har deres udspring i nogle undersøgelser, som den unge Paul Ehrlich i 1885 offentliggjorde i sin første bog: "Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus". Hans plan var at undersøge, om organismens forskellige organer havde forskelligt iltbehov, og hans metode var på kaniner at indsprøjte farvestoffer, der i ikke-iltet tilstand er farveløse, men i iltet tilstand farvede, så han ved obduktion af dyrene kunne se, hvilke organer der var blevet farvede, dvs. havde indeholdt en særlig stor mængde ilt. Et af de stoffer, han brugte, var indofenol, som dannes in vitro og in vivo når man blander komponenterne dimetyl-p-fenylendiamin og  $\alpha$ -naftol. Den blå farve-reaktion, der opstår når indofenol iltes, kaldtes nadireaktionen efter de to første bogstaver i ordene *naftol* og *diamin*.

Röhmann & Spitzer (1895) mente, at nadireaktionen i dyrs og planters væv skyldtes et intracellulært oxidationsferment, indofenoloxidase. Her må det indskydes, at cytokromer allerede i 1866 var beskrevet af McMumm under betegnelsen histohematin, men at deres betydning som biologiske oxidations-enzymmer først blev erkendt i 1925 af Keilin, som genopdagede stofferne og indførte betegnelsen cytokrom. Omkring dette tidspunkt blev det derefter også vist, dels at Röhmann & Spitzer's oxidationsferment var cytokromoxidase, dels at nadireaktionen ikke direkte skyldtes dette enzym, men et andet enzym, cytokrom c, som efter selv at være blevet oxideret af cytokromoxidase var i stand til at ilte indofenol, så det blev blåt (cit. efter Peters 1971 og Lehninger 1975).

Inspireret af Ehrlich's undersøgelser viste Schultze (1910) og hans elev Kramer (1912), at kulturer af nogle bakterier gav en positiv nadireaktion, mens andre var negative. De blandede de to reagenskomponenter i flydende agar, som derefter blev hældt op som en plade, og såsnart den var stivnet,

afsatte de fra en kultur på en almindelig agarplade et strøg på overfladen af oxidaseagaren, hvorved den overførte kulturmasse antog en dybblå farve, hvis reaktionen var positiv. Agaren var altså kun et bæremedium for reagenserne, ligesom filtrerpapiret i dag er det ved Kovacs' oxidaseprøve. På grund af iltning fra luften blev pladerne spontant blå i løbet af få timer og var dermed hurtigt uanvendelige.

Gordon & McLeod (1928) og Loele (1929) forsøgte at gøre denne bakterielle oxidationsreaktion mere praktisk anvendelig. De kunne vise, at man alene ved at dryppe dimetyl-parafenylendiamin på udvoksede kulturer fik en tydelig farveændring af reagentet i kontakt med såkaldte oxidase-positive kolonier. En ulempe var det, at bakterierne i kulturen ret hurtigt blev dræbt ved kontakt med farvestoffet, men Gordon & McLeod anbefalede at hælde reagentet på pladerne og omgående at hælde det af igen, og viste, at man på den måde kunne have stor nytte af reaktionen, især ved påvisning af gonokokker. De viste også, at tetrametylforbindelsen var et mere følsomt reagens og mindre toksisk. Loele viste på et større stammemateriale, at denne ny form for oxidase-reaktion og den ældre nadireaktion stort set gav samme udfald.

Reaktionen var dog længe om at slå igennem som en almindelig anvendt prøve i bakteriologien. Henriksen viste i 1952, at den ved diagnosen af *Moraxella* var en værdifuld prøve, og sidst i 1950'erne blev den anbefalet som støtte ved diagnosen af pigmentløse stammer af *Pseudomonas aeruginosa*. Gaby & Hadley (1957) anbefalede til *P. aeruginosa* diagnostik nærmest en klassisk nadireaktion med tilsætning af reagenserne til en flydende renkultur, mens Kovacs i 1956 foreslog dels at bruge tetrametylparafenylendiaminhydroklorid, som gjorde reaktionen mere følsom end de tidligere anvendte diaminer, dels at dryppe reagentet på et stykke filtrerpapir og udføre reaktionen ved at stryge kulturmasse fra en koloni ud på det fugtede papir. Ved en positiv reaktion blev reagentet i forbindelse med bakteriemassen dybt blå i løbet af 5-10 sekunder.

I kort rækkefølge fulgte derefter tre større undersøgelser, som sammen med Kovacs' praktiske modifikation bidrog til at etablere oxidaseprøven som et værdifuldt hjælpemiddel ved diagnosen af gramnegative bakterier (Ewing & Johnson 1960; Steel 1961; Leclerc & Beerens 1962).

Elektrontransportkæden hos bakterier består af flavoproteiner, cytokromer og quinoner. Hvilke komponenter i kæden, der er ansvarlige for den bakteriologiske oxidase-reaktion, har længe været uvist, men i 1966 viste Stanier et al. ved spektrofotometri, at cytokrom c mangler i *Pseudomonas maltophilia* — en af de få pseudomonader der giver en negativ oxidaseprøve — og det anses nu for sandsynligt, at cytokrom c er det enzym, der påvises, selv om det ikke er definitivt bevist (Jurtshuk et al. 1975). Jurtshuk et al. har forsøgt en kvan-

titativ måling af enzymaktiviteten. Resultaterne er interessante, men det er vanskeligt at overskue, hvor pålidelige de er. De fandt oxidaseaktivitet i langt flere bakterier end man finder med Kovacs' prøve, og det er for så vidt hvad man efter cytokromernes udbredelse ville vente med en mere følsom prøve. Kovacs' prøve er altså relativ ufølsom, men det er det, som gør den nyttig, idet skellet mellem Kovacs-positive og Kovacs-negative i visse bakteriegrupper er korreleret med andre egenskaber.

## 2. Biokemisk baggrund

Som nævnt er cytokrom c en bestanddel af de fleste strikt aerobe og fakultive bakteriers elektrontransportkæde, hvis funktion er at sørge for dels, at brinten bliver til vand ved at forbinde sig med luftens ilt og dels at den energi der frigøres under næringsstoffernes oxidation i cellen bliver omsat til energirige bindinger i ATP (oxidativ fosforylering).

Passagen af brinten gennem transportkæden sker ved trinvis overflytning af elektroner og brintjoner,  $H^+$ , mellem kædens komponenter. Det må her erindres, at udtrykket oxideret bruges om et molekyle, som har afgivet en elektron, og udtrykket reduceret om et molekyle, som har modtaget en elektron. Hver komponent reduceres først af den forudgående komponent, og derefter oxideres den af den efterfølgende, idet denne samtidig reduceres. Hver komponent gennemløber derfor skiftevis en reduktion og en oxidation, og da komponenterne er placeret således at der rækken igennem er et stigende elektrodepotential, vil transporten foregå i en bestemt retning. Sidste led i kæden er enzymet – cytokromoxidase – som er i stand til at aktivere luftens ilt, der derefter kan forbinde sig med de frigjorte brintjoner under dannelse af vand.

Cytokrom c er næstsidste led i kæden, og når det efter at have overført sine elektroner til cytokromoxidase derved er blevet reoxideret, er det igen i stand til at modtage elektroner ikke blot fra det foranliggende enzym i kæden, som det normalt skal, men også til at modtage elektroner fra andre stoffer som fx. reagenset i oxidaseprøven, der ved at afgive elektroner iltes, så det bliver blå. Hvorvidt en kunstig elektrondonor som fx. tetrametylparafenylen-diamin kun kan overføre elektroner til et ganske bestemt acceptormolekyle i kæden, er noget uvist, men de foreliggende undersøgelser taler for, at dette er tilfældet (Jurtschuk et al. 1975), og kun hvis det holder stik er det berettiget altid at tolke reagensets omslag som udtryk for tilstedeværelse af cytokrom c. Da en positiv oxidasereaktion ikke alene forudsætter tilstedeværelse af cytokrom c, men også af cytokromoxidase eller en anden terminal oxidase, kan et negativt prøveudfald ikke altid tolkes som mangel på cytokrom c (se desuden under afsnittet *Fortolkning*).

Komponenterne varierer en del i de forskellige bakteriers elektrontransport-kæder, og de enkelte komponenters struktur og funktioner er langtfra kendt i alle detaljer. Om cytokromerne generelt ved man, at de alle indeholder hæg, og at det er jernatomet i hæg, som afgiver og modtager elektronerne. "Cytokrom c" er i virkeligheden ikke et enkelt enzym, men betegnelse for en gruppe beslægtede enzymer, og kendskabet til de individuelle enzymer er foreløbig begrænset. Man antager, at de foruden deres funktion ved respiration med ilt som terminal elektronacceptor også har andre – foreløbig ukendte – funktioner.

Cytokromernes art og mængde er stærkt påvirkelige af miljøfaktorer, specielt af iltningforholdene, men generelle regler for at nå optimale betingelser for en oxidaseprøve kan næppe opstilles, og det synes heller ikke at have praktisk betydning for prøvens udførelse.

Der kendes en række stoffer (cyanid, azid og CO), som hæmmer cytokromaktiviteten, men heller ikke dette har umiddelbar praktisk betydning.

Som reagens kan anvendes enten dimetyl- eller tetrametyl-p-fenylendiamin som klorid eller dimetyl-p-fenylendiamin som klorid eller oxalat sammen med  $\alpha$ -naftol. Tetrametyl-forbindelsen angives at være den mest følsomme, den mindst toksiske og den mest stabile. Reagenserne vil alle kunne iltes direkte af luftens ilt, men dette sker relativt langsomt.

### 3. Valg af metode

Kovacs' metode må foretrækkes, først og fremmest fordi den er så enkel og hurtig at udføre samtidig med at ingen af de andre modifikationer efter litteraturen at dømme har særlige fordele, som kunne berettige til at bruge dem.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *Kovacs' metode*

*Reagens:* Som reagens anvendes en vandig 1% opløsning af enten tetrametylparafenylendiamin dihydroklorid eller den tilsvarende dimetyl-forbindelse. Tetrametyl-forbindelsen angives at være det mest sensitive reagens, men andre hævder, at dimetyl-forbindelsen i sjældne tilfælde giver en positiv reaktion, hvor tetra-forbindelsen giver en negativ. I opløsning kan tetrametyl-forbindelsen holde sig i ca. 14 dage opbevaret i brun flaske og i køleskab, mens man af dimetyl-forbindelsen må fremstille en frisk opløsning hver dag.

*Udførelse:* Af reagentet dryppes nogle få dråber på et stykke filterpapir, så der fremkommer en fugtig plet. Kulturmasse tages enten fra en renkultur på agarmedium eller fra en enkeltkoloni på en primærplade. Kulturen må

ikke være over 24 timer gammel, og substratet må ikke indeholde et forgærbart kulhydrat, så kulturen er stærkt sur, da det gør reaktionen negativ. Tager man fra kolonier på en blodplade, må der ikke overføres substrat, da levende erythrocytter kan give en falsk positiv reaktion. Kulturmassen tages med en glas-, plast- eller platinnål, men ikke med jernholdigt materiale som kan give falsk positiv reaktion, og gnides energisk ud i randen af den fugtige reagensplet på filtrerpapiret. Man kan, hvis væksten i en renkultur er meget sparsom eller stærkt adhærent, blive tvunget til at dryppe reagentet direkte på pladen, men vurderingen af positiv og negativ reaktion er her vanskeligere. Der kan udføres så mange prøver, som der er plads til i randen af den fugtige plet, men når reagentet er tørret ind, må man tage et nyt stykke filtrerpapir.

*Aflæsning:* En positiv reaktion viser sig ved at den overførte kulturmasse bliver dybt blå inden for 10 sekunder. Tidsgrænsen må overholdes meget strengt, da mange bakterier bliver blå på et senere tidspunkt.

*Fortolkning:* Indledningsvis blev det angivet, at oxidaseprøver påviser tilstedeværelse af cytokrom c, men dette betyder ikke, at alle bakterier med cytokrom c er oxidase-positive. Ved manometriske målinger af iltningen af reagentet kan det vises, at aktiviteten i bakterier varierer stærkt, og en korrelering med udfaldet af Kovacs' oxidasereaktion ved aflæsning efter 10 sekunder viser, at grænsen mellem positivt og negativt udfald ikke falder sammen med tilstedeværelse eller mangel på cytokrom c, men svarer til en grænse mellem en gruppe med "moderat aktivitet" og en gruppe med "lav aktivitet" (Jurtshuk et al. 1975). Dette er i overensstemmelse med den praktiske erfaring, at det i nogle tilfælde er vanskeligt eller umuligt at afgøre, om farven ved Kovacs' prøve efter 10 sekunder er kraftig nok til, at man vil betragte prøven som positiv. Det vil være rimeligt at angive et sådant prøveudfald som en ± reaktion.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Selv om bakterierne efter nogen tids kontakt med reagentet dør, bør filtrerpapiret under prøvens udførelse være anbragt i låget af en petriskål og både skål og papir bagefter behandles som inficeret materiale.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

*Campylobacter:* i hvert fald 2 species

*Pseudomonas:* næsten alle species er kraftigt positive. Negative eller svagt positive er *P. vesiculare*, *P. maltophilia* og nogle plantepatogene species

*Agrobacterium:* alle species

*Alcaligenes*: alle species  
*Vibrio*: de fleste species  
*Aeromonas*: alle species  
*Plesiomonas*  
*Photobacterium*: 1 af 2 species  
*Lucibacterium*  
*Chromobacterium*  
*Flavobacterium*: nogle species  
*Haemophilus*: nogle stammer af nogle species  
*Pasteurella*: de fleste stammer af alle species  
*Actinobacillus*: de fleste stammer af begge species  
*Cardiobacterium*  
*Eikenella corrodens*  
*Neisseria*: alle species  
*Branhamella*: alle species  
*Moraxella*: alle species  
*Paracoccus*: alle species  
*Micrococcus*: nogle stammer af nogle species  
*Bacillus*: nogle stammer af nogle species

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Da grænsen mellem en positiv og en negativ Kovacs-prøve ikke er skarp, er de stærkt positive reaktioner de mest pålidelige og derfor de mest værdifulde.

Meget nyttig er prøven ved differentiering mellem de stærkt oxidase-positive *Neisseria*, *Branhamella* og *Moraxella* på den ene side og de oxidase-negative *Acinetobacter* på den anden, bl.a. fordi disse taxa har en ganske ensartet – i sig selv særpræget – morfologi.

Nyttig er prøven også til differentiering på et tidligt stadium mellem fakultative gramnegative stave; medlemmer af fam. *Enterobacteriaceae* er oxidase-negative, mens medlemmer af fam. *Vibrionaceae* er oxidase-positive. Her skal man dog huske, at *Enterobacteriaceae* indeholder små mængder af cytokrom c og kan give en positiv reaktion, hvis tidsgrænsen for aflæsning ikke overholdes meget nøje.

Da næsten alle species af *Pseudomonas* er oxidase-positive, bliver den negative reaktion hos *P. maltophilia* en hjælp ved diagnosen.

## 8. Referencer

- Ehrlich, P.: Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbeanalytische Studie. Verlag von August Hirschwald, Berlin 1885. (The Collected Papers of Paul Ehrlich, Vol. I. Pergamon Press, New York 1956).
- Ewing, W.H. & Johnson, J.G.: The differentiation of *Aeromonas* and C27 cultures from Enterobacteriaceae. *Int. Bull. bact. Nomencl. and Tax.* 10: 223, 1960.
- Gaby, W.L. & Hadley, C.: Practical Laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.* 74: 356, 1957.
- Gordon, J. & McLeod, J.W.: The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. *J. Path. Bact.* 31: 185, 1928.
- Henriksen, S.D.: Moraxella: Classification and taxonomy. *J. gen. Microbiol.* 6: 318, 1952.
- Jurtshuk, P. jr., Mueller, T.J. & Acord, W.C.: Bacterial terminal oxidases. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 3: 399, 1975.
- Keilin, D.: On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. *Proc. roy. Soc. B.* 98: 312, 1925.
- Kovacs, N.: Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 176: 703, 1956.
- Kramer, G.: Beiträge zum sofortigen Nachweis von Oxydations- und Reduktionswirkungen der Bakterien auf Grund der neuen Methode von W.H. Schultze. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 62: 399, 1910.
- Leclerc, H. & Beerens, H.: Une technique simple de mise en évidence de l'oxydase chez les bactéries. *Ann. Inst. Pasteur (Lille)* 13: 187, 1962.
- Lehninger, A.L.: *Biochemistry*. Worth Publishers Inc., New York 1975, 2 ed., p. 491.
- Loele, W.: Ueber die Verwendbarkeit von Oxydationsreaktionen mit Paraphenylendiamin in der Bakteriologie. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 111: 325, 1929.
- Peters, R.: Some lone pioneers of biochemistry in the nineteenth century. In: Needham, J. (ed.): *The Chemistry of Life. Eight Lectures on the History of Biochemistry*. Cambridge at the University Press, 1970, p. 201.
- Röhmman, F. & Spitzer, W.: Ueber Oxydationswirkungen thierischer Gewebe. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 28: 567, 1895.
- Schultze, W.H.: Ueber eine neue Methode zum Nachweis von Reduktions- und Oxydationswirkungen der Bakterien. *Cbl. Bakt. I. Orig.* 56: 544, 1910.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads. A taxonomic study. *J. gen. Microbiol.* 43: 159, 1966.
- Steel, K.J.: The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. gen. Microbiol.* 25: 297, 1961.

## *Kapitel 15*

### **Katalaseprøver**

Prøver der påviser tilstedeværelse af enzymet katalase i bakterier.

#### **1. Historisk indledning**

Kemisk set har brintoverilte ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) været kendt siden 1818, og lige så længe har man vidst, at noget i dyrs og planter væv fremskyndede dets spaltning til ilt og vand. Schönbein (1863) var den første, som satte dette noget i forbindelse med fermentvirksomhed. I 1893 viste Gottstein (1893) og Beijerinck (citeret fra Kluyver 1940), at evnen til at spalte brintoverilte fandtes hos mange bakterier, og Beijerinck fremhævede allerede dengang, at denne egenskab manglede hos mælkesyrebakterier. Loew (1901) kaldte fermentet katalase og fremsatte den teori, at katalasens biologiske funktion er at dekomponere det celletoksiske brintoverilte, der opstår ved cellernes stofskifte. Mange senere undersøgelser, fx. McLeod & Gordon (1922, 1923, 1925a, b), McLeod et al. (1923) og Avery og hans medarbejdere (Avery & Morgan 1924a, b; Avery & Neill 1924a, b, c, d), har beskæftiget sig med betydningen af  $\text{H}_2\text{O}_2$  ved bakteriers autoinhibition og uddøen i kultur og katalasens betydning for at hindre dette, og en tid har man ment, at obligat anaerobe bakteriers følsomhed for ilt skyldes deres mangel på katalase. Det kan dog ikke være hele forklaringen på obligat anaerobiose, hvorimod det kunne tænkes, at mangel på det senere opdagede enzym superoxyddismutase (Fridovich 1978), der omsætter det under visse oxidationer dannede frie iltradikal superoxyd ( $\text{O}_2^-$ ), har den afgørende rolle, da superoxyd er endnu mere toksisk end brintoverilte.

Et nyt syn på katalasens biologiske betydning fik man, da Chance i 1949 viste, at et kompleks af katalase og  $\text{H}_2\text{O}_2$ , der har en anden karakter end de sædvanlige enzym-substrat komplekser, er i stand til at oxidere bestemte substratmolekyler, og at kun hvor der intet oxiderbart substrat er til stede, eller hvor  $\text{H}_2\text{O}_2$  forekommer i overskud, vil  $2 \text{H}_2\text{O}_2$  dekomponeres til  $2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . idet det ene molekyle oxideres til ilt, mens det andet reduceres til vand (Chance 1949a, b, c). Efter denne opfattelse kan man altså skelne mellem katalasens funktion som peroxidase (substratoxidation) og som katalase ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -spaltning).

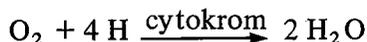
Blandt dem som tidligt har beskæftiget sig med katalasens forekomst hos bakterier må særlig nævnes den danske mejeribakteriolog Orla-Jensen. I 1906 bekræftede han Beijerinck's opdagelse, at enzymet mangler hos mælkesyrebakterier, og i sin berømte monografi om disse bakterier fra 1919 fremhæver han den negative katalaseprøve som et vigtigt kriterium for afgrænsning af gruppen. Forøvrigt har det senere vist sig, at der er undtagelser; dels er der nogle mælkesyrebakterier som kan danne katalase, hvis de dyrkes på substrater, som indeholder hæg, fx. blodplader, dels findes der en såkaldt "pseudokatalase" hos nogle stammer af *Leuconostoc* og *Pediococcus* (Whittenbury 1960). Dette har fået Deibel & Evans (1960) til at foreslå i stedet for katalaseprøven at bruge en modificeret benzidintest til påvisning af cytokromforekomst i bakterier, idet de viste, at denne test som forventet er negativ hos alle mælkesyrebakterier i bredeste forstand, altså også hos alle streptokokker.

I tidens løb har mange forskellige metoder været benyttet til påvisning af katalase (se fx. Molland 1947). De fleste har dog været baseret på iltudviklingen fra brintoverilte, og dette princip anvendes også hyppigt ved de i bakteriologien anvendte modifikationer (fx. Taylor & Achanzar 1972; Buckley 1975). Et afvigende princip er foreslået anvendt af Hanker & Rabin (1975). De udnytter katalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kompleksets evne til som peroxidase at oxidere en farveløs forbindelse, som i iltet tilstand bliver blå. Som farvestof anvendes en blanding af dopamin, p-fenylendiamindihydroklorid og sulfoxid, hvortil sættes en ringe mængde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; denne blanding dryppes på et indtørret strøg af bakterier på et objektglas, og en positiv reaktion viser sig ved at bakterierne straks antager en blåviolet farve. En af fordelene ved denne fremgangsmåde er, at man undgår aerosoldannelse — en risiko ved katalaseprøven, som allerede blev omtalt af Knorr i 1927.

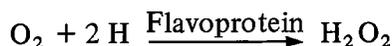
## 2. Biokemisk baggrund

Hos bakterier med et respiratorisk stofskifte vil størstedelen af den fra næringsstofferne afgivne brint via cytokromer reagere med luftens ilt og blive til vand. I de tilfælde, hvor iltningen alene sker via flavoproteiner, dannes i stedet for vand brintoverilte.

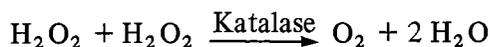
Forskellen mellem de to respirationsmåder ligger i, at cytokrom overfører 2 par brintatomer, altså 4 [H]



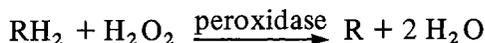
mens flavoprotein kun overfører eet par, altså 2 [H]



Da de fleste bakterier indeholder enten enzymet katalase eller enzymet peroxidase (eller begge), vil det dannede brintoverilte sekundært blive reduceret til vand. Katalase spalter  $\text{H}_2\text{O}_2$  efter ligningen:



Peroxidase kan kun reducere brintoveriltten, hvis der samtidig findes et organisk substrat, der kan fungere som brintdonor. Skematisk kan reaktionen vises på følgende måde:



På denne måde vil brintoveriltens ophobning og toksiske virkning undgås.

Som det fremgår af næstsidste ligning, medfører katalasens spaltning af brintoverilte, at der frigøres ilt. Dette benytter man sig af for at påvise, om bakterier indeholder katalase, idet man bringer den ukendte bakterie i kontakt med brintoverilte og iagttager, om der udvikles luft (ilt).

Katalase og peroxidase er begge oxidoreduktaser af typen hæmproteiner; katalase har en molekylvægt på ca. 250.000 og 4 hæmgrupper, peroxidase har en molekylvægt på ca. 44.000 og 1 hæmgruppe. Katalase er meget hyppigt forekommende både i dyr, planter og mikroorganismer; peroxidase findes fortrinsvis i planter og mikroorganismer, bl.a. i mælkesyrebakterier, men også i leukocytter og mælk. Katalasedannelsen i bakterier synes kun lidt afhængig af dyrkningsbetingelser; glukose i mediet hæmmer ikke produktionen, og pH tolerancen er stor. Når katalasereaktionen i sure og/eller gamle kulturer er svagere, skyldes det, at en del af cellerne er døde. Ilt synes at være nødvendig for syntesen af hæmgrupperne og bliver dermed i visse tilfælde en forudsætning for katalasedannelsen (Heady et al. 1964).

Det er vist af Finn & Condon (1975), at tilsætning af små mængder af  $\text{H}_2\text{O}_2$  til en *Salmonella* kultur stimulerer katalasedannelsen, men det er tvivlsomt, om der er tale om en induktion i sædvanlig forstand. Samme forfattere har bekræftet ældre undersøgelser, som viste, at katalaseaktivitet i forhold til celletætheden i en kultur falder i logaritmisk fase og først begynder at stige ved overgangen til stationær fase, hvorefter stigningen fortsætter. En tilfredsstillende forklaring på dette forhold kendes ikke.

### 3. Valg af metode

Af sikkerhedsgrunde kunne man være fristet til at anbefale den af Hanker & Rabin (1975) anbefalede metode, men dens overensstemmelse med den klassiske katalaseprøve er ikke tilstrækkelig belyst i øjeblikket.

Hvilken modifikation af den klassiske prøve baseret på iltudvikling, man vælger, er næppe afgørende. En semikvantitering af prøveudfaldet som foreslået af Taylor & Achanzer (1972), vil man vel i alle tilfælde være tilbøjelig til at foretage, men værdien heraf er efter vor opfattelse usikker. Det er den mest pålidelige konstatering af et negativt udfald, som ved denne prøve har størst diagnostisk værdi. Valg af  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrationen ser i denne sammenhæng ud til at være af betydning, og selv om vi ikke kan basere vor anbefaling på systematiske undersøgelser, mener vi man til rutineprøven bør anvende en 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  opløsning.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Som standardmetode har man i diagnoseafdelingen i mange år anvendt at overføre kulturmasse fra en renkultur til en dråbe  $\text{H}_2\text{O}_2$  på et objektglas, men som supplement anvendes ofte direkte pådrypning af  $\text{H}_2\text{O}_2$  på en pladekultur.

*Substratet* er en 30% brintoverilteopløsning, som opbevares i brune flasker i køleskab. En så stærk opløsning har en ganske ringe tendens til spontan iltafgivelse, en tendens som forstærkes af katalysatorer som platin og alle slags partikulære urenheder og ved mekaniske påvirkninger i form af omrøring og rystning. Resultatet er, at  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrationen langsomt falder, men da den præcise koncentration ikke er afgørende, kan samme opløsning anvendes i flere år.

*Udførelse:* Fra en døgngammel renkultur eller fra en døgngammel koloni på en agarplade tages med en flammet, afkølet glasstav en rigelig mængde kultur. Kulturer på blodagar og ascitesagar er uegnede, da tilstedeværende røde blodlegemer og/eller leukocytter indeholder katalase. I chokoladeagar er katalasen inaktiveret på grund af opvarmningen, og kultur fra dette substrat kan godt anvendes. I forvejen har man på et fuldstændig rent objektglas i bunden af en petriskål afsat en stor dråbe  $\text{H}_2\text{O}_2$  opløsning, og kulturmasse afsættes nu i dråben med et minimum af gniden og omrøring. Det sker bedst ved at spidsen af glasstaven føres næsten vandret midt ind i dråben, så spidsen hviler på glasset, og med en hurtig rotationsbevægelse af glasstaven mellem fingrene forsøger man derefter at få kulturmassen til at slippe staven, så den

bliver hængende på objektglasset nede i dråben. Ofte vil den blotte berøring af dråben med kulturmassen straks føre til en kraftig luftudvikling, og i disse tilfælde er der ingen grund til at søge kulturmassen afsat på objektglasset; glasstaven kan straks løftes op af dråben og kasseres, da prøven med sikkerhed er positiv. Hvis der ikke kommer umiddelbar luftudvikling, lægges petriskålens låg straks på, og med lup observerer man i nogle minutter dråben for at se, om der kommer luftbobler fra bakteriemassen.

*Aflæsning:* Enhver luftudvikling – fra voldsom skumdannelse til fremkomsten af ganske enkelte luftblærer – betragtes som en positiv reaktion. Hvis der kun er enkelte luftblærer, eller hvis der ingen luftblærer er i et tilfælde hvor man forventer det, gentages prøven. Får man samme resultat begge gange, accepteres det som prøvens udfald; er der uoverensstemmelse, gentages prøven flere gange, og desuden dryppes  $H_2O_2$  direkte på pladen, evt. på et udskåret stykke af agaren overflyttet til et objektglas, hvis man skal bruge pladen til andre formål, idet  $H_2O_2$  hurtigt dræber bakterierne.

*Fortolkning:* Konventionelt accepterer vi, at en katalaseprøve er negativ, hvis man overhovedet ikke ser nogen luftudvikling, og positiv uanset hvor ringe luftudviklingen er, forudsat at prøven udføres som ovenfor beskrevet. Fra et videnskabeligt synspunkt kan man herimod indvende, at der er erfaringer som viser, at katalasedannelsen kan afhænge af dyrkningsbetingelserne, fx. kan anaerob dyrkning af stafylokokker i nogle tilfælde føre til en negativ reaktion, og en positiv reaktion af visse mælkesyrebakterier og visse *Haemophilus* arter kan være afhængig af, at dyrkningsmediet indeholder præformeret hæg (Whittenbury 1964; Biberstein & Gills 1961). Hvor disse forhold er kendt må man naturligvis lade dem indgå i fortolkningen af prøven.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

En 30% opløsning af  $H_2O_2$  er så stærk, at den ætser huden; får man noget af opløsningen på hænderne, skal stedet straks afvaskes med rigeligt vand.

Den eksplosive iltudvikling, som kan blive resultatet af en stærk positiv katalasetest, medfører at bakterier fra prøven i betydeligt antal slynges ud i luften. Risikoen for at den person, som udfører prøven, får bakterier på slimhinder, hud og tøj er derfor stor, især da man vil være tilbøjelig til at sidde med hovedet bøjet over arbejdet, og da der ofte er tale om patogene bakterier, rummer dette en infektionsrisiko. Man skal derfor udføre reaktionen i bunden af en petriskål, og idet man fører glasstaven med bakteriemassen ned i reagensdråben, skal man holde låget så tæt ned over skålen som muligt, og når glasstaven tages væk, skal låget lægges helt på. Udfører man prøven ved at dryppe  $H_2O_2$  direkte på pladen, skal låget på samme måde under pådrypningen

holdes som et skjold mellem pladen og undersøgeren og derefter straks lægges helt på. Glasstav, objektglas og petriskål behandles som inficeret materiale.

## 6. De vigtigste katalase-negative bakterier

Da der er en stor overvægt af katalase-positive bakterier blandt dem, der forekommer i et klinisk-mikrobiologisk laboratorium, er det mere hensigtsmæssigt at give en fortegnelse over de negative end de positive arter. Som hovedregel er aerobe og fakultative arter positive og anaerobe arter negative, så det er afvigelserne fra hovedreglen, som har diagnostisk interesse. Fortegnelsen følger som sædvanlig angivelserne i Bergey's Manual, 8. udg., men de er nok ikke i alle tilfælde den endelige sandhed.

*Campylobacter*: 1 species (*C. sputorum*)

*Bordetella*: i *B. pertussis* 20–25% af stammerne

*Francisella*: begge species

*Shigella*: serotype 1 af *S. dysenteriae*, dvs. de ægte toksindannende Shiga's bakterier, samt nogle stammer af *S. flexneri* (ca. 5%)

*Haemophilus*: blandt arter med manglende evne til at syntetisere hæg (= X faktor) vil alle stammer være negative, med mindre de dyrkes på hægholdigt medium; er det tilfældet, vil nogle være negative, men de fleste svagt positive.

*Cardiobacterium*

*Streptobacillus*

*Eikenella corrodens*

*Fusobacterium*

*Leptotrichia*

*Moraxella kingae*

*Veillonella*: i nogle species en atypisk katalase

*Acidaminococcus*

*Megasphaera*

*Streptococcus* med meget få undtagelser, fx. er ca. halvdelen af *S. faecalis* stammer positiv på chokoladeagarplader.

*Leuconostoc* med få undtagelser

*Pediococcus* med få undtagelser

*Aerococcus* med få undtagelser

*Gemella*

*Peptococcus* med nogle undtagelser

*Peptostreptococcus*

*Sarcina*

*Bacillus*: som hovedregel positiv, men 3 insektpatogene species (*B. larvae*, *B. popilliae* og *B. lentimorbus*) er negative.

*Lactobacillus* med meget få undtagelser

*Erysipelothrix*

*Propionibacterium*: som hovedregel positiv, men enkelte species og stammer er negative.

*Eubacterium* med få undtagelser

*Actinomyces*, dog er *A. viscosus* positiv

*Arachnia*

*Bifidobacterium*

*Mycobacterium*

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøvens værdi er begrænset, dels fordi dens reproducerbarhed i for mange tilfælde synes afhængig af små variationer i substrat og dyrkningsbetingelser, dels fordi hovedskellet mellem positive og negative følger skellet mellem aerobe (strikt og fakultative) og anaerobe.

Ved diagnosen af grampositive kokker har prøven værdi ved at skelne de negative streptokokker, pneumokokker og aerokokker fra de positive mikrokokker og stafylokokker.

Blandt grampositive stave, som kan vokse under aerobe forhold, er *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* og *Erysipelothrix* katalase-negative.

Blandt gramnegative stave, som kan vokse aerobt, er følgende katalase-negative: *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Moraxella kingae*, *Actinobacillus equuli*, "*Haemophilus*" *vaginalis*, *Haemophilus aphrophilus*, *Streptobacillus moniliformis* og *Leptotrichia buccalis*.

## 8. Referencer

- Avery, O.T. & Morgan, H.J.: The occurrence of peroxide in cultures of pneumococcus. J. exp. Med. 39: 275, 1924a.
- Avery, O.T. & Morgan, H.J.: Studies on bacterial nutrition. V. The effect of plant tissue upon the growth of anaerobic bacilli. J. exp. Med. 39: 289, 1924b.
- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. I. Production of peroxide by anaerobic cultures of pneumococcus on exposure to air under conditions not permitting active growth. J. exp. Med. 39: 347, 1924a.
- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. II. The production of peroxide by sterile extracts of pneumococcus. J. exp. Med. 39: 357, 1924b.

- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. III. Reduction of methylene blue by sterile extracts of pneumococcus. *J. exp. Med.* 39: 543, 1924c.
- Avery, O.T. & Neill, J.M.: Studies on oxidation and reduction by pneumococcus. IV. Oxidation of hemotoxin in sterile extracts of pneumococcus. *J. exp. Med.* 39: 745, 1924d.
- Biberstein, E.L. & Gills, M.: Catalase activity of *Haemophilus* species grown with graded amounts of hemin. *J. Bact.* 81: 380, 1961.
- Buckley, J.M.: A capillary tube test for bacterial catalase. *Med. Lab. Technol.* 32: 125, 1975.
- Chance, B.: The composition of catalase-peroxide complexes. *J. biol. Chem.* 179: 1311, 1949a.
- Chance, B.: The primary and secondary compounds of catalase and methyl or ethyl hydrogen peroxide. II. Kinetics and activity. *J. biol. Chem.* 179: 1341, 1949b.
- Chance, B.: The enzyme-substrate compounds of horseradish peroxidase and peroxides. II. Kinetics of formation and decomposition of the primary and secondary complexes. *Arch. Biochem.* 22: 224, 1949c.
- Deibel, R.H. & Evans, J.B.: Modified benzidine test for the detection of cytochrome-containing respiratory systems in microorganisms. *J. Bact.* 79: 356, 1960.
- Finn, G.J. & Condon, S.: Regulation of catalase synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bact.* 123: 570, 1975.
- Fridovich, I.: The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 201: 875, 1978.
- Gottstein, A.: Ueber die Zerlegung des Wasserstoffsperoxyds durch die Zellen, mit Bemerkungen über eine makroskopische Reaction für Bakterien. *Virchows Arch. path. Anat.* 133: 295, 1893.
- Hanker, J.S. & Rabin, A.N.: Color reaction streak test for catalase-positive microorganisms. *J. clin. Microbiol.* 2: 463, 1975.
- Heady, R.E., Jacobs, N.J. & Deibel, R.H.: Effect of h emin supplementation on porphyrin accumulation and catalase synthesis during anaerobic growth of *Staphylococcus*. *Nature* 203: 1285, 1964.
- Kluyver, A.J.: Beijerinck the microbiologist. In: Iterson, jr., G. van, den Dooren de Jong, L.E. & Kluyver, A.J. (eds): *Martinus Willem Beijerinck, his Life and his Work*. Haag 1940, p. 122.
- Knorr, M.: Zur differentialdiagnostischen Bedeutung und Technik der Katalasereaktion. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 103: 147, 1927.
- Loew, O.: Catalase, a new enzym of general occurrence, with special reference to the tobacco plant. U.S. Department of Agriculture, Report No. 68, 1901.
- McLeod, J.W. & Gordon, J.: Production of hydrogen peroxide by bacteria. *Biochem. J.* 16: 499, 1922.
- McLeod, J.W. & Gordon, J.: Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria: with a scheme of classification based on these properties. *J. Path. Bact.* 26: 326, 1923.
- McLeod, J.W., Gordon, J. & Pyrah, L.N.: Further observations on peroxide formation by bacteria. *J. Path. Bact.* 26: 127, 1923.
- McLeod, J.W. & Gordon, J.: Further indirect evidence that anaerobes tend to produce peroxide in the presence of oxygen. *J. Path. Bact.* 28: 147, 1925a.

- McLeod, J.W. & Gordon, J.: The relations between the reducing powers of bacteria and their capacity for forming peroxide. *J. Path. Bact.* 28: 155, 1925b.
- Molland, J.: Bacterial Catalase. A contribution to the discussion of the anaerobic respiration. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 66: 1-165, 1947.
- Orla-Jensen, S.: Om Oprindelsen til Komælkens Oxydaser og Reduktaser. Oversigt over det Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Forhandlinger, No. 5, 1906, p. 295.
- Orla-Jensen, S.: The Lactic Acid Bacteria, Andr. Fred. Høst & Søn, København, 1919.
- Schönbein, C.F.: Ueber die katalytische Wirksamkeit organischer Materien und deren Verbreitung in der Pflanzen- und Thierwelt. *J. prakt. Chemie* 89: 323, 1863.
- Taylor, W.I. & Achanzar, D.: Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 24: 58, 1972.
- Whittenbury, R.: Two types of catalase-like activity in lactic acid bacteria. *Nature* 187: 433, 1960.
- Whittenbury, R.: Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. gen. Microbiol.* 35: 13, 1964.

## Kapitel 16

### Nitratreduktionsprøver

Prøver der kan afgøre, om bakterier indeholder enzymerne nitratreduktase og nitritreduktase.

#### 1. Historisk indledning

Kvælstofomsætningen i naturen har mange aspekter, og litteraturen om emnet er enorm. Erkendelsen af, at evnen til at reducere nitrat til forbindelser hvori kvælstof indgår med et lavere iltningsstrin (nitrit, kvælstofforilte, kvælstof og ammoniak) kunne bruges som en karakteriserende egenskab hos bakterier, udvikledes sideløbende med undersøgelser, der primært var rettet imod at opklare problemer af landøkonomisk natur, fx. salpetersaltets egnethed som gødning og denitrifikationens og kvælstoffikseringens henholdsvis skadelige og gavnlige virkning på landbrugsjorden.

At ikke alene planter, men også mikroorganismer besidder evne til at reducere nitrat, finder man anført som hypotese hos Schönbein (1868), Schloesing (1868) og Meusel (1875), men bevis for, at det er tilfældet, findes først hos Gayon & Dupetit (1882a, b, 1886), som med renkulturer af forskellige bakterier viste, at tilsat nitrat under bestemte betingelser omdannedes til nitrit, luftformige kvælstofforbindelser eller ammoniak. Sammen med tilsvarende undersøgelser af Burri & Stutzer (1895) udgør Gayon & Dupetit's forsøg grundlaget for alt senere arbejde med bakteriers udnyttelse af nitrat dels som kvælstofkilde (assimilatorisk nitratreduktion) dels som elektronacceptor ved en energigivende anaerob respiration (dissimilatorisk nitratreduktion).

De ældre metoder til kemisk nitritpåvisning var ikke specifikke (Laurent 1890), men i 1879 havde den tyske kemiker Griess vist, at en blanding af svovlsure opløsninger af naftylamin og sulfanilsyre var et både specifikt og meget følsomt reagens, og den ungarske kemiker Ilosvay angav i 1889, at følsomheden og især reaktionshastigheden forøgedes, hvis man anvendte eddikesyre som opløsningsmiddel i stedet for svovlsyre. Nitritpåvisning med dette modificerede reagens – hurtigt betegnet som Griess-Ilosvay's prøve – har siden været standardmetode i bakteriologien.

De første undersøgelser med bakteriologisk-diagnostisk formål for øje med denne prøve blev udført af Lunkewicz (1894), Dieudonné (1895) og Maassen (1901). En del af resultaterne ser med nutidige øjne overraskende ud, men fra omkring århundredeskiftet var prøven etableret som rutinemetode ved bakteriologiske differentialdiagnoser.

Værdien af prøven var dog på grund af vanskeligheder med reproducerbarhed og fortolkning ikke stor. Bidrag til en forbedring af disse forhold gav Conn & Breed (1919), Bronfenbrenner & Schlesinger (1920), Wallace & Neave (1927), ZoBell (1932) og Conn (1936). Blandt andet blev det fastslået, at god og hurtig vækst var en væsentlig forudsætning for at få reproducerbare resultater, og ZoBell fremhævede værdien af tilsætning af zinkpulver som en kontrol der kunne vise, om der stadig var nitrat i mediet efter reagensets tilsætning, hvorved tolkningen uddybedes. At tilsætning af zinkpulver kan reducere nitrat til nitrit, var vist af Schönbein allerede i 1861. Steel & Fisher gjorde i 1961 opmærksom på, at denne kontrol kan blive illusorisk, hvis der tilsættes så store mængder zink, at reduktionen går ud over nitritstadiet. Bronfenbrenner & Schlesinger (1920) foreslog at bruge to glas – et med nitrat og et med nitrit – da det ville give bedre mulighed for at fortolke resultatet end ét nitratglas alene. Dette var før ZoBell (1932) anbefalede tilsætning af zinkpulver, men forslaget er stadig relevant, fordi der findes bakterier, som mangler nitratreduktase, men alligevel har nitritreduktase.

Et skridt i retning af en forøgelse af nitratreduktionsprøvens differentierende værdi findes måske i Pichinoty's påvisning i 1964 af to forskellige nitratreduktaser, kaldet A og B, der i bestemte bakterier kan forekomme hver for sig eller begge sammen. Senere undersøgelser (Pichinoty 1973) antyder, at fordelingen af de to reduktaser på de forskellige bakteriegrupper har en vis taxonomisk værdi, men foreløbig har disse iagttagelser ikke ført til større praktiske resultater.

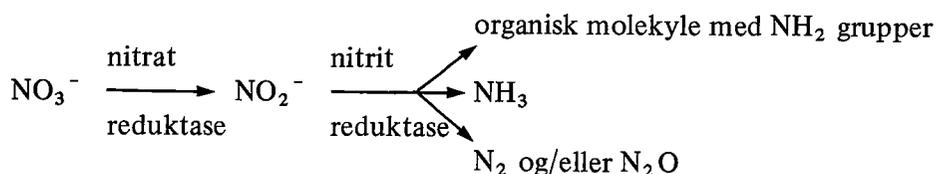
Følgende den almindelige tendens siden 1950'erne har man også indført mikrometoder og hurtigmetoder baseret på den klassiske nitratreduktionsprøve. Resultater kan opnås i løbet af 1-2 timer, og overensstemmelsen med standardmetoden er tilsyneladende god (se fx. Porres & Porter 1974 og Páčová & Kocur 1975).

## 2. Biokemisk baggrund

Til forståelse af nitrats reduktion anføres her en figur, som viser kvælstoffets forskellige iltningstrin (oxidationstrin):

- + 5 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>      nitratjon, HNO<sub>3</sub> salpetersyre
- + 4 NO<sub>2</sub>        kvælstofoverilte, luftart
- + 3 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>      nitritjon, HNO<sub>2</sub> salpetersyrning
- + 2 NO          kvælstofilte, luftart
- + 1 N<sub>2</sub>O        kvælstofforilte, luftart
- 0 N<sub>2</sub>            frit kvælstof, luftart
- 1 NH<sub>2</sub>OH    hydroxylamin, svag base
- 2 N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>      hydrazin, svag base
- 3 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>      ammoniumjon, NH<sub>3</sub> ammoniak

Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) udnyttes af bakterier på to forskellige måder: dels optager nogle bakterier fra nitratmolekylet det kvælstof, de skal bruge i biosyntesen dels kan nogle bakterier bruge molekylets ilt ved en anaerob, mere eller mindre energigivende respiration. I begge tilfælde vil der ske en reduktion af nitratmolekylet; ved den første proces taler man om en assimilatorisk, ved den anden om en dissimilatorisk reduktion. Udover at de to processer adskiller sig med hensyn til deres funktion i bakteriestofskiftet, er der også forskelle mellem de enzymer, der indgår i reaktionskæderne, men i øvrigt viser selve reaktionsforløbet – så vidt det er oplyst – mange lighedspunkter. Det gælder i hvert fald første og andet trin i reduktionen, der skematisk kan vises på følgende måde:



Ved en assimilatorisk reduktion vil slutproduktet være forskellige kvælstofholdige organiske molekyler i cellen og kun sjældent, og i så fald i ringe mængde, vil der findes ekstracellulære, delvis reducerede uorganiske kvælstofforbindelser.

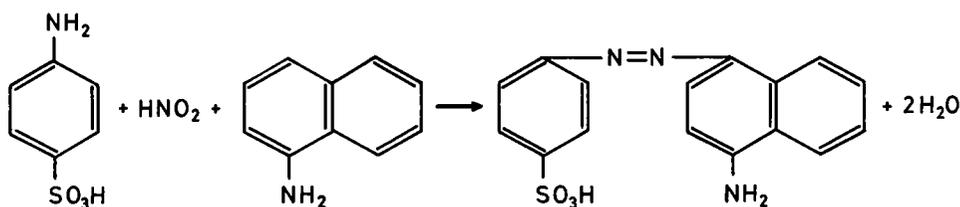
Anderledes er det ved den dissimilatoriske reduktion, hvor den samlede kvælstofmængde fra nitratmolekylet vil findes ekstracellulært i kulturen som reducerede uorganiske forbindelser. Hvilke forbindelser, der findes, vil afhænge af bakteriens art og de kulturelle betingelser; i nogle tilfælde ophobes nitrit, i andre frit kvælstof og kvælstofforilte og i andre igen  $\text{NH}_3$  eller ukendte intermedierprodukter. Teoretisk kan der skelnes mellem de tilfælde, hvor elektronerne på deres vej fra det organiske substrat til nitrat har passeret elektrontransportkæden, så der dannes ATP (ægte dissimilatorisk nitratreduktion), og de tilfælde, hvor elektronerne – uden om elektrontransportkæden – mere eller mindre direkte overføres til nitrat (tilfældig (incidentel) dissimilatorisk nitratreduktion), hvorved der kun dannes en ringe mængde energi.

Med de i bakteriologien anvendte nitratreduktionsprøver kan man ikke skelne mellem de lige nævnte situationer, men kun påvise følgende tre muligheder: 1) ingen påviselig reduktion af nitrat (hvilket dog strengt taget ikke udelukker en assimilatorisk reduktion), 2) nitrat er reduceret til nitrit, som ophobes, og 3) nitrat er reduceret ud over nitrit. I sidste tilfælde kan man evt. vise, at reduktionsproduktet er en luftart ( $\text{N}_2$  og/eller  $\text{N}_2\text{O}$ ). Dette særlige udfald af reduktionsprocessen kaldes fra gammel tid en denitrifikation, som dog kun er et specielt tilfælde af en dissimilatorisk nitratreduktion.

Det specifikke substrat for prøven er det til kulturmediet tilsatte  $\text{KNO}_3$ . Ved prøvens udførelse tilsættes et reagens, som kan påvise tilstedeværelsen af nitrit. Finder man nitrit, er det udtryk for, at nitratreduktase har reduceret nitrat til nitrit. Finder man derimod ikke nitrit, kan det skyldes enten at der ikke har været nogen nitratreduktase-aktivitet, eller at dannet nitrit er forsvundet igen ved at være blevet reduceret videre af en nitritreduktase. For at skelne mellem disse to muligheder sættes til de glas, hvor der ikke er påvist nitrit, en lille mængde zinkstøv, som kemisk er i stand til at reducere nitrat til nitrit. Sker dette, hvad der vil vise sig ved, at der nu fremkommer en nitritreaktion i glasset (nitritreagenset er jo allerede til stede), betyder det, at der stadig var nitrat i glasset, og heraf kan sluttes, at den manglende nitritreaktion ved reagenstilsætningen må betyde, at der ikke har været nogen nitratreduktase-aktivitet, dvs. nitratreduktionsprøven er negativ. Hvis der efter tilsætning af zinkstøv stadig er en negativ nitritreaktion, ved man, at der i glasset hverken findes nitrat eller nitrit, og det kan tages som udtryk for, at det oprindelig tilstedeværende nitrat er reduceret til et stadium ud over nitrit, og at der altså må have været både nitrat- og nitritreduktase-aktivitet. Hvor vidt reduktionen er gået, får man ikke at vide på denne måde, med mindre man samtidig undersøger for luftudvikling. Påviser man luft, kan resultatet "nitrat reduceret ud over nitrit" ændres til "nitrat reduceret til luftformige

kvælstofforbindelser = denitrifikation". Vi ved ikke sikkert, hvilken diagnostisk betydning det har at skelne mellem disse to slags resultater. Nogle hævder, at ægte denitrifikation (dvs. luftudvikling) er karakteristisk for bestemte bakterier, men det er muligt, at forskellen alene beror på de nærmere betingelser, hvorunder prøven udføres.

Der findes flere metoder til påvisning af nitrit (se fx. Wallace & Neave 1927), men den helt dominerende metode i bakteriologien er Griess-Ilosvay's. Ved tilsætning af sulfanilsyre og  $\alpha$ -naftylamin i eddikesur opløsning til kulturen dannes i nærvær af nitrit et rødt azofarvestof (p-sulfobenzene-azo- $\alpha$ -naftylamin) efter følgende ligning:



Sulfanilsyre + salpetersyrling +  $\alpha$ -naftylamin  $\rightarrow$  p-sulfobenzene-azo- $\alpha$ -naftylamin (rødt azofarvestof)

Reaktionen er så følsom, at den kan påvise 1 del nitrit i 100 millioner dele vand (Warrington 1881). Da farven under visse omstændigheder ikke er stabil, har man undertiden anvendt dimetyl- $\alpha$ -naftylamin (Wallace & Neave 1927), der giver samme røde farve, men er mere stabil, og reaktionen er kun en anelse mindre følsom. Siden 1966, da det blev kendt, at  $\alpha$ -naftylamin ved indånding eller berøring med hud eller slimhinder rummede risiko for fremkaldelse af blærekræft (pjece fra The Chester Beatty Research Institute, Royal Cancer Hospital, London, april 1966), er man gået over til i stedet at bruge enten 1- $\alpha$ -naftylamin-7-sulfonsyre – også kaldet Cleve's syre (Crosby 1967) eller  $\alpha$ -naftol (McLean & Henderson 1966). Med Cleve's syre indtræder reaktionen lidt langsommere, og den røde farve har en lidt anden nuance, men følsomheden er af samme størrelsesorden som med  $\alpha$ -naftylamin.

En præcis formulering af de optimale kulturelle betingelser for udførelse af en standard-nitratreduktionsprøve er vanskelig. For det første kan reaktionen som nævnt skyldes to helt forskellige processer, der hver især kræver særlige betingelser, og for det andet er oplysningerne om undersøgte bakterier så spredte, at man må være forsigtig med generaliseringer. For flertallet af de kendte nitrat- og nitritreduktaser er det vist, at de kræver tilstedeværelse af nitrat for at induceres. Mens den assimilatoriske reduktion stort set synes

upåvirket af ilt, er de dissimilatoriske enzymer overordentlig iltfølsomme, så selv meget små iltkoncentrationer udøver total repression over for enzymdannelse, foruden at de hæmmer aktiviteten (Nason 1962; Pichinoty 1963). Heraf fremgår, at hvis man tilstræber at påvise flest mulige af de tilfælde, hvor nitratreduktion er en potentiel mulighed, og i disse tilfælde ønsker, at reduktionen skal gå så langt som muligt, vil det være hensigtsmæssigt at udføre prøverne under strikt anaerobe forhold; men biokemiske erfaringer tyder på, at kravene til anaerobiose er så strenge, at de vil være vanskelige at opfylde i et rutinelaboratorium (Skerman et al. 1951, 1957, 1958, cit. efter Pichinoty 1973).

### 3. Valg af metode

Med de nu gængse nitratreduktionsprøver udnytter man ikke alle de muligheder, der i dag er for at karakterisere en ukendt stamme i dens forhold over for nitrat. Man kunne derfor overveje, om man ikke på baggrund af den nuværende viden om assimilatorisk og dissimilatorisk nitratreduktion burde indføre nogle simple vækstforsøg under aerobe og anaerobe forhold, som kunne give oplysning om bakteriernes krav med hensyn til kvælstofkildens art (nitrat, ammoniak eller organisk kvælstof) og give mulighed for at skelne mellem obligat denitrifikation og fakultativ (incidentel) nitratreduktion ud over nitritstadiet. Ved at kombinere vækstforsøg under varierende betingelser med påvisning af nitrit,  $N_2$ ,  $N_2O$  og  $NH_3$ , er der efter litteraturen at dømme mulighed for at skelne mellem assimilatorisk og dissimilatorisk reduktion og for en underopdeling af sidstnævnte på grundlag af slutproduktet. Mens man uden tvivl bør udnytte disse muligheder, hvis man arbejder med taxonomiske revisioner, er det mere tvivlsomt, om det vil være rimeligt at gøre det ved rutineidentifikationer. Vort foreløbige skøn er, at gevinsten ikke ville stå i forhold til indsatsen, men at det ville være af værdi at gennemføre en større undersøgelse, som kunne vise dette. Indtil en sådan undersøgelse foreligger, kan man fortsætte med at bruge de to metoder, som i mange år har været anvendt i diagnoseafdelingen:

A) Nitratreduktionsprøve efter vækst i 0,5% pepton tilsat nitrat

B) Nitratreduktionsprøve efter vækst i halvflydende ascitesagar tilsat nitrat

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

##### A. Nitratreduktionsprøve efter vækst i 0,5% peptonopløsning

###### Substrat

Pepton (Bacto)	0,5%
KNO <sub>3</sub>	0,02%

i dest. vand, pH 7,4

Aftappes i reagensglas (155 x 14/15 mm), i ca. 5 cm høje lag.

###### Reagenser

a) Sulfanilsyre	3 g
Iseddikesyre	180 ml
Dest. vand	720 ml
b) 1-naftylamin-7-sulfonsyre (Cleve's syre)	1,2 g
Iseddikesyre	180 ml
Dest. vand	720 ml

###### Udførelse

Nitratglasset tilsås rigeligt fra en renkultur på standardplade og inkuberes ved 35°C eller den temperatur, hvor stammen vokser bedst. Nogen fast aflæsningstid kan ikke angives; reglen er, at kulturen skal være fuldt udvokset, hvilket med *Enterobacteriaceae* som regel tager mindre end 20 timer, men med andre bakterier kan tage 48 timer eller længere.

Af reagenser tilsættes ca. 1 ml sulfanilsyre og ca. 1 ml af Cleve's syre. Man venter derefter i ca. 5 minutter på fremkomsten af rød farve, inden der evt. tilsættes zinkpulver. En lille mængde zinkpulver (ca. 20–25 mg/glas) drysses oven i alle glas, som ikke har udviklet rød farve, hvorefter glassene henstår til observation i 10 minutter. Da det er en reduktion, som skal foregå, må glasset ikke rystes energisk, men med et par slag på siden af det kan man undgå, at zinkstøvet bliver liggende som et lag på overfladen af kulturen. Som kontrol bør altid medtages et ikke-tilsæt glas, der inkuberes sammen med kulturene.

*Aflæsning og fortolkning*

Der er to trin i aflæsningen: 1) Efter tilsætning af reagens a+b noteres, om glasset er blevet rødt. En rød farve betyder, at der er nitrit i glasset, og det registreres som +, hvilket altså betyder, at nitrat er reduceret til nitrit. 2) Til glas, der ikke er blevet røde, tilsættes zinkpulver, og det noteres om glasset nu bliver rødt. Et rødt glas på andet trin af aflæsningen registreres som 0, og det betyder, at nitrat ikke er blevet reduceret, hvorimod et farveløst glas registreres som +++ som tegn på, at både nitrat og nitrit er blevet reduceret. Kontrolglasset undersøges på samme måde som de tilsåede glas.

Hvis nitratglasset er udstyret som et Durham-glas til påvisning af luftudvikling (ligesom i glukose- og mannitforgæringsglas), aflæses, om der er luftudvikling, og i så tilfælde angives resultatet som ”+++ med luftudvikling”. De forskellige prøveudfald tillader følgende slutninger:

0	:	Ingen nitratreduktase til stede
+	:	Nitratreduktase, men ikke nitritreduktase til stede
+++	}	: Både nitrat- og nitritreduktase til stede
+++ med luft		

En farve, der er så svagt rød efter zinktilsætning, at man vil være tilbøjelig til helt at se bort fra den, kan rejse tvivl om, hvorvidt resultatet skal være 0 eller +++. Erfaringen viser, at disse stammer som regel er +++ positive, men det vil være klogt at lave prøven om og inkubere lidt længere.

*Fejlkilder*

1) Hvis væksten er sparsom, evt. fordi pepton er et uegnet næringsstof for den pågældende bakterie, kan det føre til falsk negative resultater. Prøv i sådanne tilfælde at dyrke i nitratglasset med ascitesagar.

2) Små forureninger af substratbestanddelene med nitrit kan give falsk positive ”+” resultater, derfor altid kontrolglas.

3)  $\text{NO}_2^-$  i laboratorie- eller termostatluften kan absorberes i glassene og give falsk positive ”+” resultater, derfor altid kontrolglas.

4) Den røde nitritfarve kan bleges hurtigt (ved meget høje nitritkoncentrationer), så et positivt ”+” resultat overses, derfor kontinuelig observation efter reagenstilsætningen.

5) Den overgang til en mere brunlig farve, som især ses i kulturer, der er  $\text{H}_2\text{S}$  positive, betyder intet for aflæsningen; en brun farve er i denne sammenhæng så god som en rød.

6) Tilsætning af en for stor mængde zinkstøv kan give en falsk ”+++” reaktion, idet zinkstøvet kemisk reducerer ikke blot nitrat til nitrit, men også det dannede nitrit videre til andre forbindelser.

7) Længere tids inkubering i rigere medier fx. filtreret bouillon kan ændre en ”+” reaktion til en ”+++” reaktion. Det er iagttaget bl.a. med *Proteus rettgeri* og *Proteus inconstans* biotype B, men kan sikkert forekomme med andre *Enterobacteriaceae*, og det sker formentlig, fordi nitrat og nitrit opbruges under den incidentelle dissimilation som følge af den kraftigere vækst.

*B. Nitratreduktionsprøve efter vækst i halvflydende ascitesagar*  
*Substrat*

Filtreret bouillon

KNO <sub>3</sub>	0,1%
Ascites	30%
Vandagar	ca. 0,3%

Aftappes i glas (155 x 14/15 mm), med paraffineret vatprop i høj søjle og mærkes ”30% ascites, halvflydende agar med KNO<sub>3</sub>”.

Forskellen på de to prøver er alene, at det sidste medium giver bedre vækstbetingelser for nogle bakterier samt at forholdene i kulturen på grund af den halvflydende konsistens kan holdes mere anaerobe end i et flydende medium, hvilket generelt set er en fordel. I øvrigt gælder alt, hvad der er beskrevet om prøven i peptonmediet også for prøven i halvflydende ascitesagar.

**6. Fortegnelse over de vigtigste nitratreducerende ”+” og denitrificerende ”+++” species (ifølge Bergey’s Manual, 8. udg.)**

Ved denitrificerende forstås enten at luftdannelse er påvist eller at både nitrat og nitrit er reduceret.

*Campylobacter*: 1 species +++, 2 species +

*Pseudomonas*: mange species +++, enkelte species +

*Agrobacterium*: 2 species +, mange stammer +

*Alcaligenes*: nogle species +++, andre species +

*Brucella*: alle species +, undtagen *B. ovis*

*Bordetella*: 1 af 3 species +

*Enterobacteriaceae*: alle species +, undtagen *Erwinia amylovora*

- Vibrio*: alle species +, undtagen *V. proteus*  
*Aeromonas*: alle species +, nogle stammer +++  
*Plesiomonas*: alle stammer +  
*Photobacterium*: alle stammer +  
*Lucibacterium*: alle stammer +  
*Chromobacterium*: de fleste stammer +++, nogle +  
*Flavobacterium*: 4 species +  
*Haemophilus*: de fleste species +  
*Pasteurella*: alle species +  
*Actinobacillus*: alle species +  
*Bacteroides*: nogle species +  
*Fusobacterium*: en enkelt species +  
*Neisseria*: 1 species +++, flere species reducerer nitrit, men ikke nitrat  
*Branhamella*: de fleste stammer +, kan være +++  
*Moraxella*: de fleste stammer i 4 species +  
*Paracoccus*: 2 species +++  
*Veillonella*: 2 species +  
*Micrococcus*: nogle stammer +++(?), nogle +  
*Staphylococcus*: nogle stammer +++, nogle +  
*Gemella*: nogle stammer reducerer nitrit, men ikke nitrat  
*Peptococcus*: 3 species +  
*Bacillus*: enkelte species +++, mange species +, nogle stammer af andre species +  
*Clostridium*: en del species +, nogle stammer i andre species +  
*Lactobacillus*: nogle få stammer af 2 species +  
*Listeria*: 2 species +  
*Corynebacterium*: nogle animale species +  
*Arthrobacter*: de fleste species +, nogle stammer i de resterende species +  
*Cellulomonas*: de fleste stammer +  
*Propionibacterium*: 4 species +, nogle stammer af andre species +  
*Eubacterium*: 7 species +, nogle stammer af andre species +  
*Actinomyces*: 3 species +, nogle stammer i de øvrige species +  
*Arachnia*: eneste species +  
*Bacterionema*: eneste species +  
*Rothia*: eneste species +++  
*Mycobacterium*: en del species +, nogle stammer af andre species +  
*Nocardia*: 15 species +, nogle stammer i 2 andre species +

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Af det beskrevne fremgår, at man ikke ubetinget kan stole på et negativt udfald af prøven og at man ikke kan være sikker på at kunne påvise alle tilfælde af "reduktion ud over nitrit" samt at det kan være tvivlsomt, hvor ofte man kan identificere dette prøveudfald med begrebet en ægte denitrifikation. Med andre ord, prøven er ikke særlig god.

På den anden side foreligger der en række situationer, hvor den på et rent empirisk grundlag har vist sin anvendelighed.

Et eksempel er slægten *Pseudomonas*, hvor flere vigtige species regelmæssigt giver "+++" reaktioner og nogle species giver "+" reaktioner, mens de fleste ikke reducerer. Lignende forhold gælder for slægten *Alcaligenes*. Det betragtes som en hovedregel, at alle arter i familien *Enterobacteriaceae* reducerer nitrat til nitrit. En enkelt undtagelse er *Erwinia amylovora*, som dog er i stand til at assimilere nitrat i vækstforsøg (Sutton et al. 1960). En del stammer af *Proteus rettgeri* og en del stammer af *Proteus inconstans* biotype B, og muligvis andre *Enterobacteriaceae*, kan man få til at reducere ud over nitrit. I slægten *Bordetella* kan *B. bronchiseptica* reducere til nitrit, mens de 2 andre species mangler evnen. I slægterne *Moraxella* og *Neisseria* kan prøven med nogen fordel anvendes i speciesdifferentiering, når hovedvægten lægges på de positive reaktioner. Til *Neisseria*-gruppen kan det anbefales også at bruge glas med nitrit i en mængde på 0,01%.

Til klassifikatoriske formål har "+" reaktioner kun ringe værdi, mens "+++" reaktioner er værdifulde (Palleroni & Doudoroff 1972).

## 8. Referencer

- Bronfenbrenner, J. & Schlesinger, M.J.: A study of nitrate reduction by bacteria. Abstr. Bacteriol. 4: 2, 1920.
- Burri, R. & Stutzer, A.: Ueber Nitrat zerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust. Cbl. Bakt. II. Abt. 1: 257, 350, 392, 1895.
- Chester Beatty Research Institute (Royal Cancer Hospital, London): Precautions for laboratory workers who handle carcinogenic aromatic amines. 1966.
- Conn, H.J. & Breed, R.S.: The use of the nitrate-reduction test in characterizing bacteria. J. Bact. 4: 267, 1919.
- Conn, H.J.: On the detection of nitrate reduction. J. Bact. 31: 225, 1936.
- Crosby, N.T.: The determination of nitrite in water using Cleve's acid, 1-naphtylamine-7-sulphonic acid. Proc. Soc. Water Treatment and Examination 16: 51, 1967.
- Dieudonné, A.: Beiträge zur Nitritbildung der Bakterien. Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.) 11: 508, 1895.

- Gayon, U. & Dupetit, G.: Sur le fermentation des nitrates. C.R. Acad. Sci. (Paris) 95: 644, 1882a.
- Gayon, U. & Dupetit, G.: Sur la transformation des nitrates en nitrites. C.R. Acad. Sci. (Paris) 95: 1365, 1882b.
- Gayon, U. & Dupetit, G.: Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniment petits. Mém. Soc. Sci. Phys. Nat. (Bordeaux) 3. Ser., II: 201, 1886.
- Griess, P.: Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen". Ber. dtsh. chem. Ges. 12: 426, 1879.
- Ilosvay, L.: Sur les réactions des acides azoteux et azotique. Bull. Soc. Chim. (Paris) 2: 347, 1889.
- Laurent, E.: Expériences sur la réduction des nitrates par les végétaux. Ann. Inst. Pasteur 4: 722, 1890.
- Lunkewicz, M.: Eine Farbenreaktion auf die salpetrige Säure der Kulturen der Cholera-bacillen und einiger anderer Bakterien. Cbl. Bakt. Orig. 16: 945, 1894.
- Maassen, A.: Die Zersetzung der Nitrate und der Nitrite durch die Bakterien. Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.) 18: 21, 1901.
- McLean, J. & Henderson, A.: Test for the presence of nitrate not involving carcinogenic reagents. J. clin. Path. 19: 632, 1966.
- Meusel, E.: Nitritbildung durch Bakterien. Ber. dtsh. chem. Ges. 8: 1214, 1875.
- Nason, A.: II. Enzymatic pathways of nitrate, nitrite, and hydroxylamine metabolisms. Bact. Rev. 26: 16, 1962.
- Pačová, Z. & Kocur, M.: A comparison of tests for nitrate reduction. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 231: 525, 1975.
- Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. Ann. Rev. Phytopathol. 10: 73, 1972.
- Pichinoty, F.: L'effet oxygene et la biosynthese des enzymes d'oxydoréduction bactériens. In: Mécanismes de régulation des activités cellulaire chez les microorganismes. (Colloque, Marseilles, 1963), p. 507, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1965.
- Pichinoty, F.: Identification d'une nitrate-réductase assimilatrice d'origine bactérienne. C.R. Acad. Sci. (Paris) 259: 3868, 1964.
- Pichinoty, F.: La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. Bull. Inst. Pasteur. 71: 317, 1973.
- Porres, J.M. & Porter, V.: Rapid nitrate reduction test. Amer. J. med. Technol. 40: 257, 1974.
- Schloesing, T.: Sur la décomposition des nitrates pendant les fermentations. C. R. Acad. Sci. (Paris) 66: 237, 1868.
- Schönbein, C.F.: Jahresbericht über die Fortschritte der Chemie. 1861, p. 154.
- Schönbein, C.F.: Ueber die Umwandlung der Nitrate in Nitrite durch Conferven und andere organische Gebilde. J. prakt. Chemie 105: 208, 1868.
- Steel, K.J. & Fisher, P.J.: A fallacy of the nitrate reduction test. Mth. Bull. Minist. Hlth Lab. Serv. 20: 63, 1961.
- Sutton, D.D., Ark, P.A. & Starr, M.P.: The causal agent of bacterial brown rot of *Cypripedium* orchids. Phytopathology 50: 182, 1960.
- Wallace, G.I. & Neave, S.L.: The nitrite test as applied to bacterial cultures. J. Bact. 14: 377, 1927.
- Warrington, R.: Note on the appearance of nitrous acid during the evaporation of water. J. Chem. Soc. 39: 229, 1881.
- ZoBell, C.E.: Factors influencing the reduction of nitrates and nitrites by bacteria in semi-solid media. J. Bac. 24: 273, 1932.

# **Undersøgelse af kulhydratomsætning**



## *Kapitel 17*

### **Alment om kulhydratomsætning**

Kulhydrater forekommer i stor mængde i naturen og er for mange bakterier deres vigtigste kulstof- og energikilde. Som følge heraf er der under evolutionen udviklet et stort antal bakterielle enzymer med den opgave at omdanne de naturlige kulhydrater til simple forbindelser, så de enten kan indgå som brændstof i bakteriernes energistofskifte eller tjene som byggesten for bakteriecellerne.

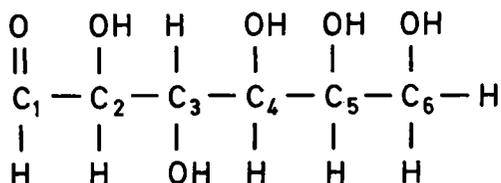
Forskellige bakterier har mere eller mindre forskellige måder, hvorpå de omsætter kulhydrater, og måden hvorpå en bestemt større eller mindre gruppe af bakterier gør det er ofte så karakteristisk, at man derved kan adskille grupperne fra hinanden.

Biokemisk har man efter mere end 100 års arbejde med disse problemer nogenlunde rede på de vigtigste former for bakteriel kulhydratomsætning og kan på denne baggrund beskrive og forstå de forskellige bakteriologiske prøver, der anvendes. Da det uden en vis biokemisk baggrundsviden er svært at få samling på det omfattende stof, vil vi indledningsvis give en kort oversigt over A) de vigtigste kulhydrater, B) de vigtigste biokemiske nedbrydningsmekanismer og nævne C) syntese af enkelte diagnostisk vigtige polysakkarider. I øvrigt henvises til de mere detaljerede fremstillinger i eksisterende biokemiske og mikrobiologiske håndbøger. Særlig vil vi anbefale Stanier, Adelberg & Ingraham: *The Microbial World*, 4. udg. 1976, og Hoff-Jørgensen, Moe & Munksgaard: *Elementær biokemi*, 3. udg. 1975.

#### **A. De vigtigste kulhydrater**

Sukkerarter eller kulhydrater er bygget som kæder eller ringe af indbyrdes forbundne kulstofatomer (-C-), hvortil der er bundet brintatomer (-H) og hydroxylgrupper (-OH). Antallet af kulstofatomer i den enkelte ring eller kæde er hyppigst 6, men kan være både større og mindre.

Et typisk kulhydrat er D-glukose, som i kædeform ser således ud:



Ringformen opstår ved at molekylets ender bøjes mod hinanden, og der dannes en ny binding mellem C<sub>1</sub> og C<sub>5</sub> atomet.

Glukosemolekylet er modersubstans for de fleste andre kulhydrater, som adskiller sig fra glukose enten ved at brintatomer og hydroxylgrupper ved de forskellige kulstofatomer vender i andre retninger eller ved at antallet af kulstofatomer varierer, eller ved at flere ringe er bundet sammen til længere molekyler (di-, tri- og polysakkarider).

Hvis man forestiller sig, at -H og -OH gruppen ved C<sub>5</sub> atomet byttede stilling, ville man have et stof med samme sammensætning som D-glukose, men med lidt andre egenskaber. Dette stof kaldes L-glukose, og D- og L-formerne af glukose kaldes stereoisomere stoffer. Hvis molekylet findes i ringform, vil der være en -H og en -OH gruppe på C<sub>1</sub> atomet, som også kan bytte stilling, og disse to stereoisomere stoffer kaldes α- og β-former af henholdsvis D- og L-glukose. Stereoisomeri spiller en vigtig rolle i biokemien, fordi visse enzymer er i stand til at angribe den ene stereoisomere form af et stof, men ikke den anden form, og derfor skal de kulhydrater, der anvendes i bakteriologiske prøver, være mærket som D- eller L- og evt. også som α- eller β-, så man præcist ved i hvilken form stoffet findes.

De kulhydrater, der hyppigst anvendes i bakteriologiske prøver, er sakkari- der og alkoholer, som omtales i det følgende.

*Monosakkarider:* Af navnet mono fremgår, at der i molekylet kun er een ring eller kort kæde. De fleste af de monosakkarider, der bruges, har 6 kulstofatomer og kaldes under eet hexoser (hexa = 6); fx. fruktose, galaktose, glukose, mannose og sorbose. Monosakkarider med 5 kulstofatomer kaldes tilsvarende pentoser (penta = 5), fx. arabinose, xylose og ribose.

Rhamnose er en hexose med eet iltatom mindre end sædvanligt og betegnes derfor som en desoxyhexose.

*Di- og trisakkarider* er kulhydrater med henholdsvis to og tre monosakkarider forbundet ved en særlig kemisk binding kaldet en glykosidbinding, se fx. formelen for laktose i kapitel 26). Et fællesnavn for begge grupper er oligosakkarider (oligo = få), som angiver at de består af få monosakkaridenheder modsat polysakkarider (poly = mange), der består af mange sammenkoblede

enheder. De hyppigst anvendte *disakkarider* med angivelse af de monosakkarider, der indgår, er følgende:

Trehalose  $\rightarrow \alpha$ -D-glukose +  $\alpha$ -D-glukose

Sakkarose  $\rightarrow \alpha$ -D-glukose +  $\beta$ -D-fruktose

Cellobiose  $\rightarrow \beta$ -D-glukose +  $\beta$ -D-glukose

Maltose  $\rightarrow \alpha$ -D-glukose +  $\beta$ -D-glukose

Laktose  $\rightarrow \beta$ -D-glukose +  $\beta$ -D-galaktose

Melibiose  $\rightarrow$  D-glukose +  $\alpha$ -D-galaktose

De hyppigst anvendte *trisakkarider* med angivelse af de monosakkarider, der indgår, er følgende:

Raffinose  $\rightarrow \alpha$ -D-galaktose +  $\alpha$ -D-glukose +  $\beta$ -D-fruktose

Melezitose  $\rightarrow \alpha$ -D-glukose +  $\beta$ -D-fruktose +  $\alpha$ -D-glukose

Et andet navn for disakkarider er glykosider på grund af navnet på den særlige kemiske binding mellem de to monosakkarider. Til glykosiderne regnes også stoffer, hvor kun en af komponenterne er et monosakkarid, medens den anden komponent er et andet stof. Af sådanne glykosider anvendes i bakteriologien følgende:

Æskulin  $\rightarrow$  glukose + 6,7-dihydroxycumarin (= æskuletin)

Salicin  $\rightarrow$  glukose + salicylsyrealkohol (= salignin)

*Polysakkarider*: Eksempler på disse kulhydraters opbygning er omtalt i afsnittene om stivelse, cellulose og pectin. Det er ofte meget lange molekyler opbygget af een bestemt slags monohexose.

*Alkoholer*: I laboratoriejargon regnes visse alkoholer med blandt kulhydraterne, fordi de bruges på linie med de egentlige kulhydrater i de såkaldte forgæringsrækker, og desuden er de kemisk nært beslægtede. De almindeligst anvendte alkoholer er følgende, ordnet efter antallet af primære alkoholgrupper:

Monovalent	:	ætanol	=	ætylalkohol
Trivalent	:	glycerol		
Pentavalent	:	adonitol	=	reduceret ribose
Hexavalent	:	sorbitol	=	reduceret glukose
		mannitol	=	reduceret mannose
		dulcitol	=	reduceret galaktose
		inositol	(dette molekyle er ringformet modsat de øvrige alkoholer)	

Efter korrekt kemisk nomenklatur ender alle alkoholors navne på -ol, men i Danmark bruges ofte betegnelserne adonit, sorbit, mannit, dulcit og inosit uden tilføjet -ol.

## B. Hovedprincipperne for bakteriel kulhydratnedbrydning

Det er en hovedregel for al bakteriel udnyttelse af organiske stoffer i naturen, at den sker gennem en trinvis spaltning af store molekyler til stadig mindre molekyler, og at disse mindre molekyler derefter gennemgår en række omdannelser på en sådan måde, at den energi, der er til stede i molekylernes kemiske bindinger, frigøres til brug for bakteriestofskiftet. De meget simple kemiske forbindelser, som tilsidst bliver tilbage, indgår påny i naturens stofkredsløb, hvor de tjener til opbygning af nye generationer af levende organismer, herunder også nye bakterieceller. Hver af de nævnte biokemiske spaltninger og omdannelser foregår under medvirken af særlige enzymer, dvs. proteinmolekyler dannet af bakterierne med det formål at fremme bestemte biokemiske omdannelser.

Det første trin i nedbrydningen af poly- og oligosakkarider er spaltning af glykosidaseprøver, fx. ONPG-prøven og andre tilsvarende som ONPX- og PGUA-prøverne (se kapitel 21) samt æskulinprøven (se kapitel 22). Plur på prøver, der påviser sådanne enzymer, kan nævnes stivelse-, cellulose- og pectinspaltningprøver (se kapitel 23, 24 og 25). Desuden de såkaldte glykosidaseprøver, fx. ONPG prøven og andre tilsvarende som ONPX- og PGUA-prøverne (se kapitel 21) samt æskulinprøven (se kapitel 22).

Når de forskellige monosakkarider er frigjort, vil de først blive omdannet til glukose, inden den videre nedbrydning begynder, og desuden er det nødvendigt, at der herefter sker en binding af fosfatgrupper til glukosen, en såkaldt fosforylering. Der findes bestemte enzymer, der omdanner de andre monosakkarider til glukose og fremkalder fosforyleringen, men der er ikke udarbejdet bakteriologiske prøver, som specielt påviser disse processer.

Glukosenedbrydningen kan foregå på forskellige måder, som er karakteristiske for bestemte hovedgrupper af bakterier:

### *1) Fermentation og fermentativ syredannelse*

Strikt anaerobe bakterier og fakultativt anaerobe bakterier under anaerobe forhold omdanner først glukose til pyrodruesyre, et molekyle der kun er halvt så stort som glukose, og afhængig af hvilke slægter og arter der er tale om bliver pyrodruesyren derefter omdannet til andre stoffer, især syrer og alkoholer. Den række af biokemiske processer, der fører fra glukose til pyrodruesyre, kan variere noget. Hyppigst følger processen Embden-Meyerhof reaktionskæden, i andre tilfælde Entner-Doudoroff reaktionskæden, eller den såkaldte pentose-fosfat-shunt, og undertiden benyttes flere veje samtidigt. Den samlede proces kaldes fermentation eller forgæring, og afhængig af slutprodukternes art taler man om følgende hovedtyper af forgæring: mælkesyre-, smørsyre-, mixed-acids-, butandiol-, butanol-acetone- og propionsyreforgæring. En analyse af slutprodukterne vil altså oplyse, hvilken form for forgæring der har fundet sted, og dermed give vigtige diagnostiske oplysninger. En moderne metode til analyse af slutprodukterne er gaskromatografi, som især har fundet anvendelse ved diagnostik af anaerobe bakterier. Den kræver et ret kostbart apparatur og skal ikke nærmere omtales her. Den forgæringstype, som kaldes 2,3-butandiol-forgæring, har acetoin som mellemprodukt, og det er det stof, man påviser ved Voges-Proskauers prøve (se kapitel 19).

Da syrer udgør en større eller mindre del af slutprodukterne ved de fleste forgæring, behøver man ikke en fuldstændig analyse af slutprodukterne for at afgøre, om en forgæring har fundet sted; det er tilstrækkeligt at vise, at der er dannet syre, og det kan nemt gøres ved hjælp af en indikator. Dette er grundlaget for forgæringsprøver, der påviser fermentativ syredannelse (se kapitel 18). I nogle tilfælde er der blandt slutprodukterne luftarter som brint og kuldioxid, og derfor er nogle af forgæringsglassene indrettet, så man kan afgøre om der har fundet luftudvikling sted, hvorved man får en ekstra oplysning.

### *2) Oxidation, respiration eller fuldstændig forbrænding*

Hos fakultativt anaerobe bakterier under aerobe forhold og hos strikt aerobe bakterier følger glukosenedbrydningen i begyndelsen de samme veje som ved forgæring, men fra pyrodruesyrestadiet sker der noget helt andet.

Ved hjælp af to reaktionskæder, den ene kaldet Krebs cyklus, den anden respirationskæden, overføres energien i molekylet trinvis til bakterien samtidig med, at den frigjorte brint kobles til luftens ilt, så der dannes vand, mens

kulstofatomer frigøres som kuldioxyd. En sådan fuldstændig omdannelse (forbrænding) af glukose til kuldioxyd og vand under samtidig afgivelse af store mængder energi kalder man en respiratorisk eller oxidativ proces, fordi den modsat fermentationen forudsætter, at der enten er fri ilt til stede eller iltholdige kemiske forbindelser som fx. nitrat, sulfat og karbonat, hvorfra iltten kan overføres. Når iltten stammer fra en af de nævnte kemiske forbindelser, taler man om en anaerob respiration, fordi den kan foregå under anaerobe forhold, men biokemisk svarer til en respiration. Bakteriel respiration er i princippet den samme proces, som den hvorved alle højere organismer – inklusive mennesker – skaffer sig den energi, der er nødvendig til livets oprettholdelse.

Da fuldstændig oxidation af kulhydrater ikke fører til dannelse af karakteristiske slutprodukter, men kun til  $H_2O$  og  $CO_2$ , er der ingen specielle bakteriologiske prøver som kan vise, at der har fundet en fuldstændig oxidation sted i lighed med de prøver, der bruges til påvisning af forgæringsprodukter. Man kan indirekte gennem vækstforsøg fastslå, at fx. en fuldstændig glukoseoxidation har fundet sted, men det er ikke en prøve, der specielt anvendes til undersøgelse af kulhydratomsætning.

Det kan nævnes, at den energimængde, der frigives ved fuldstændig oxidation af et molekyle glukose, er mere end 10 gange så stor som den, der frigøres ved fermentation af samme molekyle. Det skyldes at fermentationsprodukterne kun repræsenterer en delvis nedbrydning af det oprindelige molekyle, og derfor stadig indeholder en stor del af den bundne energi.

### *3) Oxidativ syredannelse og dannelse af 3-ketoglykosider*

Nogle strikt aerobe bakterier, deriblandt eddikesyrebakterier og pseudomonader, har enzymer, der medfører at visse mono- og disakkarider eller alkoholer ved en iltkrævende proces omdannes til en syre. Da processen er iltkrævende, er det praktisk at betegne den som oxidativ syredannelse, modsat den fermentative syredannelse, men brugen af ordet oxidativ i denne sammenhæng må ikke forlede til at tro, at der er tale om en respiration. De væsentligste træk, som skiller oxidativ syredannelse fra fuldstændig oxidativ nedbrydning af glukose er følgende: (1) Der sker ingen indledende fosforylering, (2) der dannes ingen energi, og (3) der er kun tale om små ændringer i molekylerne. Fx. kan den ene eller den anden ende af et glukosemolekyle iltes, så der opstår en syregruppe; i det ene tilfælde betegnes syren som glukonsyre, i det andet som glucuronsyre. På tilsvarende måde kan aldehydgruppen i et disakkaridmolekyle iltes, så der opstår fx. laktobionsyre eller maltobionsyre af henholdsvis laktose og maltose, og ætanol iltes, så der opstår eddikesyre.

Hvad bakterierne opnår ved en oxidativ syredannelse, er ikke kendt, men syredannelse kan udnyttes diagnostisk, fordi forskellige arter varierer med hensyn til de kulhydrater, de kan danne syre af. Oxidativ syredannelse påvises i Hugh & Leifson's O/F medium (se kapitel 20).

En nyopdaget, sjælden oxidativ proces, er visse disakkariders og de tilsvarende bionsyrers omdannelse til 3-ketoglykosider. Enzymer, der kan foretage denne omdannelse, er foreløbig kun fundet hos plantepatogene varianter af *Agrobacterium radiobacter*, og da et produkt som 3-ketolaktose er nemt at påvise, er der på dette grundlag udviklet en særlig 3-ketolaktoseprøve til identificering af disse bakterier (se kapitel 26).

### C. Bakteriel syntese af kulhydrater

I bakteriers vægge og kapsler findes mange slags polysakkarider som normale cellebestanddele, syntetiseret af den pågældende bakterie ved hjælp af særlige enzymer. Ofte udgør polysakkariderne en del af de antigener, som benyttes i den serologiske diagnostik, og for så vidt udnyttes de i bakteriologisk differentialdiagnose, men direkte påvisning af syntese af et bestemt polysakkarid anvendes derimod sjældent. Kun påvisning af kapselpolysakkariderne levan og dextran ud fra sakkrose er udformet som en særlig bakteriologisk prøve (se kapitel 27).

## *Kapitel 18*

### **Forgæringsprøver**

Prøver der påviser, om der i bakteriekulturer under anaerobe forhold dannes syre eller syre + luft af glukose og andre kulhydrater. Syredannelsen tages under disse forhold som udtryk for, at der i kulturen er foregået en forgæring eller fermentation, men man kan ikke uden yderligere undersøgelser afgøre, hvilken forgæringstype der er tale om.

#### **1. Historisk indledning**

Gæring i sukkerholdige naturprodukter, især plantesaft, har man kendt og udnyttet fra ældgammel tid, bl.a. til fremstilling af berusende drikke og syrnede mælkeprodukter. I 1830'erne opdagede man, at gæringsprocesserne ved øl- og vinfremstilling skyldes tilstedeværelsen af gærsvampe, og i løbet af 1860'erne viste Pasteur, at der ved alle slags gæringer fandtes mikroorganismer og ved en bestemt slags gæring altid en bestemt svamp eller bakterie. Pasteurs gæringsundersøgelser fik stor betydning ved at bane vej for den opfattelse, at mikroorganismer også kunne være årsag til sygdomme. At den egentlige årsag til gæringsprocesserne er mikroorganismernes enzymer, blev vist af E. Buchner i 1897, og dermed blev grunden lagt til den detaljerede biokemiske udforskning af forgæringsprocesserne og de involverede enzymer.

Da man i begyndelsen af 1880'erne begyndte at arbejde med renkulturer af bakterier, var det en nærliggende tanke at undersøge, hvilke forgæringsprodukter de enkelte bakterier dannede i sukkerholdige medier (Brieger 1884, 1885; Frankland et al. 1891; Grimbert 1895, 1896), men med de analysemetoder, man dengang rådede over, var undersøgelserne ikke egnede til praktisk diagnostiske formål. Derimod fik det stor praktisk betydning, da man begyndte at interessere sig for, om reaktionen i udvoksede bakteriekulturer blev sur eller alkalisk bedømt efter farveomslag af tilsat lakmus (H. Buchner 1885; Petruschky 1889, 1890). Det viste sig hurtigt, at sur reaktion skyldtes tilstedeværelse af sukker i medierne, og at der var forskel på forskellige bakteriers evne til at danne syre af en bestemt sukkerart; desuden viste Theobald Smith (1890), at det samme var tilfældet med evnen til at danne luft, undersøgt i

en Einhorns gæringskolbe. Af disse tre bakteriologers undersøgelser fremgik det fx., at colibakterier regelmæssigt dannede syre og luft af glukose og laktose, medens tyfusbakterier manglede evnen til luftdannelse og heller ikke dannede syre af laktose. Her havde man altså simple metoder til at skelne mellem to bakterier, hvis adskillelse tidligere havde været et stort problem. Fra disse iagttagelser udvikledes i de følgende 10 år de såkaldte "lange sukker-rækker" til differentiering af nært beslægtede bakterier, især takket være undersøgelser af Capaldi & Proskauer i Tyskland (1896), C.O. Jensen i Danmark (1897, 1898) og Durham i England (1900/01).

Da man først havde erkendt, at syre- og luftdannelse fra bestemte sukkerarter var nyttige kriterier i bakteriekarakteristikken, og havde indført forgæringsrækker, hvor en længere række glas med hver sin forskellige sukkerart undersøges samtidig, blev det en vigtig opgave at fastlægge undersøgelsesbetingelser, som gav reproducerbare og let aflæselige resultater.

#### *Påvisning af luftudvikling*

Begrebet gæring var oprindelig først og fremmest knyttet til luftudvikling i form af bobler i den gærende væske, og de første diagnostiske forgæringsprøver var også baseret på iagttagelse af luftbobler i kulturglasset (se fx. Prazmowski 1880 og H. Buchner 1885). Det kan her nævnes, at C.J. Salomonsen i sin disputats (1877) beskrev en forsøgsanordning, som kunne påvise luftudvikling i bakteriekulturer. Han viste, at luften især optrådte i kulturer, som indeholdt sporedannere, og at luften bestod af  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  og spor af  $\text{H}_2\text{S}$ . I 1890 foreslog Theobald Smith at bruge Einhorns gæringskolbe i bakteriologien, da man herved opnåede dels en mere sikker påvisning af luftdannelse, dels en mulighed for at undersøge det relative forhold mellem udviklet  $\text{CO}_2$  og brint, et forhold som viste sig at være ret konstant og forskelligt hos forskellige bakterier. I Einhorns gæringskolbe opfanges en del af den udviklede luft i den ene, lukkede ende af et ombøjet glasrør (U-glas), hvori kulturen befinder sig.

Durham lancerede i 1898 en meget simpel metode til luftpåvisning, som stadig er i brug de fleste steder. Han anbragte et lille omvendt glas i bunden af et almindeligt substratfyldt kulturglas. På grund af varmeudviklingen under steriliseringen blev luften drevet ud af det omvendte glas, så det blev fyldt med substratet. Hvis der senere under forgæring udvikledes luft, ville noget samle sig i toppen af det omvendte glas og være tydeligt synlig. Et substratglas med et lille indvendigt glas med bunden i vejret kaldes stadig et Durham-glas, og det hele er i virkeligheden – som Durham selv udtrykte det – et modificeret U-glas. Fordelen ved at have et U-glas i to separate dele er indlysende både ved oprensning og fyldning af glassene. Durham anførte, at det lille glas skulle være så stort, at det kunne rumme ca. halvdelen af substratmængden. Det er en regel, der nu om stunder synes stærkt imod, og vistnok med det resultat,

at luftpåvisningen er blevet mindre pålidelig.

Til at skelne mellem homo- og heterofermentative mælkesyrebakterier foreslog Gibson & Abdel-Malek (1945), at forgæringsglasset forsynedes med en "agarprop" lige over det flydende medium, da den ville blive skubbet i vejret, hvis der produceredes CO<sub>2</sub>, dvs. bakterien var heterofermentativ. Sperber & Swan (1976) sammenlignede denne agarprop-metode dels med en kemisk metode, hvor CO<sub>2</sub> udfældes i bariumhydroxyd, dels med en ny "hot-loop" metode, hvor en rødglødende "nichrome" øse stikkes ned i kulturen med det resultat, at en strøm af CO<sub>2</sub>-bobler frigøres. Det viste sig, at agarprop-metoden svigtede i  $\frac{1}{3}$  til  $\frac{1}{2}$  af tilfældene, mens "hot-loop" metoden gav samme resultat som den kemiske metode. Forfatterne antager, at metoden også vil kunne anvendes til påvisning af luftudvikling hos andre bakterier.

### *Syrepåvisning – indikatorer*

De oprindeligt anvendte kemiske metoder til kvalitativ og kvantitativ syrebestemmelse (se fx. Brieger 1884, 1885 og Grimbert 1895, 1896) var for besværlige til at få betydning i den daglige diagnostik. Beijerinck (1891) angav dog en simpel metode baseret på tilsætning af kalciumkarbonat til pladerne, så der opstod en opklaring omkring syreproducerende kolonier.

Hurtigt gik man over til blot at bestemme den samlede titrerbare syremængde uanset syrens art ved hjælp af en indikator. Den mest anvendte indikator var lakmus fremstillet af forskellige lavarter (se fx. H. Buchner 1885 og Petruschsky 1889, 1890). Lakmus var ikke nogen god indikator, da den var af uensartet sammensætning og svag i farven, men i begyndelsen havde man ikke andre.

Først med danskeren S.P.L. Sørensens arbejder (1908, 1912, cit. fra Clark & Lubs 1917) fik man den rette forståelse af syre-base begrebet og et kriterium for udvælgelse af indikatorer, som var egnede til brug i biologiske væsker. Særlig Clark & Lubs i USA (1917) arbejdede for at indføre S.P.L. Sørensens synspunkter i bakteriologien.

Da det efterhånden blev erkendt, at den titrerbare syremængde i bakteriologiske substrater er et meningsløst begreb, gik man over til i stedet for at bestemme slut-pH i forgæringsglassene som et udtryk for syredannelsen.

Den mest præcise pH bestemmelse opnår man ved at måle brintjonkoncentrationen direkte med en glaselektrode, men i dagligt arbejde, hvor stor præcision ikke er nødvendig, kan man opnå brugbare resultater ved hjælp af indikatorer.

De nu hyppigst anvendte indikatorer, som alle er syntetiske stoffer, er opstillet i følgende tabel:

	pH:	
Bromkresolpurpur	gul	5,4 – 7,0 violet
Bromtymolblåt	gul	6,1 – 7,7 blå
Fenolrødt	orange	6,9 – 8,5 rød
Metylrødt	rød	4,2 – 6,3 gul
Neutralrødt	rød	6,8 – 8,0 gul
Andrades indikator	rød	5,2 – 8,0 gul

De tre første er sulfonphthaleiner, de følgende er henholdsvis et azofarvestof, et fenazinderivat og et surt fuksin.

Ved at vælge en bestemt indikator og ved at give substratet en bestemt udgangs-pH og bufferkapacitet kan man til en vis grad regulere forgæringsprøvens følsomhed. Et alt for følsomt system er ingen fordel. I de fleste medier må man regne med, at der samtidig med syredannelse kan ske en vis basedannelse på grund af deaminering af aminosyrer, således at en del af den dannede syre neutraliseres.

#### *De anvendte sukkerarters renhed og stabilitet*

De fleste sukkerarter, der anvendes ved forgæringsprøver, er naturprodukter, dvs. de findes oprindeligt i blanding med andre stoffer, inklusive andre sukkerarter, og må skilles fra disse ved forskellige rensningsprocedurer, inden et rent produkt foreligger. Forskellige handelsvarer varierer med hensyn til renhedsgrad, og man bør naturligvis vælge de reneste, fordi tilblandinger af andre sukkerarter, selv i ret små mængder, kan føre til forkerte resultater, fx. kan en ringe glukosetilblanding på grund af syredannelse fra glukosen føre til den fejlagtige opfattelse, at en ikke-forgærbar sukkerart forgæres.

Hvis man får mistanke om, at et bestemt handelsprodukt giver falsk positive reaktioner på grund af tilstedeværelse af fx. glukose, kan dette som regel afsløres ved forsøg med stammer med kendt forgæringsevne.

Et andet praktisk vigtigt problem er sukkerarternes stabilitet. Ændringer kan finde sted, dels som følge af mutarotation, dels som følge af partiel spaltning af glykosidbindinger i oligo- og polysakkarider, og endelig kan sukkerarterne danne komplekser med andre af substratets komponenter. Der findes i litteraturen en del arbejder, som behandler disse problemer (Durham 1901; Mudge 1917; Fulmer et al. 1931; Llewellyn Smith 1932; Davis & Rogers 1939-40), især med henblik på de ændringer, der kan fremkaldes ved opvarmning

under substratsterilisering, men tolkningen af resultaterne er ikke i fuld indbyrdes overensstemmelse.

Visse kendsgerninger synes dog at stå fast. Varmebehandling af substrater med tilsatte sukkerarter bør være så lempelig som foreneligt med opnåelse af fuld sterilitet. Bedst er formentlig en kortvarig autoklavering, hvor man lukker for dampen, så snart temperaturen har nået 120°C, eller en kortvarig kochning 3 gange med et døgn mellemrum (Tyndallisering). Ved tilsætning af sterilfiltreret sukker kan man helt komme uden om problemet. Her må det tilføjes, at nogle forfattere (Fulmer et al. 1931; Orla-Jensen 1933) har bemærket, at der ved opvarmningen kan opstå vækstfaktorer, som begunstiger væksten af visse mikroorganismer. Et synligt tegn på, at opvarmningen har medført ændringer, er den såkaldte karamelisering, dvs. en mere eller mindre udtalt brunfarvning af det sukkerholdige substrat. Til forgæringsforsøgene må man forlange, at bouillonene ikke har ændret farve ved steriliseringen.

Fra kemien er det kendt, at monosakkarider er noget ustabile i svagt alkaliske opløsninger ved stuetemperatur, men mere stabile i sure opløsninger. Særlig uheldig er opvarmning ved alkalisk pH i nærvær af fosfater. For at få mindst mulig omdannelse af tilsatte monosakkarider bør varmesterilisering derfor foregå efter at pH er indstillet til 6,6–6,8; er det ønskeligt med en højere pH i mediet, må den reguleres efter steriliseringen. Glykosider og nogle polysakkarider er mere stabile over for alkali end monosakkarider. Ved opvarmning kan reducerende sukkerarter reagere med aminosyre i substratet (Mailards reaktion) og derved medføre mangel på disponible aminosyrer.

#### *Grundsubstratets sammensætning*

Allerede Durham (1901) angav en række forhold, som der bør tages hensyn til ved udførelse af forgæringsprøver, og de fleste har stadig fuld gyldighed.

Om grundsubstratet bemærkes, at det ikke må indeholde forgærbare substanser. Mange kødinfusioner og kødekstrakter indeholder en vis mængde glukose stammende fra muskelkødet. En kontrol med en kendt glukoseforgærende stamme er nødvendig, og viser det sig, at mængden er stor nok til at give syre- og luftdannelse, må glukosen fjernes. Det sker ved tilsætning af en glukoseforgærende bakterie eller gærart, der får lov til at vokse i hele bouillonportionen, hvorefter cellerne fjernes igen ved filtrering.

Nødvendigheden af en kontrol med uønskede sukkermængder i substratbestanddelene er senere bekræftet af Vera (1950), som fandt, at et meget stort antal af over 500 undersøgte prøver af peptoner, kødekstrakter, bouillonere etc. gav anledning til syre- og/eller luftdannelse. Vera fremhæver pankreasfordøjet kasein og gelatinepepton som langt de bedst egnede og

minder om, at gærautolysat kan indeholde op til 40% kulhydrat. Vera's resultater – der er temmelig rystende – må for en del skyldes brug af fenolrødt som indikator. Fenolrødt viser sur reaktion ved pH 6,9, og da medierne var indstillet på pH 7,3 og ikke tilsat ekstra buffer, skulle der ikke megen syredannelse til, før indikatoren slog om.

Durham pointerede også, at hvis mediet ikke giver bakterierne tilstrækkeligt gode vækstbetingelser, kan forventet luftdannelse udeblive.

Ligeledes gjorde Durham opmærksom på, at hvis den tilsatte sukkermængde er for lille (fx. 0,1%), kan syremængden neutraliseres fuldstændigt af basiske produkter dannet af pepton.

Af særlige substrattilsætninger, som kan interferere med forgæringsprøver, må også nævnes hesteserum, der kan indeholde maltase og dermed give falsk positive reaktioner i maltoseglasset (Peizer 1942).

Tilsætning af en fosfatbuffer, som regel en blanding af  $K_2HPO_4$  og  $KH_2PO_4$ , er hensigtsmæssig, fordi det forøger den eksisterende bufferkapacitet og gør det lettere at etablere en bestemt udgangs-pH i substratet.

#### *Iltningsforholdene i forgæringsglasset*

Den almindelige forgæringsrækkes største anvendelsesområde er de fakultativt anaerobe bakterier. Da forgæringen af sukker er en anaerob proces, burde prøven teoretisk set udføres under helt anaerobe forhold. Dette ville have den fordel, at man undgik den alkalidannelse, der er en følge af oxidativ nedbrydning af substratets kvælstofholdige bestanddele, men er samtidig meget upraktisk med så mange glas.

Man bruger derfor stationære kulturer (dvs. uden rystning eller luftgennembobling), og høje væskesøjler, hvor iltspændingen i den nederste del af søjlen hurtigt bliver så lav, at forgæringen her kan foregå under optimale betingelser. Man vil i en del tilfælde se, at indikatoromslaget i øverste del af glasset er forsinket, eller at der sekundært sker et tilbageslag af indikatoren – begge dele udtryk for alkalidannelse på grund af oxidative processer.

Hvis syredannelsen er kraftig, har de nævnte forhold ingen praktisk betydning, men ved svagere grader af syredannelse kan de medvirke til, at aflæsningen bliver usikker.

En hæmning af de oxidative processer kan opnås ved agartilsætning, altså ved at lade processerne foregå i en halvflydende eller fast agarsøjle, hvor ilt-diffusionen er hæmmet, og hvor samtidig blandingen af syre og base fra glassets nederste og øverste del vil blive stærkt forsinket (Conn & Hucker 1920; Hugh & Leifson 1953).

### *Forgæringsmønstre*

De enkelte bakteriearters forgæringsmønster er en relativt konstant egenskab og kan derfor udnyttes ved identifikation af nye isolater.

Erfaringen har dog vist, at der blandt stammer af samme art kan være mindre forskelle i forgæringsmønstret. Det kan enten skyldes, at en bestemt stamme på grund af en mutation har tabt evnen til at forgære en bestemt sukkerart, eller at en stamme på grund af plasmiderhvervelse har fået evne til at forgære en sukkerart, som de øvrige stammer af arten ikke kan forgære (se fx. Smith & Parsell 1975; Schmid & Schmitt 1976; Efstathiou & McKay 1976).

Ved identifikationen, hvor den ukendte stammes mønster sammenlignes med mønstrene i et forgæringsskema, må der tages hensyn til denne variation, og i de bedste forgæringsskemaer er resultaterne ikke angivet som rent plus og minus resultater, men et procenttal angiver hvor hyppigt man kan forvente afvigelse (se fx. forgæringsskemaer fra CDC i Atlanta, USA).

### *Forskellige udformninger af forgæringsprøver: plademethoder, mikrometoder, hurtigmetoder og direkte enzymtest*

Ved primær isolering af tarmpatogene bakterier er det en fordel, hvis de altdominerende colibakterier straks kan kendes på pladen. Da man havde erkendt, at evnen til at danne syre af laktose var en af forskellene mellem *E. coli* og *S. typhi*, var det nærliggende at udnytte denne forgæringsforskel i selve primærpladen ved at tilsætte laktose og en indikator, så man på indikatoromslaget straks kunne udskille alle laktoseforgærende kolonier.

De første plader af denne slags var Conradi-Drigalski's lakmus-laktose-agar (1902), Grünbaum & Hume's neutralrødt-laktose-agar (1902) og lidt senere MacConkey's galdesalt-neutralrødt-laktose-agar (1905). Senere er mange forskellige varianter angivet, deriblandt vores såkaldte "blå plade", som indeholder laktose og bromtymolblåt, så alle laktoseforgærende bakterier danner gule kolonier.

Mikrometoder, hvor forgæringen finder sted i meget små substratportioner, er beskrevet af Bronfenbrenner & Schlesinger (1918a, b), der især tilstræbte substratbesparelse på grund af forholdene under første verdenskrig, og af Hannan & Weaver (1948), som foruden substratbesparelsen lagde vægt på at reaktionerne kunne aflæses hurtigere. De moderne kits som "API" og "Enterotube" etc. er også mikrometoder. At der er økonomisk gevinst ved at bruge mikrometoder — dog nok ikke ved de kommercielle sæt — kan næppe benægtes, men den omstændighed at man i de fleste laboratorier holder fast ved makrometoderne, tyder på at de øvrige fordele er tvivlsomme. At man af tidsbesparende grunde har anbefalet mikrometoder, der foregår i plasticbakker med huller og en automatisk multiinokulator, nævnes for en fuldstæn-

digheds skyld (fx. Young & Udey 1976).

Prøver, der er baseret på virkningen af præformeret enzym i et meget stort inoculum tilsat en sukkeropløsning, har været forsøgt, især med bakterier som *Neisseria* og *Brucella*, der vokser så dårligt, at man har en mistanke om, at den ofte svage syredannelse væsentligst skyldes den dårlige vækst. *Neisseria*-undersøgelser efter dette princip er omtalt af Kellogg & Turner (1973) og Young et al. (1976). *Brucella*-metodikken er omtalt af Manclark et al. (1975). Efter erfaringer i diagnoseafdelingen fungerer direkte enzymtest af denne type ikke altid tilfredsstillende, hvad der måske skyldes, at der her – i modsætning til de fleste andre direkte enzymtests vi bruger – ikke er tale om, at et enkelt eller nogle få enzymer skal fungere, men lange rækker af enzymer.

## 2. Biokemisk baggrund

Ved de her omtalte simple forgæringsprøver konstateres alene, om der er produceret syre nok til at give omslag af den anvendte indikator, og om der samtidig med syredannelsen er dannet synlig luft. Af disse to simple konstateringer kan man ikke udlede, hvilke biokemiske processer der har været involveret, og kan derfor ikke i det konkrete tilfælde formulere undersøgelsens resultat som mangel eller tilstedeværelse af bestemte enzymer eller rettere enzymrækker.

Det betyder ikke, at man mangler viden om forgæringsprocessernes biokemi; faktisk udgør en detaljeret beskrivelse af disse processer en stor del af enhver lærebog i biokemi. Da den biokemiske baggrund ikke kan udnyttes ved fortolkning af de simple forgæringsprøvers umiddelbare resultater, og da en forståelig fremstilling ville fylde mange sider, har vi valgt at nøjes med allerede i den historiske indledning at medtage de biokemiske forhold, som har praktisk betydning, og i øvrigt at henvise til de bakteriologiske og biokemiske håndbøger (se kapitel 17).

Ved en kvalitativ og kvantitativ analyse af de forskellige luftarter, syrer og andre stoffer, som ophobes i et forgæringsglas, kan man nå et langt stykke i retning af at fastslå, hvilke biokemiske processer der i et konkret tilfælde er tale om, og på den måde få forskelle frem, som kan udnyttes i diagnostikken. Sådanne analyser kan i dag udføres ved hjælp af gaskromatografi, men ser man bort fra anaerobe bakterier, er der vist almindelig enighed om, at til rutineidentifikation er gaskromatografisk analyse ikke nødvendig.

### 3. Valg af metode

Ved valg af metode skal man dels tage stilling til, hvilke sukkerarter der skal indgå i forgæringsrækken, dels vælge grundsubstrat, indikator, inkubationstid osv. for det enkelte forgæringsglas.

Ideelt set burde valget af sukkerrækken individualiseres, idet man på grundlag af en foreløbig diagnose afgjorde, hvilke sukkerarter man især forventede ville være nyttige til at sikre en endelig diagnose. I praksis vælger man som regel at arbejde med én eller flere standardrækker. Den korteste standardrække består af 1 glas: glukoseglasset. Hvis der ikke dannes syre i glukoseglasset, kan man til alle praktiske formål regne med, at der heller ikke vil dannes syre af de andre sukkerarter, fordi de første trin i næsten alle forgæringsprocesser er en omdannelse af udgangsmaterialet til glukose (undtagelser er visse oxidative syredannelsesprocesser, som vil blive kommenteret i afsnittet om oxidativ syredannelse). Heraf følger, at hvis ikke tidsfaktoren ved prøvebesvarelser vejede så tungt i al klinisk bakteriologi, ville det være rationelt og økonomisk at starte enhver undersøgelse med glukoseglasset alene. Som et kompromis har man valgt en forgæringsrække, der er tilstrækkelig omfattende til, at en definitiv diagnose som regel kan stilles på de hyppigst forekommende bakterier, og at supplere denne række med ekstra glas, så snart det står klart, at standardrækkens glas ikke vil være tilstrækkelige til at stille en endelig diagnose. Forskellige laboratorier her i landet anvender noget forskellige standardrækker bestemt af en kombination af hensyn til den diagnostiske sikkerhed og størrelsen af det disponible personale. Diagnoseafdelingens standardrække inkluderer for tiden følgende sukkerarter: arabinose (Ar), xylose (X), rhamnose (Rh), glukose (Gl), laktose (Lak), sakkarose (Sak), maltose (Ma), adonit (Ad), dulcit (Du), sorbit (So), inosit (It) og salicin (Sal). Det må betegnes som en lang standardrække, der er forholdsvis dyr i materiale og arbejdskraft, men til gengæld giver en god diagnostisk sikkerhed.

De supplerende forgæringsglas, som evt. senere føjes til standardrækken, er bestemt af resultaterne i denne første række og af de øvrige resultater, idet man udnytter sit kendskab til bestemte sukkerarters differentialdiagnostiske værdi, når de diagnostiske muligheder er indsnævret så meget, at valget står mellem ganske få diagnoser.

Da metodestabilitet altid er vigtig, og det gælder ikke mindst forgæringsprøver, skal der tungtvejende grunde til at ændre en indarbejdet metode. Den metode, som i dag anvendes i de fleste danske laboratorier, er fastlagt i diagnoseafdelingen i 1930'erne af Martin Kristensen og Kauffmann og er ikke undergået principielle ændringer i mellemtiden. Omkring 1960 indførtes en række med Hugh & Leifson's O/F medium, som i særlige situationer træ-

der i stedet for forgæringsrækken. Denne række er omtalt i kapitel 20.

På grund af vækstkrav og andre forhold bruger man til forgæringsundersøgelse af visse bakteriegrupper andre substrater end diagnoseafdelingens standardforgæringsmedium. Det gælder bl.a. streptokokker, corynebakterier og *Neisseria* samt delvis stafylokokker.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Diagnoseafdelingens standardmetode ved forgæringsundersøgelser i flydende medium*

*Substrat*

Kødekstrakt Lab-Lemco (Oxoid)	0,5%
Pepton, Orthana	1,0%
NaCl	0,3%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	0,2%
Bromtymolblåt (1:500)	12 ml/liter

i demineraliseret ledningsvand.

pH reguleres ved tilsætning af 5 N NaOH, så den efter autoklavering er 7,4. Til denne sterile ekstraktbouillon tilsættes 0,5% af den ønskede sukkerart, og blandingen steriliseres ved 10 minutters kochning. Aftappes som en 5 cm høj søjle i smalle glas (155 x 10/11 mm).

*Udførelse*

For hver stamme, der skal undersøges, opstilles standardrækkens glas i et særligt stativ i en bestemt rækkefølge, dvs. den rækkefølge som er angivet i arbejdsbog eller på arbejdskort. Som regel er glukose- og mannitglasset indrettet som Durham-glas til påvisning af luftudvikling.

Tilsåning kan enten ske med en dråbe af en bouillonkultur eller kulturmasse fra en renkultur på agar- eller blodplade. Inoculum bør ikke være mere end 24 timer gammelt (gerne mindre) og bør ikke tages fra sukkerholdige medier. Dels risikerer man i så fald, at der kun er få levende bakterier, hvis reaktionen er blevet stærkt sur på grund af forgæring, dels risikerer man, at der kan være sket en adaptation til forgæring af den bestemte sukkerart for kulturen indeholder.

Hvis man tager kultur fra en plade, er det simplest at bruge en lige platin-nål. Med nålen tages en synlig mængde kultur, og derefter inokuleres alle

rækkens glas med samme nål, idet den blot stikkes ned øverst i forgæringsmediet og straks trækkes op igen. Flampering af hvert enkelt glas før og efter tilsåningen er den bedste sikkerhed mod forurening og infektionsrisiko, men øvede laboranter kan undlade flampering, med mindre nålen kommer på afveje, dvs. berører prop eller glas. Ved tilsåningen af en række glas kan man af uopmærksomhed komme til at springe et glas over, idet man tilsår et andet glas to gange; for at undgå dette er det praktisk at rykke et tilsået glas et hul frem i stativet, så man hele tiden direkte kan se, hvor langt man er kommet. Glassene inkuberes ved 35°C.

#### *Aflæsning og fortolkning*

Glassene aflæses efter 24 og 48 timer, og hvis diagnosen ikke kan stilles efter 48 timer, fortsættes inkuberingen med aflæsning hver eller hveranden dag, enten indtil diagnosen er stillet eller indtil der er gået ialt 7 dage.

Aflæsningen skal foregå i dagslys og bedst mod en hvid baggrund; i elektrisk lys ser man ikke farvenuancerne så tydeligt.

Det første, man sikrer sig ved aflæsningen, er, at der er kommet vækst i glasset, dvs. man skal se, om substratet er uklart, før man ser på farven. Væksten kan ligge som et bundfald, der først bliver synligt efter oprystning. Hvis der i et enkelt glas i rækken ikke er synlig vækst, skyldes det sandsynligvis, at det ved en fejl ikke er blevet tilsået. Det er bl.a. for at undgå, at sådanne glas uden videre aflæses som syrenegative, at det er vigtigt først at konstatere, om der overhovedet er vækst i glasset.

*Luftudvikling* i Durham-glassene med glukose og mannit ses som regel tydeligt ved, at en større eller mindre del af det lille indvendige glas er fyldt med luft og evt. er bragt til at flyde op til overfladen. Ved svag luftudvikling dannes kun en lille luftblære i toppen af det indvendige glas, og da det ikke er ualmindeligt, at der i forvejen er en ganske lille luftblære, kan man komme i tvivl om, hvordan det observerede skal fortolkes. Man kan da sammenligne med andre glas uden luftudvikling eller bruge et utilsået, men inkuberet Durham-glas som kontrol, men bedst er det at gentage undersøgelsen.

*Aflæsning af indikatorfarven* kan ske på forskellig måde. Det er ret almindeligt i arbejdsbogen at sætte et plus for de glas, som er gule, et plus i parentes for de glas, som er grøngule, og et minus ved de øvrige. Denne form for aflæsning er i virkeligheden en samtidig aflæsning og fortolkning og kan accepteres, når det drejer sig om hurtigt og kraftigt syredannende stammer som fx. *E. coli* og *Klebsiella*.

I andre tilfælde står man sig ved at benytte en kort talrække til at angive

de forskellige farvenuancer, som indikatoren viser, fx.:

- 0 = blå
- 1 = blågrøn
- 2 = grøn
- 3 = grøngul
- 4 = gul

og at notere det aktuelle tal i arbejdsbogen for den pågældende aflæsningsdag. Ud fra disse direkte aflæsninger kan man så senere afgøre, hvor man i det pågældende tilfælde vil sætte grænsen mellem syredannelse og ikke-syredannelse.

Ved stammer, der bedømt efter indikatorfarven kun viser svag eller sen syredannelse, står man nemlig i den vanskelige situation, at en samtidig alkalidannelse kan have neutraliseret så meget af syren, at indikatoren ikke viser fuldt omslag. Hvis man i et sådant tilfælde kun registrerer grøngule og gule glas som positive, forlanger man i virkeligheden, at syredannelsen for at registreres som positiv skal være så udtalt, at indikatoren slår helt eller næsten helt om, og det er ikke nødvendigvis den bedste måde af definere syredannelse på.

Her er altså tale om, at man selv kan vælge mellem et lavere og et højere følsomhedsniveau for syredannelsesprøven, afhængigt af hvilken gruppe bakterier man arbejder med. Sikrest er det at inkludere et tilsæt sukkerfrit kontrolglas med grundsubstratet, idet alle glas med farvenuancer, der har fået en højere talværdi end kontrolglasset, i virkeligheden repræsenterer glas med syredannelse.

I glas, hvor indikatoren har været slået helt om til gult, kan man på et senere tidspunkt se indikatoren øverst i glasset begynde at slå tilbage, dvs. igen blive mere grønlig eller grønblå. Det er udtryk for alkalidannelse på grund af oxidativ deaminering af aminosyrerne i peptonen, som fortrinsvis finder sted øverst i glasset, hvor iltmængden er størst. Dette tilbageslag i indikatorfarve ændrer ikke tolkningen; et glas, der én gang har været gult, skal altid tages som udtryk for, at syredannelse har fundet sted.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige ud over de sædvanlige ved omgang med patogene bakterier.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Delvis af pladshensyn og delvis fordi litteraturens forgæringsmønstre er baseret på vidt forskellige metoder har vi her udeladt den sædvanlige fortegnelse.

Diagnoseafdelingens diagnoseskemaer kan bruges, og i øvrigt henvises til litteraturen, specielt til monografierne fra CDC i Atlanta.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Forgæringsrækkens enkeltprøver har vidt forskellig værdi i forskellige situationer og må udledes af foreliggende forgæringsmønstre. Generelt set gælder, at forgæringsprøver er meget værdifulde i diagnostisk bakteriologi, når det drejer sig om anaerobe og fakultativt anaerobe bakterier.

## 8. Referencer

- Beyerinck, M.W.: Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien. Cbl. Bakt. 9: 781, 1891.
- Brieger, L.: Ueber Spaltungsprodukte der Bacterien. I. Mitt. Z. physiol. Chemie 8: 306, 1884.
- Brieger, L.: Ueber Spaltungsprodukte der Bacterien. II. Mitt. Z. physiol. Chemie 9: 1, 1885.
- Bronfenbrenner, J. & Schlesinger, M.J.: The micro plate. A simple procedure for study of bacterial activity. J. med. Res. 39: 267, 1918a.
- Bronfenbrenner, J. & Schlesinger, M.J.: A rapid method for the identification of bacteria fermenting carbohydrates. Amer. J. publ. Hlth 8: 922, 1918b.
- Buchner, E.: Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. Ber. dtsh. chem. Ges. 30: 117, 1897.
- Buchner, H.: Beiträge zur Kenntnis des Neapeler Cholerabacillus und einiger demselben nahe stehender Spaltpilze. Arch. Hyg. (Berl.) 3: 361, 1885.
- Capaldi, A. & Proskauer, B.: Beiträge zur Kenntnis der Säurebildung bei Typhusbacillen und Bacterium coli. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 23: 452, 1896.
- Clark, W.M. & Lubs, H.A.: The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its applications in bacteriology. J. Bact. 2: 1, 109 & 191, 1917.
- Conn, H.J. & Hucker, G.J.: The use of agar slants in detecting fermentation. J. Bact. 5: 433, 1920.
- Davis, J.G. & Rogers, H.J.: The effect of sterilisation upon sugars. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 101: 102, 1939-40.
- Drigalski, K.W. v. & Conradi, H.: Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen, Z. Hyg. Infekt.-Kr. 39: 283, 1902.
- Durham, H.E.: A simple method for demonstrating the production of gas by bacteria. Brit. med. J. 1: 1387, 1898.
- Durham, H.E.: Some theoretical considerations upon the nature of agglutinins, together with further observations upon *Bacillus typhi abdominalis*, *Bacillus enteritidis*, *Bacillus coli communis*, *Bacillus lactis aerogenes*, and some other bacilli of allied character. J. exp. Med. 5: 354, 1900-01.

- Efstathiou, J.D. & McKay, L.L.: Plasmids in *Streptococcus lactis*: evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Appl. environm. Microbiol.* 32: 38, 1976.
- Frankland, P.F., Stanley, A. & Frew, W.: Fermentations induced by the Pneumococcus of Friedländer. *J. chem. Soc.* 59: 253, 1891.
- Fulmer, E.I., Williams, A.L. & Werkman, C.H.: The effect of sterilization of media upon their growth promoting properties toward bacteria. *J. Bact.* 21: 299, 1931.
- Gibson, T. & Abdel-Malek, Y.: The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* 14: 35, 1945.
- Grimbert, M.L.: Recherches sur le pneumobacille de Friedländer. I. Mem. Étude des fermentations provoquées par cet organisme. *Ann. Inst. Pasteur.* 9: 840, 1895.
- Grimbert, M.L.: Recherches sur le pneumobacille de Friedländer. II. Mem. *Ann. Inst. Pasteur.* 10: 708, 1896.
- Grünbaum, A.S. & Hume, E.H.: Note on media for distinguishing *B. coli*, *B. typhosus* and related species. *Brit. med. J.* 1: 1473, 1902.
- Hannan, J. & Weaver, R.H.: Quick microtechniques for the identification of cultures. II. Fermentations. *J. Lab. clin. Med.* 33: 1338, 1948.
- Hugh, R. & Leifson, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates. *J. Bact.* 66: 24, 1953.
- Jensen, C.O.: I. Om bakteriers variabilitet med hensyn til gæringsevne. *Biologisk Selskabs Forhandlinger i Vinter-Halvaaret 1897-98. Mødet den 12/11 1897. København 1898.*
- Jensen, C.O.: Forskellige grader af gæringsevne inden for samme bakteriegruppe (tyfus-coli-gruppen). *Biologisk Selskabs Forhandlinger i Vinter-Halvaaret 1897-98. Mødet den 31/3 1898. København 1898.*
- Kellogg, D.S. jr. & Turner, E.M.: Rapid fermentation confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Appl. Microbiol.* 25: 550, 1973.
- MacConkey, A.: Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J. Hyg. (Lond.)* 5: 333, 1905.
- Manclark, C.R., Pickett, M.J. & Moore, H.B.: *Laboratory Manual for Medical Bacteriology*, 5th ed. Appleton Century Crofts Educational Division Meredith Corporation, New York, 1975.
- Mudge, C.S.: The effect of sterilization upon sugars in culture media. *J. Bact.* 2: 403, 1917.
- Orla-Jensen, A.D.: Hitherto unknown activators for the growth of lactic acid bacteria. *J. Soc. Chem. Ind.* 52: 374T, 1933.
- Pasteur, L.: Fermentations. Fermentations lactique, alcoolique, butyrique, etc. (1857-1863). (*Oeuvres de Pasteur, Tome II. Masson et Cie, Paris 1922, p. 1.*)
- Peizer, L.R.: Identification of the gonococcus from cultures and the effect of certain animal sera on the fermentations of the gonococcus. *J. Bact.* 43: 733, 1942.
- Petruschky, J.: Bakterio-chemische Untersuchungen. *Cbl. Bakt.* 6: 625, 657, 1889.
- Petruschky, J.: Bakterio-chemische Untersuchungen. I. Die Farbenreaktion bakterieller Stoffwechselprodukte auf Lackmus als Beitrag zur Charakteristik und als Mittel zur Unterscheidung von Bakterienarten. *Cbl. Bakt.* 7: 1, 49, 1890.
- Prazmowski, A.: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Verlag von Hugo Voigt, Leipzig 1880.
- Salomonsen, C.J.: Studier over Blodets Forrådnelse. Disputats, G. Torsts Boghandel, København, 1877, p. 143.

- Schmid, K. & Schmitt, R.: Raffinose metabolism in *Escherichia coli* K12. Purification and properties of a new  $\alpha$ -galactosidase specified by a transmissible plasmid. *Europ. J. Biochem.* 67:95, 1976.
- Smith, M. Llewellyn: The effect of heat on sugar solutions used for culture media. *Biochem. J.* 26:1467, 1932.
- Smith, T.: Das Gahrungskolbchen in der Bakteriologie. *Cbl. Bakt.* 7:502, 1890.
- Smith, H.W. & Parsell, Z.: Transmissible substrate-utilizing ability in enterobacteria. *J. gen. Microbiol.* 87:129, 1975.
- Sperber, W.H. & Swan, J.: Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 31:990, 1976.
- Vera, H.D.: Relation of peptones and other culture media ingredients to the accuracy of fermentation tests. *Amer. J. publ. Hlth.* 40:1267, 1950.
- Young, E. & Udey, L.R.: Convenient system for multiple screening of microbial carbohydrate metabolism. *J. clin. Microbiol.* 4:201, 1976.
- Young, H., Paterson, I.C. & McDonald, D.R.: Rapid carbohydrate utilization test for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Brit. J. vener. Dis.* 52:172, 1976.

## Kapitel 19

### Voges-Proskauers prøve

Den såkaldte V-P prøve påviser tilstedeværelsen af acetoin og diacetyl i glukoseforgæringsglas, og med visse forbehold tages en positiv prøve som udtryk for, at der er foregået en butandiolforgæring.

#### 1. Historisk indledning

I Robert Koch's "Institut für Infektionskrankheiten" i Berlin arbejdede Voges og Proskauer systematisk på at finde metoder til en gruppering af de mange bakterier i den nuværende familie *Enterobacteriaceae*. I 1898 (Voges & Proskauer 1898) observerede de efter at have sat kaliumhydroxyd (KOH) til deres rækker af forgæringsglas for at binde udviklet kuldioxyd (CO<sub>2</sub>), at glassene i en af rækkerne blev svagt røde, da der var gået 24 timer. Denne "Kaliroreaktion" har senere fået navnet Voges-Proskauer's prøve eller blot V-P reaktionen. Reaktionen viste sig at være karakteristisk for bestemte grupper af *Enterobacteriaceae* og kom i en periode sammen med indolreaktionen, metylrødreaktionen og evnen til citratudnyttelse til at spille en vigtig rolle ved karakteristikkene af disse bakterier, idet de grupperedes efter deres såkaldte "Imvic" mønster, hvor "I" står for indol, "m" for metylrødt, "v" for V-P og "ic" for citrat. Således var "Imvic" mønstret for *E. coli* ++-- og for *Klebsiella* --++.

Harden (1906) viste, at V-P positive kulturer indeholdt acetoin og 2,3-butandiol, og at acetoinet ved KOH tilsætning omdannedes til diacetyl, som med en guanidiningruppe stammende fra pepton i mediet gav anledning til den røde farve.

Prøven var i sin oprindelige form ikke særlig praktisk, fordi farven var svag og indtrådte sent, men i 1931 fandt O'Meara på at sætte creatin, som også indeholder guanidiningrupper, til glasset før KOH tilsætning. Resultatet var en væsentlig hurtigere og noget kraftigere farverevaktion. Kort efter viste Barritt (1936), at man ved også at tilsætte  $\alpha$ -naftol fik en endnu kraftigere farve og en reaktion, som var 10-20 gange mere følsom end O'Meara's V-P prøve. Hvordan  $\alpha$ -naftolet virker ved man stadig ikke.

Smith, Gordon & Clark (1952) viste, at man ved at udelade bufferen i vækstmediet kunne få positive resultater med *Bacillus* arter, som var negative i det sædvanlige substrat med tilsat buffer. Garibaldi & Payne (1970) tog skridtet fuldt ud og indførte et mineralmedium, så også peptonets buffereffekt kunne undgås. Som venteligt viste det sig nødvendigt af hensyn til væksten at supplere mineralmediet med små mængder gærekstrakt. Prøven angives i denne udformning at være meget følsom, måske så følsom at det gør den mindre anvendelig til differentiering; det nævnes således at enkelte *Salmonella*- og *Escherichia*-stammer fandtes positive.

En udformning som direkte enzymtest er forsøgt af flere: Pickett & Scott (1955), Barry & Feeney (1967) og Páčová og Kocur (1973). Sidstnævntes metode synes mest rationel. Kulturen dyrkes på glukoseholdigt medium og suspenderes i en 10% pyruvatopløsning med 0,2% creatin og 0,85% NaCl, men ingen fosfatbuffer. Efter 1 times forløb tilsættes  $\alpha$ -naftol og KOH, og 20 min. senere foretages aflæsningen. Det er en praktisk vanskelighed, at pyruvat er meget lidt stabilt i vandig opløsning; man har derfor forsøgt at bruge pyruvatabletter, der opløses umiddelbart før brugen i selve reaktionsglasset (Pickett & Scott 1955; Bülow, upubliceret).

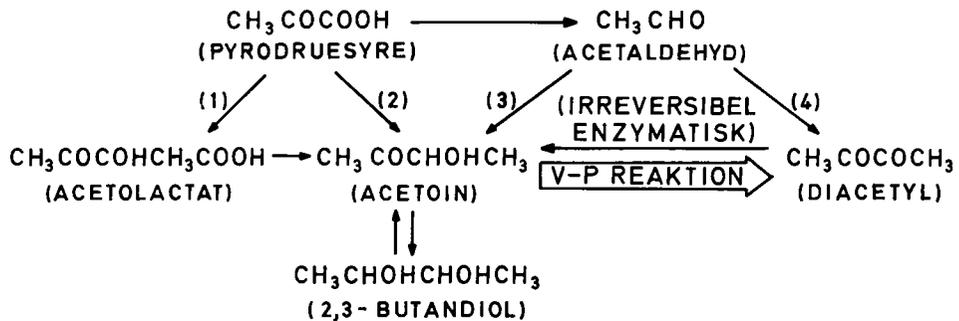
Helt nye muligheder foreligger for den, som råder over en gaskromatograf. Ifølge Lee & Drucker (1975) er der nu udarbejdet metoder til direkte påvisning af acetoin og diacetyl i kultursupernatanter ved hjælp af gaskromatografi.

Schubert (1964) og Schubert & Kexel (1964) har beskrevet en butandioldehydrogenase test, som intet har med V-P prøven at gøre, men som muligvis kunne have interesse hos bakterier, som udfører en butandiolforgæring.

## 2. Biokemisk baggrund

I det generelle afsnit om kulhydratomsætning (kap. 17) er det omtalt, at pyrodruesyre er intermediærprodukt ved alle forgæring, og at den videre nedbrydning af pyrodruesyren kan foregå på mange måder førende til de forskellige hovedtyper af forgæringsprodukter. Ved den hovedtype af forgæring, som kaldes butandiolforgæring, er 2,3-butandiol (tidl. 2,3-butylenglykol) hovedproduktet, men samtidig dannes mindre mængder af ætanol, mælkesyre, eddikesyre og myresyre. Der skal her mindes om, at der ved andre hovedtyper af forgæring samtidig med hovedproduktet kan dannes mindre mængder butandiol.

Omdannelsen af pyrodruesyre til butandiol kan ske på lidt forskellig måde hos forskellige bakterier; fire reaktionsveje (1-4) er vist i følgende skema.



Skema over fire reaktionsveje (1-4) for omdannelse af pyrodruesyre til butandiol. Den indrammede pil "V-P reaktion" angiver den *kemiske* omdannelse som finder sted ved udførelse af V-P-prøven.

Alle fire reaktionsveje forudsætter en kondensering af to molekyler indeholdende to kulstofatomer (pyrodruesyre og acetaldehyd) til et enkelt molekyle indeholdende 4 kulstofatomer. (Kulstofatom no. 3 i pyrodruesyren fjernes før eller senere ved en decarboxylering). Reaktionsvej 1: *Klebsiella* og andre V-P positive *Enterobacteriaceae* danner af to molekyler pyrodruesyre eet molekyle acetolaktat (Størmer 1975). Reaktionsvej 4: Nogle streptokokker og *Leuconostoc*, der som hovedprodukt danner mælkesyre, kan af to molekyler acetaldehyd danne små mængder diacetyl under medvirken af coenzym A (Speckman & Collins 1968; Collins & Speckman 1974). Andre bakterier danner acetoin direkte enten af to molekyler pyrodruesyre (reaktionsvej 2) eller af et molekyle pyrodruesyre og et molekyle acetaldehyd (reaktionsvej 2 + 3) (Mahler & Cordes). Samtidig benyttelse af mere end een af disse reaktionsveje forekommer uden tvivl.

Som vist på skemaet kan både acetolaktat og diacetyl enzymatisk omdannes til acetoin; begge disse omdannelser er irreversible. Omdannelsen af acetoin til 2,3-butandiol er derimod reversibel. Begge disse reaktioner skyldes samme enzym, men reaktionens retning er bestemt af det forhåndenværende pH og acetatkoncentrationen.

Det røde farvestof, som markerer en positiv V-P reaktion, skyldes diacetyl i kombination med guanidingruppen fra tilsat creatin. Da der ikke er mulighed for en enzymatisk omdannelse af acetoin til diacetyl, og da der ikke findes simple metoder til direkte påvisning af acetoin eller butandiol (se dog Lee & Drucker (1975)), er det et centralt punkt i V-P prøven i alle de tilfælde, hvor der ikke direkte er dannet diacetyl, at der skal foregå en *kemisk* iltning af acetoin til diacetyl. Den fremkaldes ved tilsætning af KOH til kulturen eller reaktionsglasset og påfølgende kraftig rystning.

V-P prøven har p.g.a. sin oprindelse især været anvendt til undersøgelse af bakterier af familien *Enterobacteriaceae*, og her har man som regel ikke

regnet med muligheden af en direkte diacetyldannelse; men nyere undersøgelser viser, at man i andre bakteriegrupper må regne med denne mulighed. Det medfører en mulighed for fejlfortolkning, idet man fra en positiv V-P reaktion ikke altid kan slutte, at der foreligger en butandiolforgæring. Forholdet rummer måske også en uudnyttet mulighed for at differentiere mellem forskellige biokemiske processer hos forskellige bakterier.

Størmer (1975) og Johansen, Bryn & Størmer (1975) har givet en detaljeret fremstilling af de biokemiske processers forløb under en butandiolforgæring af en kultur af *Enterobacter aerogenes* og oplysning om de involverede enzymer. Skematisk er reaktionsforløbet følgende:



Idet glukosen omdannes til pyrodruesyre, sker der et kraftigt fald i pH til omkring 5,8, og da dette er nær optimum for enzymerne  $E_1$  og  $E_2$  og reduktase-aktiviteten af  $E_3$ , vil hele processen hurtigt forløbe mod højre med ophobning af butandiol. Sidste del af processen kan med henblik på kulturens overlevelse betragtes som en hensigtsmæssig regulering, der forebygger at pH når så lave værdier, at væksten hæmmes eller går i stå, idet de neutrale produkter acetoin og butandiol erstatter de sure produkter acetolaktat og pyruvat. Når kulstofkilden (glukose) er opbrugt, begynder pH at stige, fordi der nu ikke længere dannes syrer. Når pH er steget til omkring 6,5, begynder  $E_3$ -enzymet at reoxidere butandiol til acetoin, som ender med at være det dominerende slutprodukt. Maximalt acetoinindhold fandtes i det konkrete forsøg 30 timer efter kulturens start. Johansen et al. (1975) angav, at der i sidste fase samtidig med stigningen i mængden af acetoin kunne påvises små mængder diacetyl, som må være dannet uden om reaktionsvej 1.

Enzymet  $E_1$  kaldes "det pH6 acetolaktat-dannende enzym". Det har et udtalt pH optimum ved 5,8; det induceres af acetat, som vil være til stede på grund af pyruvats samtidige omdannelse til acetat via acetyl-Co A; acetat virker desuden som aktivator af enzymet. Det kræver tilstedeværelse af Mn-joner og hæmmes af fenylypyruvat, glyoxylat samt  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ .

Enzymet  $E_2$  er en  $\alpha$ -acetolaktatdecarboxylase. Det har pH optimum ved 6,2-6,4, men ved lavere pH sker der i systemet en ikke-enzymatisk decarboxylering. Også dette enzym induceres af acetat.

Enzymet  $E_3$  kaldes diacetyl (acetoin) reduktase, fordi det har to virkninger. For det første kan det irreversibelt reducere diacetyl til acetoin, og for det andet kan det reversibelt reducere acetoin til butandiol. Enzymet induceres som de to andre af acetat og samtidig kontrollerer acetat omsætningen mellem

acetoin og butandiol, idet acetat ved et pH omkring 5,8 eller lavere hæmmer omdannelsen af butandiol til acetoin, således at procesforløbet bliver fra acetoin til butandiol.

Det fremgår heraf, at et passende lavt pH (ca. 5,8) og tilstedeværelsen af acetat er de vigtigste forudsætninger for pyruvatets omdannelse til butandiol.

Det nødvendige pH fald kan udeblive, hvis vækstmediet er for stærkt bufferet, men omvendt rummer fuldstændig mangel på buffer en risiko for en så stærkt sur reaktion i kulturen, at væksten hæmmes eller går i stå.

Den for V-P prøven vigtige reversion af sidste del af procesforløbet (butandiol → acetoin) forudsætter, at pH stiger igen. Det vil automatisk ske på et passende tidspunkt, hvis glukosemængden holdes så lav, at hele mængden er omdannet til pyruvat i løbet af 18-24 timer. Det viser, at en for stor glukosemængde i mediet vil udskyde det tidspunkt, hvor en positiv V-P reaktion kan påvises. Når glukosen er opbrugt, vil der på den anden side foreligge den mulighed, at bakterierne begynder at udnytte acetoin og butandiol som kulstof- og energikilde for deres videre vækst (Paine 1927). Dels kan disse produkter omsættes til acetat via en cyklisk reaktionskæde (Juni & Heym 1956a, b, 1957), dels kan acetoin oxidativt spaltes til to molekyler acetaldehyd (Lopez et al. 1975).

Evne til denne udnyttelse har øjensynlig mange bakterier, inklusive arter af *Enterobacteriaceae* og *Bacillus*. Følgen kan blive, at en V-P positiv kultur ved fortsat inkubation bliver V-P negativ. For enhver kultur i et bestemt medium er der med andre ord et ganske bestemt tidspunkt, som er optimalt for prøvens udførelse, men desværre kan der ikke gives pålidelige generelle regler for hvornår dette tidspunkt indtræffer.

Johansen et al.'s (1975) undersøgelser synes at vise, at acetoin og butandiol har særlig betydning for bakterierne under delvis anaerob vækst; der skulle således ikke være grund til at fremme iltningen af V-P kulturer under væksten fx. ved at lægge glassene horizontalt, således som man tidligere har ment.

### 3. Valg af metode

De seneste års fremskridt i retning af mere følsomme V-P prøver og muligheden for at anvende gaskromatografisk analyse af fermentationsprodukter er endnu ikke udnyttet i de fleste klinisk bakteriologiske laboratorier her i landet. Diagnoseafdelingen har i mange år kun anvendt O'Meara's V-P prøve, men har haft to standardsubstrater, det ene med buffer, det andet uden buffer. Bülow har forsøgsvis anvendt en direkte enzymtest med pyruvat som substrat (upubliceret). I det følgende beskrives kun O'Meara's V-P prøve.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

##### *O'Meara's V-P prøve*

##### *Standardsubstrat*

Pepton	0,5%
Glukose	0,5% (tilsat efter autoklivering i steril filtreret form)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5%

Før autokliveringen indstilles pH til 7,6.

Aftappes i ca. 2 cm høje lag i almindelige reagensglas (155 x 14/15 mm)

Hvis V-P prøven skal udføres på en stamme, som formodes at være en *Bacillus* eller en *Listeria*, anvendes et substrat hvor K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> er erstattet af samme mængde NaCl.

##### *Reagenser*

- a) Creatin (*ikke* creatinin) i substans
- b) 40% kaliumhydroxyd

##### *Udførelse*

V-P mediet inokuleres til synlig turbiditet fra renkultur på plade. Inkubering sker rutinemæssigt ved 30°C. Optimum-temperatur er forskellig for forskellige stammer, fx. så lav som 22°C for *Hafnia* og *Yersinia*; derfor vælger man som et kompromis 30°C til en ukendt stamme, men man kan blive tvunget til at gentage undersøgelsen ved lavere eller højere temperatur, hvis man vil have alle positive med.

Det optimale tidspunkt for udførelse af reaktionen er for de fleste stammer mellem 24 og 48 timer, men både en kortere og en længere inkubationstid kan være nødvendig for at få en positiv reaktion frem. Som standardmetode kan anbefales at udføre reaktionen efter fulde 24 timer, hvis der er anvendt et stort inoculum, og ellers efter ca. 48 timer. Hvis en forventet positiv reaktion udebliver, kan man tilså 3 glas og udføre reaktionen efter ca. 18 timer og på 4. og 6. dag.

Prøven udføres ved at man først tilsætter lidt creatin i substans; mængden er ikke kritisk, man plejer at angive en knivspids (10–25 mg). Creatinet opløses i kulturen ved at ryste glasset lidt. Derefter tilsættes KOH i en mængde, der svarer til  $\frac{2}{3}$  af kulturens volumen, og da dette i standardglassene er ca.

2 ml, skal der normalt tilsættes ca. 1,3 ml KOH. Mængden bør ikke være større, mens en noget lavere mængde er uden betydning for reaktionen. Derefter stoppes vatproppen godt ned i glassets øverste del, og med tommelfingeren for enden af det tilstoppede glas rystes det så kraftigt, at størstedelen af væsken omdannes til skum. Dette sker af hensyn til iltningen af acetoin til diacetyl og er et meget vigtigt led i reaktionens udførelse. Det skummende glas lægges næsten vandret på bordet på et stykke hvidt papir.

#### *Aflæsning*

En positiv reaktion består i, at hele kulturen antager en lys rød farve, som i små mængder kan være vanskelig at se. Derfor er en hvid baggrund og sammenligning med et sikkert negativt glas en god hjælp ved aflæsningen. Selv den svageste røde farve vurderes som en positiv reaktion. KOH tilsætningen giver nogle kulturer et gulligt skær, der ikke må opfattes som en positiv reaktion. Kraftige reaktioner indtræder i løbet af få minutter, men svage reaktioner udvikles langsommere, og det er reglen at glassene skal observeres i mindst 20 minutter, før en negativ reaktion kan konstateres.

#### *Fortolkning*

Enhver rød farve kan tages som udtryk for, at der er dannet acetoin eller diacetyl i kulturen. En sikker afgørelse af, om dette er ensbetydende med at bakterien udfører en butandiolforgæring, er dog ikke mulig i det enkelte tilfælde, men gælder sandsynligvis for de fleste *Enterobacteriaceae*.

### **5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Man skal være opmærksom på, at 40% KOH er stærkt ætsende, ellers ingen særlige.

### **6. Fortegnelse over de vigtigste V-P positive bakterier**

Alle de anførte bakterier er fakultative eller strikt anaerobe. Strikt aerobe bakterier kan ikke udføre en butandiolforgæring, men nogle af dem kan med butandiol som C-kilde danne acetoin som intermediært nedbrydningsprodukt. Dette har dog ingen større praktisk betydning, da man normalt ikke vil udføre V-P prøve på en sådan kultur. Se dog det tidligere anførte om Schuberts butandioldehydrogenase test (Schubert & Kexel 1964).

*Klebsiella*, dog ikke *K. ozoena* og *K. rhinoscleromatis*  
*Enterobacter*: de fleste stammer  
*Hafnia*: de fleste stammer ved lav temperatur  
*Serratia*: flertallet; de V-P negative undertiden udskilt som *S. kielensis*  
*Proteus*: *P. mirabilis* og *P. vulgaris*: nogle stammer ved lav temperatur  
*Yersinia enterocolitica*: nogle stammer ved lav temperatur  
*Erwinia*: de fleste species af de 3 hovedgrupper  
*Vibrio*: de fleste stammer i de fleste species  
*Aeromonas*: *A. hydrophila*: flertallet; *A. formicans (punctata)*: undtagelsesvis  
*Photobacterium*: de fleste stammer  
*Bacteroides*: enkelte species og enkelte stammer i andre species  
*Fusobacterium*: enkelte species og enkelte stammer i andre species  
*Bacterionema*: næsten alle stammer  
*Staphylococcus*: nogle biotyper i alle species  
*Streptococcus*: en del species og nogle stammer fra andre species  
*Bacillus*: 8-9 af de hyppige species  
*Clostridium*: 67 species  
*Listeria*: 3 species  
*Propionibacterium*: enkelte stammer  
*Eubacterium*: nogle stammer i nogle species  
*Rothia*: nogle stammer

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Der er 4 hovedgrupper af bakterier, indenfor hvilke man især har nytte af V-P prøver i differentieringen: *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Staphylococcus* og *Bacillus*.

Kort sammenfattet kan man udtrykke V-P prøvens værdi inden for *Enterobacteriaceae* ved at sige, at den deler denne store gruppe bakterier i 2 lige store halvdele svarende til de 2 hovedforgæringstyper, "mixed acid" forgæring og 2,3-butandiol-forgæring. Den V-P positive halvdel omfatter *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* og *Serratia*, og den V-P negative halvdel omfatter *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella* og *Shigella*. Hertil må føjes, at i de 3 genera, *Proteus*, *Yersinia* og *Erwinia*, findes en blanding af V-P positive og V-P negative bakterier.

Blandt de mere velkarakteriserede arter i slægten *Bacillus* er ca.  $\frac{1}{3}$  V-P positive, og egenskaben er værdifuld ved species-differentiering.

Som hovedregel er stafylokokker V-P positive, men en enkelt biotype i arten *Staphylococcus epidermidis* er karakteriseret ved at være V-P negativ.

Af de 2 species i slægten *Aeromonas*, som træffes i klinisk-bakteriologiske laboratorier, er *A. punctata* (tidl. *A. formicans*) altid V-P negativ, mens den hyppigste art, *A. hydrophila* er V-P positive, men V-P negative biotyper forekommer.

*Vibrio alginolyticus* er V-P positiv og *V. parahaemolyticus* negativ.

I slægten *Streptococcus* er V-P prøven værdifuld til at skelne *S. milleri* og *S. mutans*, som er V-P positive, fra *S. mitior* og *S. sanguis*, som er V-P negative. I streptokokafdelingen udføres V-P prøver efter Barrit's modifikation.

De 3 sikre species af slægten *Listeria* er alle V-P positive, men arten *L. denitrificans*, der dog næppe er en *Listeria*, er V-P negativ.

## 8. Referencer

- Barritt, M.M.: The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naphthol. *J. Path.* 42: 441, 1936.
- Barry, A.L. & Feeney, K.L.: Two quick methods for Voges-Proskauer test. *Appl. Microbiol.* 15: 1138, 1967.
- Collins, E.B. & Speckman, R.A.: Evidence for cellular control in the synthesis of acetoin or  $\alpha$ -ketoisovaleric acid by microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 20: 805, 1974.
- Garibaldi, J.A. & Payne, H.G.: Production of acetoin and diacetyl by the genus *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* 20: 855, 1970.
- Harden, A.: On Voges and Proskauer's reaction for certain bacteria. *Proc. roy. Soc. B (London)*, 77: 424, 1905-06.
- Johansen, L., Bryn, K. & Størmer, F.C.: Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in *Aerobacter (Enterobacter) aerogenes*. *J. Bact.* 123: 1124, 1975.
- Juni, E. & Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle. *J. Bact.* 71: 425, 1956a.
- Juni, E. & Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. II. The synthesis of diacetylmethylcarbinol from diacetyl, a new diphosphothiamin catalyzed reaction. *J. Bact.* 72: 746, 1956b.
- Juni, E. & Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. III. A comparative study of 2,3-butanediol dehydrogenases from various microorganisms. *J. Bact.* 74: 757, 1957.
- Lee, S.M. & Drucker, D.B.: Analysis of acetoin and diacetyl in bacterial culture supernatants by gas-liquid chromatography. *J. clin. Microbiol.* 2: 162, 1975.
- Lopez, J.M., Thoms, B. & Rehbein, H.: Acetoin degradation in *Bacillus subtilis* by direct oxidative cleavage. *Eur. J. Biochem.* 57: 425, 1975.
- Mahler, H.R. & Cordes, E.H.: *Biological Chemistry*. Harper and Row, 1966, p. 436.
- O'Meara, R.A.Q.: A simple delicate and rapid method of detecting the formation of acetylmethylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrate. *J. Path. Bact.* 34: 401, 1931.
- Páčová, Z. & Kocur, M.: A rapid microtest for the detection of acetoin. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A* 223: 106, 1973.

- Paine, F.S.: The destruction of acetyl-methyl-carbinol by members of the colon-aerogenes group. *J. Bact.* 13: 269, 1927.
- Pickett, M.J. & Scott, M.L.: A medium for rapid VP tests. *Bact. Proc.* 1955, p. 110.
- Schubert, R.H.W.: Zur Taxonomie der Voges-Proskauer-negativen "hydrophila-ähnlichen" Aeromonaden. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 193: 482, 1964.
- Schubert, R.H.W. & Kexel, G.: Der Ausfall der Butandioldehydrogenase-Reaktion bei einigen Pseudomonadaceen und Vibrionen. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 194: 130, 1964.
- Smith, N., Gordon, R.E. & Clark, F.E.: Aerobic sporeforming bacteria. U.S. Dept. of Agriculture, Agriculture Monograph No. 16, 1952, p. 8.
- Speckman, R.A. & Collins, E.B.: Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bact.* 95: 174, 1968.
- Størmer, F.C.: 2,3-butanediol biosynthetic system in *Aerobacter aerogenes*. In: Wood, W.A. (Ed.): *Methods in Enzymology*, vol. 41. Carbohydrate Metabolism, part B. Acad. Press, New York, 1975, p. 518.
- Voges, O. & Proskauer, B.: Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicämie. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 28: 20, 1898.

## Kapitel 20

### Prøver for oxidativ syredannelse (Hugh & Leifson's medium)

Prøver der viser, om der af glukose og andre kulhydrater kan dannes syre fremkaldt ved at kulhydratet oxideres af luftens ilt.

#### 1. Historisk indledning

Det ældste kendte eksempel på en oxidativ syredannelse er sandsynligvis dannelsen af eddikesyre ud fra ætylalkohol. Processen må have været iagttaget lige så længe, som man har fremstillet alkoholiske drikke ved gæring. Det videnskabelige studium af eddikesyregæring, som det længe kaldtes, skønt det er en oxidativ proces, begyndte tidligt i 1800-tallet, da eddikesyre allerede var et betydningsfuldt industrielt produkt. Det vigtigste bidrag er Pasteur's "Memoire sur la fermentation acétique" fra 1864. Heraf fremgår det, at omdannelsen skyldtes levende organismer, eddikesyrebakterier (*Acetobacter* og *Acetomonas*), og ud fra kendskab til bakteriernes livsbetingelser var det muligt for Pasteur at hjælpe eddikesyreproducenterne i Frankrig til en mere rationel fremstillingsproces, ligesom han senere hjalp vinfabrikanterne og ølbryggerne.

Oxidativ syredannelse var ellers ikke et problem, som i særlig grad havde biokemikernes bevågenhed; de var i langt højere grad optaget af at klarlægge mekanismen ved fermentativ syredannelse. Der var dog enkelte, som tidligt beskæftigede sig med evnen til oxidativ syredannelse hos andre bakterier end eddikesyrebakterierne. Det gjaldt således Alsberg (1911), som viste, at en pseudomonade kunne danne glukonsyre af glukose; Sears & Gourley (1928), som viste, at *P. aeruginosa* kunne danne syre af pentoser ved en aerob proces og Pervozvanskii (1939), som undersøgte fluorescerende bakteriers evne til at oxidere kulhydrater, bl.a. glukose til glukonsyre.

Fra omkring 1940 afspejler litteraturen en stigende interesse for oxidativ syredannelse. Lockwood et al. (1941), Lockwood & Nelson (1946), Lockwood & Stodola (1946) og Stodola & Lockwood (1947) viste, at forskellige pseudomonader var i stand til af kulhydrater at danne de tilsvarende aldonsyrer, og Stanier (1947) viste, at *P. fluorescens* kunne danne eddikesyre af ætylalkohol ganske ligesom eddikesyrebakterier. På samme linie lå Sebek & Randles' (1952) påvisning af, at også pseudomonader kan oxidere polyalkoholer til de homologe sukkerarter.

Af stor biokemisk interesse var påvisningen af, at disse omdannelser skete uden forudgående fosforylering af substratmolekylerne, da det dermed stod klart, at der var tale om andre processer end dem, som indleder den fermentative syredannelse, hvor fosforyleringen er et obligat led i omdannelsen (Norris & Campbell 1949; Barker & Lipmann 1949; Stokes & Campbell 1951; Sebek & Randles 1952; Wood & Schwerdt 1953).

En sammenligning mellem kulhydratstofskiftet hos eddikesyrebakterier og pseudomonader er givet i en oversigtsartikel af de Ley (1960).

Det er Hugh & Leifson's (1953) fortjeneste at have gjort opmærksom på den diagnostiske gevinst, der ligger i at skelne mellem fermentativ og oxidativ syredannelse, og at have angivet en metode, som nemt tillader denne adskillelse. I historisk sammenhæng er det interessant at bemærke, at Conn & Hucker (1920) ved at anbefale brug af en skrå-agar til syrepåvisning fremfor et flydende medium allerede var opmærksomme på nogle af de fordele, som Hugh & Leifson's halvflydende agarmedium har, især det forhold at syren for en tid holdes fikseret på dannelsesstedet, så der kan skelnes mellem, om syredannelsen begynder i klumpen (fermentativt) eller i den flade del (oxidativt) af substratet.

## 2. Biokemisk baggrund

Monosakkarider kan omdannes til syre enten ved at aldehydgruppen (CHO) iltes til en carboxylgruppe (COOH) – i dette tilfælde taler man om aldonsyrer – eller ved at den primære alkoholgruppe (CHOH) iltes til en carboxylgruppe (COOH), hvorved man får uronsyrer. I begge tilfælde er der en lakton som intermediærprodukt. Strikt aerobe bakterier som fx. eddikesyrebakterier og pseudomonader har enzymer (dehydrogenaser), som direkte kan udføre disse omdannelser, og resultatet er en række forskellige syrer med en struktur svarende til udgangsmaterialets, bortset fra syregrupperne. Af aldonsyrer forekommer bl.a. arabonsyre, xylonsyre, glukonsyre, mannosyre, laktobionsyre, maltobionsyre, melibionsyre og cellobionsyre. Af uronsyrer kan nævnes glukuronsyre, galakturonsyre og mannuronsyre. Det ser ud til, at dehydrogenaserne er mere eller mindre substratspecifikke. Et eksempel på en meget uspecifik dehydrogenase findes i *Acinetobacter*, der oxidativt danner syre af alle aldoser, således at brugen af en lang sukkerrække ikke giver flere oplysninger end glukoseglasset alene. Blandt pseudomonaderne synes dehydrogenaserne at være mere specifikke, så syremønstret kan benyttes i differen-

tieringen af de forskellige arter. Visse af disse dehydrogenaser er adaptive enzymer.

Nogle af de strikt aerobe bakterier har også enzymer, som omdanner primære alkoholer til monosakkarider, fx. kan *P. fluorescens* omdanne mannitol og sorbitol til fruktose, der efter yderligere omdannelse til glukose oxideres til glukonsyre, og dette evt. videre til 2-ketoglukonsyre, som enten akkumuleres eller metaboliseres videre (Sebek & Randles 1952).

På denne måde vil man derfor også med alkoholer som substrat kunne få oxidativ syredannelse. At det samme er tilfældet med disakkarider, trisakkarider og polysakkarider, skyldes naturligvis, at mange bakterier har glykosidaser, som hydrolyserer dem til monosakkarider, der derefter oxideres som beskrevet.

Umiddelbart synes oxidativ syredannelse at måtte betegnes som incidentelle enzymatiske reaktioner, forstået som reaktioner der hverken fører til energiproduktion eller assimilation af substratbestanddele, men i nogle tilfælde kan de dannede syrer før eller senere kanaliseres ind i andre reaktionskæder og derefter udnyttes i cellestofskiftet. Da således syreophobningen ved oxidativ syredannelse ikke altid er permanent som den er ved fermentativ syredannelse, vil det kunne ske, at et surt indikatoromslag forsvinder igen.

Princippet i anvendelse af Hugh & Leifson's O/F medier er den samtidige anvendelse af to glas, det ene "åbent", dvs. med substratoverfladen i direkte kontakt med den omgivende atmosfæres ilt, det andet "lukket", dvs. dækket af et lag smeltet paraffin eller andet materiale, som danner en barriere mellem substratoverfladen og luftens ilt. I det lukkede glas vil der kun kunne foregå anaerobe processer — i hvert fald så snart den smule ilt der findes i substratet er opbrugt — og det vil sige, at kun fermentativ, men ikke oxidativ syredannelse vil kunne forekomme. I det åbne glas derimod vil der kunne foregå både aerobe og anaerobe processer, idet man kan regne med, at ilt diffusionen gennem substratsøjlen er så langsom, at der nedadtil i glasset hurtigt vil være så lav en iltkoncentration, at forholdene til praktiske formål kan betegnes som anaerobe, mens ilttilførslen i substratets øverste lag er så rigelig, at alle aerobe processer vil kunne foregå her. Naturligvis forudsætter denne differentiering, at substratsøjlen er tilstrækkelig høj. I det åbne glas vil man altså kunne se både fermentativ og oxidativ syredannelse, men de vil i begyndelsen kunne skelnes ved at fermentativ syredannelse viser sig som et indikatoromslag begrænset til substratets nederste del og oxidativ syredannelse som et indikatoromslag begrænset til substratets øverste del. Denne topografisk forskellige lokalisering af indikatoromslaget er også betinget af, at i det halvflydende medium vil dannet syre kun langsomt diffundere væk fra dannelsesstedet, mens syren i et flydende substrat hurtigt vil blive fordelt

i hele substratsøjlen på grund af konvektionsstrømme. Lokaliseringen af syredannelsen betyder desuden, at den koncentration som giver indikatoromslag nås hurtigere, end hvis syremængden var fordelt i hele glasset. Ved at holde peptonkoncentrationen så lavt som på 0,1% opnåede Hugh & Leifson, at basedannelse som følge af oxidativ deaminering af aminosyrer i toppen af det åbne glas er forholdsvis ringe, hvorved neutralisering af den dannede syre så vidt muligt undgås. Andre (Otto & Pickett 1976) har med tilsyneladende held brugt en så lav peptonkoncentration som 0,02%. I Hugh & Leifson's medier er sukkerkoncentrationen 1%, mens Otto & Pickett anbefaler 2%. Til påvisning af oxidativ syredannelse fra laktose med *Acinetobacter* har det været anbefalet at bruge helt op til 5% og 10% laktose. Baggrunden herfor må enten være, at man forventer permeabilitetsvanskeligheder (Cook & Fewson 1973), eller at der generelt er en større tendens til syreophobning, når sukkerkoncentrationen er høj (Stanier et al. 1963). Der er altså noget, som tyder på, at pepton- og kulhydratkoncentrationen i Hugh & Leifson's åbne glas, som vi bruger det, med fordel kunne reguleres til et henholdsvis lavere og højere niveau.

### 3. Valg af metode

Den mest aktuelle overvejelse er, om man strengt skal holde sig til Hugh & Leifson's to glas, eller om man kan opnå de samme resultater ved alene at bruge det åbne glas. Fordelen ved kun at bruge eet glas er indlysende både økonomisk og tidsmæssigt, og fordelene ved det lukkede glas er jo ofte kun en bekræftelse på, hvad der er observeret i det åbne. I litteraturen har der været stillet forslag om at nøjes med det åbne glas (Porres & Stanyon 1973; Brown 1974), men de udførte sammenligninger, der af forfatterne selv tages til indtægt for deres forslag, besvarer ikke alle spørgsmål tilfredsstillende.

Vi har i diagnoseafdelingen fulgt den praksis at lade væksten i et glas med halvflydende bouillonagar uden sukker bestemme, hvilke sukkerglas der skal anvendes, således at fakultativt anaerobe bakterier udsås i det flydende forgæringsmedium og strikt aerobe i Hugh & Leifson's åbne glas. Efter en sortering på denne måde synes der ikke at være tvivl om, at man til de strikt aerobe kan nøjes med det åbne Hugh & Leifson glas. Da en sådan fremgangsmåde imidlertid sinker udsåningen i sukkerrækkerne 1 døgn, er det et nærliggende spørgsmål, om man ikke uden forudgående sortering kunne nøjes med at udså alle stammer i en række af åbne Hugh & Leifson glas. Men her er det vores erfaring, at en del fakultativt anaerobe bakterier giver uklare resultater. Det skyldes, dels at syredannelsen i nogle tilfælde sker så hurtigt og er så stærk, at man ved den sædvanlige aflæsning dagen efter har indikatoromslag

i hele søjlen, hvilket i hvert fald teoretisk udelukker en skelnen mellem fermentativ og oxidativ syredannelse, dels at man øjensynlig med nogle stammer får fermentativ syredannelse i nogle sukkerarter og oxidativ syredannelse i andre. Dette sidste er et interessant problem, som fortjener nærmere undersøgelse, men indtil det er sket, vil vi fraråde at nøjes med Hugh & Leifson's åbne glas som eneste substrat til al påvisning af syredannelse, således som Otto & Pickett (1976) anbefaler.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Hugh & Leifson's metode i den udformning der anvendes på Serumintitutttet Substrat*

Pepton Orthana	0,19%
NaCl	0,48%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03%
Bromthymolblåt (1:500)	11,5 ml/l
Sukkerart	1,0%
Agar	0,36%

i demineraliseret ledningsvand.

pH indstilles med NaOH til 7,2 og er efter autoklaveringen 6,9.

Samme substrat uden sukker anvendes som kontrol.

Substratet aftappes i reagensglas (155 x 14/15 mm) i 4,5 cm høje lag med paraffineret vatprop. Substratafdelingen aftapper kun "åbne" glas. Hvis der er brug for "lukkede" glas, kan man rekvirere steril paraffinolie og med Pasteurpipette anbringe et 2-3 cm højt olielag over substratsøjlen.

#### *Udførelse*

Som inoculum anvendes bakteriemasse fra en ikke over 24 timer gammel renkultur på et sukkerfrit plademedium. Tilsåning sker med rigelig kulturmasse på en lang, lige platinnål, der stikkes ned midt i søjlen lige til glassets bund og trækkes lige op igen. Flere glas kan tilsås i serie, men som regel er det nødvendigt at tage mere kultur på nålen nogle gange for at komme hele rækken igennem. Inkuberingen sker i termostat ved 30 eller 35°C; resultaterne på Serumintitutttets diagnoseskema for pseudomonader er efter inkubering ved 30°C.

*Aflæsning*

Glassene aflæses første og andet døgn efter inokuleringen, og glas uden syredannelse observeres yderligere 5 dage, medmindre diagnosen allerede er stillet. Før aflæsning af indikatoromslaget sikrer man sig, at der er kommet vækst visende sig som en vækstskive øverst i glasset, når det drejer sig om strikt aerobe bakterier, og som synlig vækst langs hele inokulationsstikket, hvis det er en fakultativ anaerob bakterie.

Ved aflæsning af de sukkerholdige glas bør man altid sammenligne med kontrolglasset uden sukker.

Ved aflæsning af indikatoromslaget bemærkes to forhold: 1) ændring i indikatorfarven og 2) om ændringen er sket opadtil eller nedadtil i substratsøjlen. Indikatorfarven bør angives ved hjælp af samme talskala, som er omtalt under forgæringsprøver, dvs.:

blå	= 0
grønblå	= 1 = uændret
grøn	= 2
grøngul	= 3
gul	= 4

Med strikt aerobe bakterier er der i begyndelsen kun farveændring af et få millimeter tykt lag øverst i glasset, men det er farven i denne smalle zone, det drejer sig om at fastslå. Med fakultativt anaerobe bakterier får man et farveomslag, som begynder nederst i glasset, men som regel er det her en større del af søjlen, der viser omslag, ofte  $\frac{1}{3}$  eller  $\frac{1}{2}$  af søjlens højde. Det skyldes, at de syrer der dannes fermentativt er stærkere syrer end dem, der dannes oxidativt. Ved fermentativ syredannelse bør prøven laves om i flydende forgæringssubstrat. Hvis der er indikatoromslag øverst i glasset, angives det med signaturen "ox" (= oxidativ); findes omslaget kun nederst i glasset, bruges signaturen "f" eller "ferm" (= fermentativ), og efter signaturen angives det tal, som svarer til indikatorfarven i det pågældende område. Hvis syredannelsens lokalisering er ens i alle glas, er det tilstrækkeligt at benytte signaturene "ox" og "f" ud for glukoseglasset. Hvis der i samme glas er syre både foroven og forneden, eller hvis der er forskel i lokaliseringen afhængig af sukkerarten i glasset, må dette beskrives i arbejdsbogen.

Ved fortsat inkubering og dermed følgende fortsat syredannelse vil området med ændret indikatorfarve tiltage i udstrækning og kan ved oxidativ syredannelse komme til at omfatte glassets øverste fjerdedel eller mere, og ved fermentativ syredannelse hele glasset. Nedadtil eller opadtil vil farveom-

slaget som regel ikke være skarpt afgrænset, dvs. flere af indikatorskalaens styrketrin vil være repræsenteret, men ved aflæsningen angiver man altid det maximale omslag. Hvis fx. både styrke 2, 3 og 4 kan ses inden for omslagszonen, skal omslaget angives som værende af styrke 4.

I et Hugh & Leifson glas, som er blevet gult i hele søjlen, kan man ikke længere afgøre, om syredannelsen har været oxidativ eller fermentativ – denne afgørelse afhænger af, hvordan glasset så ud på et tidligere tidspunkt, og derfor er en præcis beskrivelse af de tidlige stadier absolut nødvendig.

Med strikt aerobe bakterier, som øverst i glasset danner ammoniak af det tilstedeværende pepton, vil den første ændring i indikatoren ofte være et forbigående omslag til blå, inden syredannelsen gør sig gældende. Dette bør registreres, men har ikke større betydning ved den endelige vurdering.

### *Fortolkning*

Hvis der er indikatoromslag begrænset til det øverste lag i et åbent Hugh & Leifson glas med en bestemt sukkerart, og hvis farven er gul eller grøngul, vil man umiddelbart fortolke dette som udtryk for, at bakterierne har evne til oxidativ syredannelse ud fra den pågældende sukkerart.

Da indikatoren vil adsorberes til cellernes sure overflade, kan man undertiden iagttage gulfarvning af cellelaget alene, uden omslag i den cellefri del af substratsøjlen. Et så begrænset omslag regnes ikke som positivt. Ligeledes må man undgå at registrere gult pigmenterede kulturer som positive.

Ofte er strikt aerobe bakterier svage syredannere, og det kan medføre, når der samtidig dannes ammoniak, at indikatoren slet ikke slår om eller kun viser omslag af styrke 2. Da kontrolglasset uden sukker i et sådant tilfælde efterhånden bliver helt blå opadtil, betyder det, at også sukkerglas med indikatorfarve 1 og 2 er udtryk for oxidativ syredannelse. Dette udnyttes bl.a. ved undersøgelse af *Agrobacterium*, hvor alle sukkerholdige glas, der *ikke* er dybtblå i toppen efter 5 døgn forløb, registreres som positive.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige ud over de for alt arbejde med patogene bakterier gældende.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med oxidativ syredannelse

Oxidativ syredannelse forekommer helt dominerende hos strikt aerobe bakterier, og man kan i øjeblikket ikke sige noget sikkert om, blandt hvilke fakultativt anaerobe bakterier man kan vente at træffe denne egenskab, eller med hvilken hyppighed den optræder. En gyldig fortegnelse kan derfor ikke

laves. De grupper af strikt aerobe bakterier i det klinisk-bakteriologiske laboratorium, hvor oxidativ syredannelse med sikkerhed vides at forekomme, er:

*Pseudomonas*: visse species

*Agrobacterium*

*Cytophaga*

*Acinetobacter*: visse biotyper

Desuden bør stammer med den foreløbige diagnose *Alcaligenes*, *Moraxella* og *Flavobacterium* undersøges i en Hugh & Leifson række.

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Hvor syredannelsen er veludtalt, er prøven værdifuld, fordi den bidrager til artsdifferentieringen af strikt aerobe gramnegative stave på samme måde, som den fermentative syredannelse bidrager til artsdifferentiering blandt fakultativt anaerobe gramnegative stave. Foreløbig gælder dette særligt arter inden for slægten *Pseudomonas*, hvor oxidativ syrepåvisning delvis kan træde i stedet for den mere tidkrævende undersøgelse af, hvilke kulstof- og energikilder der kan udnyttes. Også ved differentiering af arter af *Agrobacterium* har vi i diagnoseafdelingen fundet prøven værdifuld, men på grund af den svage syredannelse gælder der som tidligere nævnt særlige regler for fortolkningen. Adskillelsen mellem stammer med og uden oxidativ syredannelse i slægten *Acinetobacter* kan have epidemiologisk betydning, men tillægges ikke i øjeblikket taxonomisk værdi, idet både biotyper med og uden syredannelse regnes til samme species.

### 8. Referencer

- Alsberg, C.L.: The formation of d-gluconic acid by *Bacterium savastanoi* Smith. J. biol. Chem. 9: 1, 1911.
- Barker, H.A. & Lipmann, F.: The role of phosphate in the metabolism of *Propionibacterium pentosaceum*. J. biol. Chem. 179: 247, 1949.
- Brown, W.J.: One-tube test for determining oxidative or fermentative metabolism of bacteria. Appl. Microbiol. 27: 811, 1974.
- Conn, H.J. & Hucker, G.J.: The use of agar slants in detecting fermentation. J. Bact. 5: 433, 1920.
- Cook, A.M. & Fewson, C.A.: Role of carbohydrates in the metabolism of *Acinetobacter calcoaceticus*. Biochim. biophys. Acta 320: 214, 1973.
- Hugh, R. & Leifson, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J. Bact. 66: 24, 1953.

- Ley, J. de: Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related micro-organisms. *J. appl. Bact.* 23: 400, 1960.
- Lockwood, L.B., Tabenkin, B. & Ward, G.E.: The production of gluconic acid and 2-ketogluconic acid from glucose by species of *Pseudomonas* and *Phytomonas*. *J. Bact.* 42: 51, 1941.
- Lockwood, L.B. & Nelson, G.E.N.: The oxidation of pentoses by *Pseudomonas*. *J. Bact.* 52: 581, 1946.
- Lockwood, L.B. & Stodola, F.H.: Preliminary studies on the production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by *Pseudomonas fluorescens*. *J. biol. Chem.* 164: 81, 1946.
- Norris, F.C. & Campbell, J.J.R.: The intermediate metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. III. The application of paper chromatography to the identification of gluconic and 2-ketogluconic acids, intermediates in glucose oxidation. *Canad. J. Res.* C27: 253, 1949.
- Otto, L.A. & Pickett, M.J.: Rapid method for identification of Gram-negative, nonfermentative bacilli. *J. clin. Microbiol.* 3: 566, 1976.
- Pasteur, L.: Memoire sur la fermentation acétique. *Annales, scientifiques de l'École Normale supérieure*, 7: 113, 1864. (Oeuvres de Pasteur, Tome III: Études sur le vinaigre et sur le vin, p. 23. Masson et Cie, Paris 1924).
- Pervozvanskii, V.V.: Formation of gluconic acid during the oxidation of glucose by bacteria. *Chemical Abstracts* 34: 7321, 1940.
- Porres, J.M. & Stanyon, R.E.: One-tube oxidation-fermentation test. *Amer. J. clin. Path.* 61: 368, 1974.
- Sears, H.J. & Gourley, M.F.: Studies in the carbohydrate metabolism of *Ps. aeruginosa* (*B. pyocyaneus*). *J. Bact.* 15: 357, 1928.
- Sebek, O.K. & Randles, C.I.: The oxidative dissimilation of mannitol and sorbitol by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bact.* 63: 693, 1952.
- Stanier, R.Y.: Acetic acid production from ethanol by fluorescent pseudomonads. *J. Bact.* 54: 191, 1947.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M. & Adelberg, E.A.: *General Microbiology*, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 1963, p. 268.
- Stodola, F.H. & Lockwood, L.B.: The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas*. *J. biol. Chem.* 171: 213, 1947.
- Stokes, F.N. & Campbell, J.J.R.: The oxidation of glucose and gluconic acid by dried cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem.* 30: 121, 1951.
- Wood, W.A. & Schwerdt, R.F.: Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens* I. The mechanism of glucose and gluconate oxidation. *J. biol. Chem.* 201: 501, 1953.

## Kapitel 21

### ONPG-prøven og andre glukosidaseprøver

Prøver, der påviser tilstedeværelse af glykosidaser, dvs. hydrolytiske enzymer der spalter glykosidbindinger dels i naturligt forekommende oligo- og polysakkarider, dels i syntetiske, kromogene enzymsubstrater, hvorved en farvet forbindelse frigøres. I dette afsnit omtales først og fremmest ONPG-prøven. Angående glykosidaser, der spalter polysakkarider, henvises til kapitlerne 23, 24 og 25.

#### 1. Historisk indledning

Selv om mange havde vist, at der fandtes særlige enzymer, glykosidaser, som spalter oligo- og polysakkarider fortrinsvis til monosakkarider som første trin i disse kulhydraters fuldstændige nedbrydning, manglede man indtil 1950 en tilstrækkelig simpel undersøgelsesmetode, der kunne bruges i bakteriologien til direkte glykosidasepåvisning. Takket være ældre fysiske, kemiske og biokemiske metoder havde man dog et ganske godt kendskab til glykosidaser (se Pigman's oversigt 1944), og man havde ved disse undersøgelser i stor udstrækning anvendt syntetisk fremstillede glykosider, hvor et monosakkaridmolekyle via en glykosidbinding var koblet til andre molekyler, som fx. fenoler og nitrofenoler.

Huggins & Smith havde i 1947 anvendt et såkaldt kromogent substrat, p-nitrofenylsulfat, til enzymmålinger, og det fik i 1950 Lederberg til at prøve, om et syntetisk glykosid, o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid (= ONPG) kunne anvendes til påvisning af galaktosidaseaktivitet i en colistamme. ONPG er selv farveløst, men efter spaltning af glykosidbindingen frigøres o-nitrofenyl, som i alkalisk miljø er et gult farvestof, hvis koncentration kan måles i et spektrofotometer.

Lederbergs metode til påvisning af  $\beta$ -galaktosidase fik overordentlig stor betydning både videnskabeligt og praktisk.

Monod og andre ved Institut Pasteur i Paris udnyttede kort efter metoden til grundlæggende undersøgelser over enzyminduktion og permeaser, og disse undersøgelser dannede senere grundlag for opdagelse af repressormekanismen og allosteriske enzymer (om Monod's indsats, se Stanier 1977).

Den praktiske anvendelse af ONPG-prøven i bakteriologisk diagnostik stammer også fra Institut Pasteur, hvor den i 1962 indførtes af Le Minor og Ben Hamida og desuden anvendtes af Mollaret & Le Minor (1962), Leclerc (1962) og Szturm-Rubinstein & Piéchaud (1962, 1963). De anbefalede især prøven ved undersøgelse af *Enterobacteriaceae*, fordi den gav et hurtigt positivt resultat med mange af de stammer, der bliver sent positive i et laktoseforgæringsglas. Disse erfaringer blev hurtigt bekræftet af andre (Bulow 1964a, b; Lapage & Jayaraman 1964 m.fl.), og i dag indgår ONPG-prøven i de fleste diagnostiske laboratoriers repertoire. Prøven bør ikke alene betragtes som en hurtigere metode til at opnå samme slags resultat, som man opnår med et laktoseforgæringsglas, men også som et supplement til forgæringsglasset, da resultaterne med de to prøver med nogle stammer falder forskelligt ud og derved giver ekstra oplysninger (Bulow 1964a, b; Lapage et al. 1973).

Le Minor et al. (1977) har rokket ved den hidtidige opfattelse, at en positiv ONPG-prøve altid kan fortolkes som tilstedeværelse af  $\beta$ -galaktosidase. De viste, at alle undersøgte stammer af visse arter og slægter (fx. *Serratia marcescens*, *Levinea amalonatica*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Aeromonas* og *Vibrio*), som giver en positiv ONPG-prøve, ikke er i stand til at spalte laktose under frigørelse af glukose. Resultatet er overraskende og endnu ikke bekræftet. Le Minor et al. foreslår, at ONPG-positive stammer skal deles i  $\beta$ -gal<sup>+</sup> og  $\beta$ -gal<sup>-</sup> stammer, men deres metode til at skelne mellem de to grupper er ikke så simpel, at den er egnet til rutinebrug.

Blandt de af Huggins og medarbejdere beskrevne kromogene enzymsubstrater var også fenolphthalein-glukuronsyre til påvisning af glukuronidase (Talalay et al. 1946). Det blev hurtigt udnyttet til undersøgelse af glukuronidase forekomst hos streptokokker (Robinson et al. 1952; Jacox 1953; Williams 1954), og det blev vist, at visse serotyper inden for gruppe A streptokokker særlig hyppigt producerer glukuronidase. Senere er det vist, at de fleste gruppe B streptokokker også indeholder  $\beta$ -glukuronidase, mens enzymet mangler i gruppe D streptokokker (Röd et al. 1973).

Forskellige typer syntetisk fremstillede kromogene enzymsubstrater er efterhånden blevet kommercielt tilgængelige i stort antal. Hidtil har de især været anvendt af biokemikere, som søger at klarlægge glukosidasernes biokemi (se fx. Dey & Pridham (1971) om  $\alpha$ -galaktosidase) og kun i mindre omfang af praktisk arbejdende bakteriologer.

Brisou et al. (1972) har dog undersøgt ca. 1100 stammer af *Enterobacteriaceae* for tilstedeværelse af  $\beta$ -xylosidase ved hjælp af orto-nitrofenyl- $\beta$ -D-xylopyranosid og para-nitrofenyl- $\beta$ -D-xylopyranosid og fundet, at positive reaktioner fortrinsvis ses hos stammer i slægterne *Klebsiella* og *Enterobacter* og i arterne *Yersinia pestis* og *Yersinia pseudotuberculosis*.

Kilian & Bülow (1976) har undersøgt godt 600 stammer af *Enterobacteriaceae* og *Vibrionaceae* over for 5 forskellige nitrofenylglukopyranosider med henblik på påvisning af  $\alpha$ -glukosidase,  $\beta$ -glukosidase,  $\beta$ -glukuronidase,  $\beta$ -xylosidase og  $\alpha$ -fucosidase. Af resultaterne skal særlig fremhæves, at  $\beta$ -glukuronidase blandt disse gramnegative stave udelukkende fandtes i slægterne *Escherichia* og *Shigella*, og at et flertal af stammerne i disse slægter var positive.

Kilian (1978) har også med held anvendt et større antal kromogene enzym-substrater til differentiering blandt bakterier i slægten *Actinomycetaceae*.

## 2. Biokemisk baggrund

Oligosakkarider og polysakkarider består som tidligere nævnt af kæder af monosakkarider forbundet ved glykosidbindinger. Det er et fællestræk ved glykosidbindinger, at et kulstofatom fra hvert af de to ringformede monosakkarider er forbundet via et iltatom, men bindingerne er alligevel forskellige, bestemt af hvilke af kulstofatomerne i ringene, der indgår, og af monosakkaridernes detailstruktur, herunder også stereo-isomere forskelle.

Fællesbetegnelsen for disse forbindelser indeholdende glykosidbindinger er glykosider, men hvor carbonylgruppen stammer fra glukose bruges undertiden betegnelsen glukosider.

Mange bakterier danner enzymer, glykosidaser, som kan spalte forskellige glykosidbindinger, og påvisning af de forskellige glykosidaser, som findes i en bestemt bakterie, er derfor med til at karakterisere den og kan udnyttes i klassifikation og identifikation.

En indirekte påvisning af glykosidaser sker i de klassiske forgæringsprøver, idet påvisning af fermentativ syredannelse ud fra oligosakkarider og polysakkarider forudsætter, at der først er sket en nedbrydning til monosakkarider netop ved hjælp af glykosidaser. Når fx. en bestemt bakterie er i stand til fermentativt at danne syre af laktose, så kan man deraf udlede, at bakterien er i stand til at danne den glukosidase, som spaltes glukosidbindingen i laktose, så glukosemolekylet og galaktosemolekylet frigøres. Uden denne indledende spaltning af laktosen til monosakkarider vil bakterien nemlig ikke være i stand til fermentativ syredannelse (derimod ville der uden medvirken af glykosidasen kunne ske en oxidativ syredannelse, hvis laktosen blev iltet direkte til laktobionsyre). Den specielle glykosidase, der her er tale om, kaldtes tidligere laktase, men efter nyere terminologi kaldes den  $\beta$ -galaktosidase.

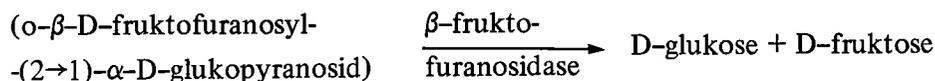
Hvis formålet alene er at påvise, om en bestemt glykosidase, fx.  $\beta$ -galaktosidase, er til stede, kan man gå en anden mere direkte vej og benytte et kunstigt fremstillet stof, der indeholder samme glykosidbinding som laktose.

Hvis man kemisk kobler et galaktosemolekyle sammen med et molekyle af orto-nitrofenyl, har man et stof: ONPG eller *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid, der netop indeholder samme glykosidbinding som laktose, og mens det uspaltede ONPG er farveløst, vil en spaltning af glykosidbindingen frigøre *o*-nitrofenyl, som er et gult stof, således at spaltningen direkte kan observeres som et farveomslag i opløsningen.

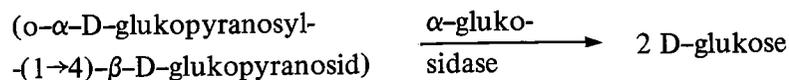
Analogt med fremstillingen af ONPG har man fremstillet andre syntetiske glykosider, der indeholder ganske bestemte glykosidbindinger, og ved hjælp af dem kan man undersøge for tilstedeværelse af en række forskellige glykosidaser.

Stort set er de forskellige glykosidaser specifikke, dvs. de spalter fortrinsvis en bestemt glykosidbinding, men da visse glykosidbindinger molekulært set ligner hinanden meget, kan i nogle tilfælde samme enzym spalte flere nærtstående forbindelser, omend med forskellig intensitet. Virkningen af nogle typiske glykosidaser fremgår af de følgende ligninger:

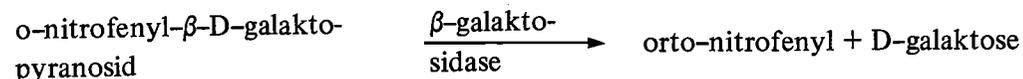
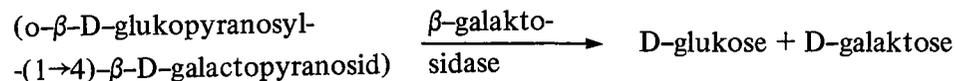
Sakkarose + H<sub>2</sub>O



Maltose + H<sub>2</sub>O



Laktose + H<sub>2</sub>O



Om nogle glykosidaser, fx.  $\beta$ -galaktosidase, vides det med sikkerhed, at de er inducerbare, og rimeligvis gælder det alle eller flertallet. Induktionen kan fremkaldes af mange naturlige og syntetiske forbindelser, som indeholder den til glykosidasen svarende glykosidbinding. Samtidig med glykosidasein-

duktionen vil der normalt ske en induktion af den permease, som er nødvendig for aktivt at transportere glykosidet ind i cellen. Mutationer i det gen, der koder for permeaseenzymet er ikke sjældne og medfører ofte, at et bestemt glykosid ikke metaboliseres til trods for at glykosidasen findes i cellen. Dette er en hyppig årsag til afvigelser i "normale" forgæringsmønstre og til at der optræder negative ONPG-prøver hos stammer fra en art, der plejer at være positiv.

De enkelte glykosidaser har et karakteristisk pH optimum; for de af Kilian & Bülow (1976) undersøgte lå dette mellem 7,5 og 8,5, men andre glykosidaser har et andet optimum. Ved brug af syntetiske nitrofenyl-glykopyranosider skal opløsningens pH være alkalisk, også af hensyn til at dette er en forudsætning for at få nitrofenylets gule farve frem. Kilian & Bülow fandt, at Tris-buffer virkede hæmmende på nogle glykosidaser.

### 3. Valg af metode

ONPG-prøven til påvisning af  $\beta$ -galaktosidase er foreløbig den bedst indarbejdede glykosidaseprøve, hvilket til dels hænger sammen med den traditionelle betydning laktoseforgæringsprøver har haft i diagnostisk bakteriologi. Flest oplysninger får man ved samtidig brug af begge prøver, men er der kun mulighed for at benytte een prøve, vil ONPG-prøven alene være bedre end laktoseglasset alene. ONPG-prøven vil her blive beskrevet i den udformning, hvori den har været anvendt i diagnoseafdelingen siden 1963 (Bülow 1964a, b).

Teoretisk set er der mulighed for i et undersøgelsesprogram at inkludere mange andre glykosidaseprøver, da der findes et stort antal forskellige bakterielle glykosidaser og et stort udvalg af kromogene substrater, men foreløbig er den praktiske betydning af anvendelsen af andre glykosidaseprøver end ONPG-prøven kun sparsomt undersøgt. De hidtidige erfaringer tyder på, at ONPX-prøven til påvisning af  $\beta$ -xylosidase og PGUA-prøven til påvisning af  $\beta$ -glukuronidase ville være af værdi (Brisou et al. 1972; Kilian & Bülow 1976). Detailler i udførelsen af disse to prøver vil dog ikke blive nærmere beskrevet i det følgende, da fremgangsmåden er som ved ONPG-prøven.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*ONPG-prøven* ( $\beta$ -galaktosidasepåvisning)

*Enzymsubstratet*

ONPG, krystallinsk	0,48 g (0,2%)
Buffer	30 ml
Dest. vand	210 ml
<i>Buffer:</i>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O: 13,8 g i 80 ml dest. vand
	NaOH 5 N til pH 7,0: ca. 15 ml
	Dest. vand til ialt 100 ml

Aftappes i 0,5 ml portioner i Widalglas (70 x 10/11 mm) med gummiprop. Mærkes "ONPG". (I Bülow's substratbeskrivelser er ONPG-koncentrationen 0,4%).

*Inoculum:* Almindeligvis tages kulturmassen fra en døgngammel renkultur fra en bouillonagar- eller blodagarplade, da erfaringen har vist, at den nødvendige induktion i de fleste tilfælde allerede er sket i sådanne kulturer, formentlig ved hjælp af ukendte galaktosider i disse substrater. I sjældne tilfælde kan et negativt prøveudfald dog ændres til et positivt, hvis inoculum tages fra et substrat indeholdende fra 1 til 10% laktose. Pladerne inkuberes normalt ved 35°C, når det drejer sig om *Enterobacteriaceae*, men i sjældne tilfælde (fx. visse *Hafnia*-stammer) giver en lavere inkubationstemperatur (fx. 22°C) positivt prøveudfald, hvor inkubering ved 35°C giver negativt resultat.

*Udførelse:* 1 eller 2 øskenfulde kulturmasse suspenderes til homogenitet i substratopløsningen. Gummiproppen sættes i, og glasset anbringes ved 35°C i termostat eller vandbad. Der anvendes *ikke* toluoltilsætning til suspensionen.

*Aflæsning:* Ved aflæsningen observeres for fremkomst af en gul farve i reaktionsglasset. En første aflæsning kan ske efter 20 minutter, og alle glas, som på dette tidspunkt er gule, kan straks regnes som positive. Ofte er det praktisk at udskyde aflæsningen til efter 3 timers inkubation og også i dette tilfælde regnes alle gule glas som positive. Glas, der er farveløse efter 3 timer, kan til praktiske formål regnes som negative, men erfaringen viser, at hvis de aflæses efter ca. 20 timer, vil enkelte vise en svag gul farve. Denne sent fremkomne, svage gule farve er formentlig hyppigst udtryk for en uspecifik spaltning af substratet, men må også kunne skyldes en svag  $\beta$ -galaktosidaseaktivitet, og den kan være anledning til fornyet undersøgelse efter induktion og/eller ved lavere væksttemperatur.

*Fortolkning:* En kraftig gul farve tages altid som udtryk for tilstedeværelse af  $\beta$ -galaktosidase. Hvis suspensionen i forvejen er gul på grund af gule pigmenter i kulturen, må prøven enten opgives eller udføres med et glas med en varmeinaktiveret suspension som kontrol, Fortolkningen af sene og svage farveomslag er som ovenfor nævnt diskutabel (se også Szturm-Rubinstein & Piéchaud 1963).

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

De sædvanlige ved omgang med potentielt patogene bakterier. Særlig ved fremstilling af suspensionerne bør man undgå, at bakteriemasse bliver hængende på glassets rand, og undgå at skabe aerosol ved homogeniseringen.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Listen er udarbejdet på grundlag af speciallitteraturen, da Bergey's Manual ofte mangler oplysninger. Mange grupper af bakterier har hidtil ikke været undersøgt.

*Campylobacter:* en enkelt stamme af *C. fetus*

*Pseudomonadeceae:* få stammer af *P. aeruginosa* og *P. cepacia*

*Escherichia coli*

*Citrobacter:* de fleste stammer; induktion med høj laktosekoncentration undertiden nødvendig.

*Salmonella:* subgenus III (*Arizona*): næsten alle stammer

*Shigella:* *Sh. dysenteriae* serotype 1; *Sh. sonnei*; de fleste stammer

*Klebsiella:* alle undtagen *K. rhinoscleromatis*

*Enterobacter*

*Hafnia:* de fleste stammer; vækst ved 22°C undertiden nødvendig.

*Serratia*

*Yersinia:* alle undtagen nogle stammer af *Y. enterocolitica*

*Erwinia herbicola*

*Vibrio:* alle arter undtagen *V. parahaemolyticus* og *V. alginolyticus*

*Aeromonas*

*Plesiomonas*

*Chromobacterium lividum:* nogle stammer

*Flavobacterium meningosepticum*

*Haemophilus:* nogle species har nogle positive stammer

*Pasteurella:* få stammer af alle species undtagen *P. ureae* som er negativ

*Actinobacillus:* alle species undtagen *A. actinomycetem-comitans*

*Neisseria lactamica*

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven er meget hurtig; allerede efter 3 timer har man et pålideligt resultat, uanset om udfaldet er positivt eller negativt.

Prøven er mere følsom end laktoseforgæringsglasset til påvisning af  $\beta$ -galaktosidase. Det betyder, at mange sent laktose-positive stammer og en del laktose-negative inden for slægten *Enterobacteriaceae* hurtigt kan afsløres som  $\beta$ -galaktosidase-positive. En følge af dette er, at i diagnoseskemaet har mange "d" symboler for laktoseforgæring kunnet erstattes med "+" symboler for  $\beta$ -galaktosidase, hvorved identifikationen er blevet mere sikker.

De to prøver supplerer hinanden i den forstand, at en negativ ONPG-prøve i forbindelse med syredannelse i et Hugh & Leifson O/F glas støtter tolkningen af syredannelsen som oxidativ (laktobionsyre).

Værdien af ONPG-prøven ved differentiering mellem arter og slægter er indtil videre størst inden for familien *Enterobacteriaceae*. Der henvises til diagnoseskemaerne.

## 8. Referencer

- Brisou, B., Richard, C. & Lenriot, A.: Intéret taxonomique de la recherche de la  $\beta$ -xylosidase chez les "Enterobacteriaceae". Ann. Inst. Pasteur 123: 341, 1972.
- Bülow, P.: The ONPG test in diagnostic bacteriology. 1. Methodological investigations. Acta path. microbiol. scand. 60: 376, 1964a.
- Bülow, P.: The ONPG test in diagnostic bacteriology. 2. Comparison of the ONPG test and the conventional lactose-fermentation test. Acta path. microbiol. scand. 60: 387, 1964b.
- Dey, P.M. & Pridham, J.B.: Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases. Advanc. Enzymol. 36: 91, 1972.
- Huggins, C. & Smith, D.R.: Chromogenic substrates. III. *p*-nitrophenyl sulfate as a substrate for the assay of phenolsulfatase activity. J. biol. Chem. 70: 391, 1947.
- Jacox, R.F.: Streptococcal  $\beta$ -glucuronidase. J. Bact. 65: 700, 1953.
- Kilian, M.: Rapid identification of *Actinomycetaceae* and related bacteria. J. Clin. Microbiol. 8: 127, 1978.
- Kilian, M. & Bülow, P.: Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta path. microbiol. scand. B, 84: 245, 1976.
- Lapage, S.P. & Jayaraman, M.S.: Beta-galactosidase and lactose fermentation in the identification of enterobacteria including salmonellae. J. clin. Path. 17: 117, 1964.
- Lapage, S.P., Efstratiou, A. & Hill, L.R.: The ortho-nitrophenol (ONPG) test and acid from lactose in Gram-negative genera. J. clin. Pathol. 26: 821, 1973.
- Leclerc, H.: Etude biochimique d'Enterobactériaceae pigmentées. Ann. Inst. Pasteur 102: 726, 1962.

- Lederberg, J.: The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *J. Bact.* 60: 381, 1950.
- Minor, L. Le & Hamida, F. Ben: Avantages de la recherche de la  $\beta$ -galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique, en particulier des *Enterobacteriaceae*. *Ann. Inst. Pasteur* 102: 267, 1962.
- Minor, L. Le, Coynault, C. & Guiso, N.: Discordances entre la positivité du test à l'ONPG et la présence d'une  $\beta$ -galactosidase chez les *Enterobactériaceae* et autres bacilles Gram-a métabolisme fermentatif. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 128B: 35, 1977.
- Mollaret, H. & Minor, L. Le: Recherche de la  $\beta$ -galactosidase chez les différentes *Pasteurella* et conséquences quant à leur taxinomie. *Ann. Inst. Pasteur* 102: 649, 1962.
- Pigman, W.W.: Specificity, classification, and mechanism of action of the glycosidases. *Arch. Enzymol.* 4: 41, 1944.
- Robinson, J.J., Blinn, C.W. & Frank, P.F.: Glucuronidase production by *Streptococcus pyogenes*. *J. Bact.* 64: 719, 1952.
- Röd, T.O., Haug, R.H. & Midtved, T.:  $\beta$ -glucuronidase in the streptococcal groups B and D. *Acta path. microbiol. scand. B*, 82: 533, 1974.
- Stanier, R.Y.: Jacques Monod, 1910-1976 (Obituary). *J. gen. Microbiol.* 101: 1, 1977.
- Szturm-Rubinstein, S. & Piéchaud, D.: Sur l'utilisation du lactose par les germes du groupe *Alkalescens-Dispar*. *Ann. Inst. Pasteur* 103: 935, 1962.
- Szturm-Rubinstein, S. & Piéchaud, D.: Observations sur la recherche de la  $\beta$ -galactosidase dans le genre *Shigella*. *Ann. Inst. Pasteur* 104: 284, 1963.
- Talalay, P., Fishman, W.H. & Huggins, C.: Chromogenic substrates. II. Phenolphthalein glucuronic acid as substrate for the assay of glucuronidase activity. *J. biol. Chem.* 166: 757, 1946.
- Williams, R.E.O.: Glucuronidase production by serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *J. gen. Microbiol.* 10: 337, 1954.

## *Kapitel 22*

### **Æskulinspaltningprøver**

Prøver der påviser tilstedeværelsen af det enzym, som spalter glykosidbindingen i stoffet æskulin. Enzymet har intet officielt navn, men kan betegnes som "æskulinase".

#### **1. Historisk indledning**

Beijerinck, der var professor i bakteriologi ved den polytekniske højskole i Delft, publicerede flere grundlæggende arbejder om mælkesyrebakterier. I et af disse arbejder fra 1908 omtalte han æskulinspaltning som en vigtig karakteriserende egenskab, og det fremgår, at han både brugte en farvereaktion med ferricitrat og tab af det uspaltede substrats blå fluorescens som kriterium for stedfunden spaltning, og han anførte, at reaktionen var blevet brugt i årevis i hans laboratorium. Ifølge en fodnote stammede hans kendskab til prøven fra hans professorkollega i Delft, H.ter Meulen, som havde udført omfattende undersøgelser over glykosidspaltninger.

I Beijerinck's laboratorium arbejdede omkring dette tidspunkt van der Leck, og kort efter optog han sammen med Harrison i Canada brugen af æskulinspaltning ved hygiejniske undersøgelser af vand og mælk. Deres to arbejder (Harrison & van der Leck 1909a, b) citeres som regel i litteraturen som de første, hvor bakteriel æskulinspaltning er omtalt, men altså med urette. I disse publikationer anbefales et nyt indikatorsubstrat til simpel påvisning af colibakterier. Det bestod af McConkey's galdesaltmedium suppleret med æskulin og ferricitrat, således at kolonier af æskulinspaltende bakterier farvede substratet sort. Metoden vandt tilsyneladende ingen større udbredelse, men herfra stammer de mange senere metoder, hvor galde og æskulin er kombineret i samme medium – en kombination som kan være nyttig til bestemte formål, men som er principielt uheldig, når talen alene er om æskulinspaltning, da denne spaltning som sådan ikke på nogen måde er betinget af tilstedeværelsen af galdesalte.

Æskulinspaltning viste sig senere at være værdifuld som differentierende egenskab inden for streptokokgruppen. Rochaix (1924) fandt, at enterokok-

ker regelmæssigt spaltede æskulin, og Meyer & Schönfeld (1926) kunne vise, at prøven var egnet til at skille enterokokker fra såkaldt *Streptococcus viridans*, som ikke spaltede æskulin, og de viste også, at andre streptokokker – bl.a. nogle ”mælkesyrestreptokokker” – havde evne til æskulinspaltning. Senere undersøgelser har bekræftet prøvens værdi inden for dette område (Facklam & Moody 1970; Facklam 1973; Facklam et al. 1974).

Til differentiering inden for familien *Enterobacteriaceae* blev æskulinprøven først brugt af Levine (Levine et al. 1932, 1934; Vaughn & Levine 1942). Han brugte den oprindelig på den måde, at fermentativ syredannelse af den fraspaltede glukose var kriterium for æskulinspaltningen, hvilket med denne gruppe bakterier skulle være i orden; alligevel gik han senere over til også at tilsætte ferricitrat, som med det fraspaltede æskuletin danner et sort farvekompleks. I denne udformning har prøven været brugt af Edwards & Ewing (1972) og Ewing (1973) ved undersøgelse af store materialer af *Enterobacteriaceae*.

Forskellige hurtigprøver er lanceret i de seneste år. Wasilauskas (1971) og Lindell & Quinn (1975) brugte en galde-æskulin-ferricitrat skrå-agar og et stort inoculum, som tillod aflæsning efter 4 timer, og Edberg et al. (1976, 1977) anvendte en spottest, hvor inoculum placeredes på en æskulinvædet plet på et stykke filterpapir, og eventuel spaltning påvistes ved tab af blå fluorescens under en Wood-lampe inden for 30 minutter. Fluorescenstab som indikator for en positiv prøve havde foruden af Beijerinck også tidligere været anvendt af Gemmell & Hodgkiss (1964). De sidstnævnte viste også, at det fraspaltede æskuletin dannede synlige koralagtige krystaller i plademedier.

Resultaterne med hurtigprøverne afviger i nogle tilfælde fra resultaterne med de sædvanlige prøver (se senere), men viser ligesom disse, at inden for *Enterobacteriaceae* er prøvens værdi begrænset på grund af egenskabens fordeling mellem og inden for taxa. Om Edberg's spottest må det bemærkes, at alle prøver bliver positive ved forlænget inkubation.

## 2. Biokemisk baggrund

I naturen findes glykosidet æskulin i barken af hestekastanie (*Aesculus hippocastanum*), i vilde jasminer og i forskellige andre planter. Det består af et molekyle D-glukose og et molekyle 6,7-dihydroxycoumarin, også kaldet æskuletin, forbundet ved en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) glykosidbinding. En karakteristisk egenskab ved æskulin er stærk blå fluorescens i vandig opløsning med en pH højere end 5,8. Også æskuletin fluorescerer, men kun ved alkalisk pH.

Vi har ikke fundet generelle enzymatiske data om den glykosidase, der spalter æskulin, men Miskin & Edberg (1978) har for *E. coli*'s vedkommende vist, at enzymet er inducerbart, og at både æskulin og salicin inducerer. Af hensyn til teknikken ved prøvens udførelse ville det være værdifuldt at vide, om enzymet er konstitutivt eller inducerbart hos andre taxa. Spaltningen er en hydrolyse, hvorved  $\beta$ -D-glukose og æskuletin frigøres. Med følgende metoder kan det påvises, at spaltning har fundet sted: 1) Påvisning af syredannelse ud fra den dannede glukose. 2) Dannelse af et sort farvekompleks ud fra æskuletin i forbindelse med ferrijoner. 3) Tab af æskulinets fluorescerende evne ved spaltning. 4) Dannelse af koralagtige, hvide krystaller af æskuletin (Gemmell & Hodgkiss 1964). Syredannelse forudsætter naturligvis, at bakterierne har enzymer, der metaboliserer glukose med syrer som slutprodukt. Det biokemiske grundlag for dannelse af et sortfarvet kompleks af æskuletin og ferrijoner er ikke kendt og heller ikke de miljøfaktorer, som begunstiger dannelsen. Tab af fluorescens synes kun sjældent at have været anvendt som indikator, og så vidt man kan skønne af den nyere litteratur, kræves der yderligere undersøgelser, før en metode baseret på dette princip kan betragtes som tilfredsstillende funderet. Krystaldannelsen af æskuletin er kun omtalt i et enkelt arbejde.

### 3. Valg af metode

I diagnoseafdelingen har prøver til æskulinspaltning ikke haft større anvendelse. Når de har været brugt, har det været som led i en sukkerrække, hvor syredannelse var kriteriet for spaltning. Dog har også prøver baseret på dannelse af et mørkt farvekompleks med ferricitrat været anvendt forsøgs-mæssigt. Efter litteraturen at dømme er sidstnævnte metode bedst egnet til rutinebrug.

Et kombineret substrat med tilsætning af galdesalte kan ikke anbefales som generel undersøgelsesmetode. I en sammenlignende undersøgelse af *Enterobacteriaceae* med flere metoder har Edberg et al. (1977) vist, at med stammer fra visse taxa giver vækstprøver flere positive resultater end de direkte enzymtests, og at procenten af positive i vækstprøverne stiger med stigende inkubationstid. Særlig for *E. coli* er dette forhold meget udtalt. Senere har Miskin & Edberg (1978) vist, at det skyldes, at enzymet i *E. coli* er inducerbart. De mener, prøven har størst differentierende værdi, hvis man anvender prøver, hvor *E. coli* falder negativ ud, og anbefaler derfor enten vækstmedier sparsomt inokuleret og aflæst efter 18-24 timer, eller en af hurtigmetoderne hvor induktionen ikke når at gøre sig gældende.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Udfældning af spaltningsproduktet æskuletin med ferricitrat som et synligt brunsort stof i substratet*

*Substrat (modificeret Vaughn & Levine 1942)*

Pepton	0,5%
Gærekstrakt	0,5%
Æskulin	0,5%
Ferricitrat	0,05%

i destilleret vand. Slut pH 7,4.

Aftappes som flydende medium i reagensglas (150 x 13 mm) i 6–7 cm høje søjler, evt. efter tilsætning af agar som et skråglas.

*Udførelse:* Glasset tilsås som et forgæringsglas med lille inoculum fra en renkultur på plade. Et skråglas tilsås ved spredning på overfladen og stik gennem klumpen. Inkuberes ved 35°C.

*Aflæsning:* Hvis det drejer sig om *Enterobacteriaceae*, kan anbefales en enkelt aflæsning efter ca. 24 timer – med andre grupper af bakterier må man empirisk fastlægge den mest hensigtsmæssige inkubationstid, hvis man ikke kan finde anvisninger i originallitteraturen. En positiv reaktion viser sig ved, at substratet antager en mørkere brun til sort farve. Ifølge Beijerinck (1908) er farven sort ved sur og brun ved alkalisk reaktion.

*Fortolkning:* Grænsen mellem en negativ og en positiv reaktion er ikke skarp, og indtil man har skaffet sig personlig erfaring i aflæsning, bør man medtage en positiv kontrolstamme, fx. en *Klebsiella pneumoniae*.

#### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

#### 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Fra Bergey's Manual, 8. udg., er medtaget de taxa, hvor positive reaktioner er omtalt, uanset at metoden og inkubationstidens længde ikke er anført. Nogle data er fra originallitteraturen.

*Escherichia coli*: nogle stammer (0,3% ved aflæsning efter 24 timer, 61% ved aflæsning efter 5 døgn ifølge Edberg et al. 1977).

*Citrobacter*: nogle stammer (sent positive).

*Klebsiella*: *K. pneumoniae*: alle stammer; andre species: nogle stammer.

*Enterobacter*: *E. aerogenes*: alle stammer, andre species: nogle stammer.

*Serratia*: de fleste stammer af alle species.

*Proteus*: nogle stammer af *P. vulgaris* og *P. rettgeri*.

*Yersinia*: *Y. pestis* og *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, biotype 1.

*Erwinia*: flere species, bl.a. *E. carotovora*.

*Actinobacillus*: *A. suis*.

*Pasteurella*: *P. haemolytica*, nogle biotyper.

*Aeromonas*: nogle stammer af alle species.

*Chromobacterium lividum*: 95% af stammerne.

*Bacteroides*: *B. ruminicola*: de fleste stammer; enkelte stammer i andre species.

*Fusobacterium*: 4 af 16 species.

*Streptococcus*: 15 af 25 species og nogle stammer af nogle af de øvrige species (se streptokokafdelingens diagnoseskema).

*Leuconostoc*: *L. oenos* og nogle stammer af 3 andre species.

*Peptostreptococcus productus*: nogle stammer.

*Lactobacillus*: 9 af 25 species og nogle stammer af 4 andre species.

*Listeria*: alle species.

*Corynebacterium*: 8 af 12 plantepatogene species.

*Propionibacterium*: 5 af 8 species.

*Eubacterium*: enkelte stammer i flere species.

*Bifidobacterium*: 2 af 5 testede species; nogle stammer af en tredje species.

*Bacterionema*: ca 90% af stammerne.

*Rothia*: alle stammer.

*Nocardia*: 16 af 31 species.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven anvendes regelmæssigt i streptokokdiagnostik både som flydende og fast medium. Et æskulinglas med fenolrødt, men uden ferricitrat, indgår rutinemæssigt ved forgæring af ikke-hæmolytiske streptokokker, og ved CAMP-reaktionen til påvisning af gruppe B streptokokker tilsætter man æskulin og ferricitrat til pladerne, så man umiddelbart kan frasortere de æskulin-positive streptokokker, der giver en positiv CAMP-reaktion, mens gruppe B stammer er æskulin-negative.

Ellers anvendes prøven kun sjældent i klinisk-mikrobiologiske laboratorier. Dens værdi er især begrænset af, at fordelingen af positive og negative stammer eller taxa sjældent tillader nyttig differentiering. Også sent indtrædende positive reaktioner i nogle taxa begrænser dens værdi.

Som en nyttig differentiering fremhæves i litteraturen, at *Listeria* er positiv og *Erysipelothrix* negativ.

## 8. Referencer

- Beijerinck, M.W.: On lactic acid fermentation in milk. Proc. roy. Acad. Amst. 10: 17, 1908.
- Edberg, S.C., Gam, K., Bottenbley, C.J. & Singer, J.M.: Rapid spot test for the determination of esculin hydrolysis. J. clin. Microbiol. 4: 180, 1976.
- Edberg, S.C., Pittman, S. & Singer, J.M.: Esculin hydrolysis by *Enterobacteriaceae*. J. clin. Microbiol. 6: 111, 1977.
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H.: Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co., Minneapolis 1972.
- Ewing, W.H.: Differentiation of *Enterobacteriaceae* by Biochemical Reactions. Revised, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. DHEW. No. (CDC) 74-8270. Atlanta, Georgia, 1973.
- Facklam, R.R., Padula, J.F., Thacker, L.G., Wortham, E.C. & Sconyers, B.J.: Presumptive bile-esculin test. Appl. Microbiol. 20: 245, 1970.
- Facklam, R.R.: Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. Appl. Microbiol. 26: 138, 1973.
- Facklam, R.R., Padula, J.F., Thacker, L.G., Wortham, E.C. & Sconyers, B.J.: Presumptive identification of group A, B, and D streptococci. Appl. Microbiol. 27: 107, 1974.
- Gemmell, M. & Hodgkiss, W.: The physiological characters and flagellar arrangement of motile homofermentative lactobacilli. J. gen. Microbiol. 35: 519, 1964.
- Harrison, F.C. & van der Leek, J.: Aesculin bile salt media for water analysis. Cbl. Bakt. 2. Abt. 22: 547, 1909a.
- Harrison, F.C. & van der Leek, J.: Aesculin bile salt media for milk analysis. Cbl. Bakt. 2. Abt. 22: 551, 1909b.
- Levine, M., Vaughn, R., Epstein, S.S. & Anderson, D.Q.: Some differential reactions in the colon-aerogenes group of bacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 29: 1022, 1932.
- Levine, M., Epstein, S.S. & Vaughn, R.H.: Differential reactions in the colon group of bacteria. Amer. J. publ. Hlth 24: 505, 1934.
- Lindell, S.S. & Quinn, P.: Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of *Enterobacteriaceae*. J. clin. Microbiol. 1: 440, 1975.
- Meyer, K. & Schönfeld, H.: Ueber die Unterscheidung des *Enterococcus* von *Streptococcus viridans* und die Beziehungen beider zum *Streptococcus lactis*. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 99: 402, 1926.
- Miskin, A. & Edberg, S.C.: Esculin hydrolysis reaction by *Escherichia coli*. J. clin. Microbiol. 7: 251, 1978.

- Rochaix, A.: Milieux a l'esculine pour le diagnostic différentiel des bactéries du groupe strepto-entéro-pneumocoque. C.R. Soc. Biol. (Paris) *90*: 771, 1924.
- Vaughn, R.H. & Levine, M.: Differentiation of the "intermediate" coli-like bacteria. J. Bact. *44*: 487, 1942.
- Wasilauskas, B.L.: Preliminary observations on the rapid differentiation of the *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group on bile-esculin-agar. Appl. Microbiol. *21*: 162, 1971.

## *Kapitel 23*

### **Stivelsesspaltningprøver**

Prøver, der påviser tilstedeværelsen af stivelsesspaltende enzymer, sammenfattet under betegnelsen "amylase".

#### **1. Historisk indledning**

Længe før man havde nogen forestillinger om enzymer og deres virkemåde blev det første enzym opdaget. Det skete, da to franske kemikere, Payen og Persoz, ansat ved en sukkerfabrik, i 1833 af malt ekstraherede en substans, som var i stand til at spalte stivelse til sukker (cit. efter Dixon 1971). Det aktive stof, koncentreret ved en påfølgende udfældning med alkohol, kaldte de diastase, fordi det separerede det opløselige sukker fra de uopløselige stivelseskorn. Senere blev amylase den gængse betegnelse for enzymet.

Da amylase i tidens løb var påvist i mange planter (en historisk oversigt findes hos Baranetzky 1878), blev det efterhånden nærliggende at undersøge, om enzymet også fandtes i bakterier. Botanikeren Nägeli (1877), der bl.a. er kendt for sine studier over stivelseskornenes bygning, nævner, at bakterier er i stand til at spalte stivelse; men det første større arbejde om emnet synes at hidrøre fra Julius Wortmann (1882) fra det botaniske institut i Strassburg. Wortmann arbejdede ikke med renkulturer, men kunne fastslå, at forskellige bakterieinfuser var i stand til at nedbryde stivelse. Som kriterier for nedbrydningen brugte han mikroskopisk påviselige ændringer af stivelseskornene, ændringer i den blå farve, som jod giver med uspaltet stivelse, og påvisning af reducerende sukker i kulturerne. Han ekstraherede og fældede også enzymet fra bakteriekulturer efter samme mønster som Payen og Persoz. Dermed var vejen åbnet for en udnyttelse af evnen til stivelsesspaltning som et middel til at karakterisere forskellige bakterier. Claudio Fermi (1889) undersøgte 30 forskellige bakteriestammer og fandt evne til at spalte stivelse hos 7 af dem, deriblandt 3 sporedannere. Fermi satte dræbte, udvoksede kulturer til stivelse og undersøgte om der blev dannet sukker.

I 1901 angav Eijkman, at stivelsesspaltning kunne påvises ved hjælp af en agarplade tilsat stivelse, da pladen er uigennemsigtig på grund af stivelsen, men viser opklarede zoner omkring stivelsesspaltende kolonier.

Både plantefysiologiske og bakteriologiske undersøgelser gjorde det efterhånden klart, at stivelsesspaltning var en kompliceret proces, hvor der kunne optræde forskellige mellemprodukter, og at der fandtes flere slags stivelsesspaltende enzymer (se fx. Beijerinck 1895). Endnu i dag har man ikke kendskab til alle detaljer i stivelsesspaltningens proces.

Som ovenfor nævnt, var kemisk påvisning af den ved nedbrydningen dannede glukose en af de måder, hvorpå stivelsesspaltning blev konstateret. Da mange bakterier oxidativt eller fermentativt omdanner glukose til syrer, er det klart, at man i visse tilfælde også kan benytte syrepåvisning som indikator for stivelsesspaltning. Dette princip har været anvendt bl.a. i diagnoseafdelingen, hvor syredannelse i et forgæringssubstrat med tilsat stivelse er taget som udtryk for evne til stivelsesspaltning. Processens uoverskuelighed og vanskeligheden ved at fremskaffe glukose- og maltosefri stivelse medfører, at denne metodes resultater ikke kan fortolkes med sikkerhed.

En bedre metode blev foreslået allerede i 1918 af Allen. Han satte 0,2% vandopløselig stivelse til et plademedium, hvor bakterierne kunne vokse, og tilsåede pladen med et enkelt lineært strøg. Efter inkubering i nogle dage påvistes stivelsesspaltning ved at flyde pladen med en jodopløsning, hvorved uomdannet stivelse farves blå, mens stivelsesspaltning markeres som en farveløs zone omkring bakteriestrøget, hvis amylase er til stede. Denne metode i forskellige udformninger har siden været den mest anvendte (se fx. Smith et al. 1952; Burdon 1956; Stanier et al. 1966; Iverson & Millis 1974; Lee 1976).

## 2. Biokemisk baggrund

Stivelse dannes som intracellulære stivelseskorn i planteceller, hvor de udgør planternes reservenæring; i ris findes 75% stivelse, i majs ca. 50% og i kartofler ca. 20%. Stivelse er opbygget udelukkende af glukosemolekyler forbundet ved glykosidbindinger, men der forekommer to forskellige slags glykosidbindinger:  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) og  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) bindinger. Resultatet er, at stivelse består af to hovedkomponenter: dels lange ugrene molekyler (= amylose), som alene indeholder 1 $\rightarrow$ 4 bindinger, dels lange forgrenede molekyler (= amylopektin), hvor begge slags bindinger indgår, idet 1 $\rightarrow$ 6 bindingerne udgør forgreningspunkterne.

Denne særlige struktur medfører, at stivelsesnedbrydning er en kompliceret proces, der kan føre til forskellige intermediær- og slutprodukter, afhængigt af hvilke enzymer, der deltager i nedbrydningen.

Der er beskrevet flere forskellige stivelsesspaltende enzymer (amylaser) isoleret fra dyr, planter og mikroorganismer, men om de bakterielle amylaser ved man kun lidt. Hyppigst er  $\alpha$ -amylase (=  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glucan glucanohydrolase),

som også findes i spyt og sekret fra bugspytkirtlen; sjældent er  $\beta$ -amylase (=  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucan maltohydrolase), der er bedst kendt fra spirende malt, som anvendes ved fremstilling af øl og spiritus ud fra korn og kartofler. Sjældne og usædvanlige amylaser er fundet i *Bacillus macerans* og *Bacillus polymyxa* (Sokatch 1969).

Slutproduktet ved de fleste bakterielle stivelsesspaltninger vil bestå af en blanding af dextrin, maltose og glukose, i vekslende mængdeforhold. Dextrin er delvis nedbrudt stivelse, men med så mange glukoseenheder, at det regnes som et polysakkarid, skønt det ikke med jod giver en kraftig blå farve. Den blå farve fremkaldes af amylose mens dextrin med jod kan give samme rødlige farve som amylopektin eller være farveløs. En fuldstændig nedbrydning til maltose og glukose forudsætter enzymer, som kan spalte 1 $\rightarrow$ 6 bindingerne i amylopektinets forgreningspunkter, og øjensynlig er sådanne enzymer sjældne i bakterier.

De enkelte enzymatiske trin i den bakterielle stivelsesnedbrydning er ikke kendt, og det er en oversimplificering at forestille sig, som angivet af Blazevic & Ederer (1975), at  $\alpha$ -amylase først spalter stivelse til dextrin, derefter dextrin til maltose og sluttelig maltose til glukose.

$\alpha$ -amylase fra bakterier er et ekstracellulært enzym, der kræver forudgående induktion, men fx. *Clostridium welchii* amylasen kan induceres af både stivelse, glykogen og maltose (Gale 1947).

### 3. Valg af metode

Som nævnt er diagnoseafdelingens hidtidige standardmetode (syredannelse ud fra stivelse) uheldig, fordi der er grund til at tro, at syredannelsen ofte alene skyldes metabolisering af glukose- og maltoseenheder i stivelsen med det resultat, at man får en del falsk positive resultater. Det må derfor anbefales at bruge en stivelsesholdig plade, hvor nedbrydningen påvises ved, at den typiske farvereaktion med jod forsvinder, hvis spaltning har fundet sted. Ved denne fremgangsmåde vil forekomst af glukose og maltose som forurening ikke påvirke udfaldet.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Agarplade med opløselig stivelse og jod-stivelse-farvereaktionen som indikatorsystem*

Speciallitteraturen indeholder mange, tildels varierende angivelser med hensyn til valg af stivelse, grundsubstrat og reagens som udtryk for at valget ikke er særlig kritisk og delvis bestemt af, hvilke bakterier undersøgelsen gælder. Her angives den metode, som er brugt af Stanier et al. (1966) og Blazevic & Ederer (1975).

*Substrat:* Til en bouillonagar – evt. beriget med 0,5% gærekstrakt – sættes vandopløselig stivelse i en mængde svarende til 0,2%. Efter autoklavering ophældes substratet som almindelige plader. Autoklaveringen medfører en vis grad af hydrolyse, men ikke nok til at interferere med prøven (Allen 1918).

*Reagens:* Den modificerede Lugols jodopløsning som anvendes til Gramfarvning; den indeholder 1 g jod og 2 g kaliumjodid i 300 ml destilleret vand.

*Udførelse:* Fra en frisk renkultur tilsås stivelsespladen med et enkelt strøg midt på pladen. Inkuberingen sker ved bakteriernes optimale væksttemperatur. Inkuberingstiden afhænger af bakteriernes væksthastighed. Stanier et al. (1966) angiver for pseudomonader 48 timer, andre har inkuberet op til 7 dage. Det kan tilrådes at vente yderligere 48 timer med reagenstilsætningen, efter at kulturen er fuldt udvokset, medmindre man laver en serie plader, der kan prøves med fx. 48 timers interval. Reagenstilsætning dræber bakterierne, så fortsat inkubering af samme plade ikke kan gennemføres.

*Aflæsning:* Pladen flydes med jodopløsningen og aflæses straks. Jod og uændret stivelse indgår en forbindelse, som er kraftigt blå, mens delvis nedbrudt stivelse i forbindelse med jod enten giver en rødlig farve eller er farveløs, afhængigt af hvor vidt fremskredet nedbrydningen har været. En nedbrydning vil derfor vise sig ved, at en bredere eller smallere zone omkring vækststrøget er rødlig farvet eller helt farveløs, mens resten af pladen er dybt blå. Ved en negativ prøve bliver hele pladen blå. Aflæsningen skal foretages inden for et par minutter efter reagenspåhældningen, da den blå farve hurtigt bleges.

*Fortolkning:* Kun en helt farveløs zone omkring vækststrøget fortolkes som et positivt udfald af prøven.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Det er en usikkerhed ved opregning af bakterier med positiv reaktion, at det ikke i alle tilfælde i Bergey's Manual er angivet, om egenskaben er påvist på grundlag af den ene eller den anden metode, således at man i det enkelte tilfælde kan være i tvivl om, hvorvidt der er tale om egentlig hydrolyse af stivelse. Derfor anbefales det i de konkrete tilfælde at slå efter i Bergey's Manual og i tvivlstilfælde at gå til originallitteraturen. Af mangel på personlig erfaring med prøven har vi været helt henvist til litteraturens oplysninger.

*Pseudomonas*: *P. stutzeri*, *P. pseudomallei*, *P. saccharophila* og nogle stammer af *P. mallei*.

*Xanthomonas*: de fleste species.

*Vibrio*: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* og nogle stammer af *V. fisheri*.

*Lucibacterium harveyi*

*Chromobacterium*: ca. 20% af stammerne.

*Flavobacterium*: *F. ferrugineum*, *F. lutescens* og *F. indoltheticum*.

*Pasteurella*: de fleste stammer af *P. pneumotropica* og *P. haemolytica* (påvist som syredannelse).

*Bacteroides*: nogle stammer af *B. ruminicola*.

*Fusobacterium*: nogle stammer af 4 (5) species.

*Leptotrichia*: nogle stammer af *L. buccalis*.

*Neisseria*: nogle stammer af *N. mucosa*, *N. sicca* og *N. subflava*, men påvist ved syredannelse.

*Micrococcus*: nogle stammer af *M. luteus* angives at oxidere (?) stivelse.

*Staphylococcus*: kun enkelte stammer.

*Streptococcus*: nogle stammer af serogrupperne C, D og G og enkelte andre.

*Gemella*: *G. haemolysans* påvist ved syredannelse.

*Peptostreptococcus*: nogle stammer af *P. productus*.

*Bacillus*: 19 af 26 species i *Bacillus* gruppe II.

*Clostridium*: 13 (15) af 54 species.

*Corynebacterium*: nogle stammer af *C. pyogenes*.

*Arthrobacter*: nogle stammer af 3 species.

*Eubacterium*: 2 af 10 species.

Ordo *Actinomycetales*: mange af denne store gruppes undertaxa er helt eller delvis positive, fx. *Actinomyces bovis*, nogle *Bifidobacterium*, alle *Bacterionema*, *Nocardia coeliaca*, *Nocardia vaccinii*, mange *Streptomyces* og en del *Micromonospora*.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Som det fremgår af forrige afsnit er amylaser hyppigt forekommende blandt bakterier, men som differentieringsprøve synes stivelseshydrolyse ikke at have fundet stor udbredelse. Det kan skyldes besværet med substratfremstillingen og den lange tid, der kan medgå inden et svar foreligger.

De områder, inden for klinisk mikrobiologi hvor det ser ud til at prøven især har differentialdiagnostisk værdi, er blandt streptokokker og *Bacillus* og *Clostridium* arter. Også ved adskillelse af *P. stutzeri* og atypisk *P. aeruginosa* kan prøven være nyttig.

## 8. Referencer

- Allen, P.W.: A simple method for the classification of bacteria as to diastase production. *J. Bact.* 3: 15, 1918.
- Baranetzky: Die Stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen. Leipzig 1878.
- Beyerinck, M.W.: Ueber Nachweis und Verbreitung der Glukase, das Enzym der Maltose. *Cbl. Bakt. II. Abt. 1*: 221, 265, 329, 1895.
- Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. John Wiley & Sons, New York, 1975, p. 99.
- Burdon, K.L.: Useful criteria for the identification of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Bact.* 71: 25, 1956.
- Dixon, M.: The history of enzymes and of biological oxidations. In: Needham, J. (ed.): The Chemistry of Life. Eight Lectures on the History of Biochemistry. University Press, Cambridge 1971, p. 17.
- Eijkman, C.: Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 29: 841, 1901.
- Fermi, C.: Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. *Cbl. Bakt.* 7: 469, 1889.
- Gale, E.F.: The Chemical Activities of Bacteria. University Tutorial Press Ltd., London 1947, p. 45.
- Iverson, W.G. & Millis, N.F.: A method for the detection of starch hydrolysis by bacteria. *J. appl. Bact.* 37: 443, 1974.
- Lee, W.-S.: Use of Mueller-Hinton agar as amylase testing medium. *J. clin. Microbiol.* 4: 312, 1976.
- Nägeli, C.v.: Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektionskrankheiten und der Gesundheitspflege. München 1877, p. 12.
- Smith, N.R., Gordon, R.E. & Clark, F.E.: Aerobic Sporeforming Bacteria. Agriculture Monograph No. 16, U.S. Dept. Agriculture. 1952, p. 31.
- Sokatch, J.R.: Bacterial Physiology and Metabolism. Academic Press, London & N.Y. 1969, p. 58.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.* 43: 159, 1966.
- Wortmann, J.: Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bakterien. *Z. physiol. Chemie* 6: 287, 1882.

## *Kapitel 24*

### **Cellulosespaltningsprøver**

Prøver, der påviser tilstedeværelse af cellulosespaltende enzymer, sammenfattet under navnet "cellulase".

#### **1. Historisk indledning**

Der er flere grunde til, at man i mange år intensivt har beskæftiget sig med bakteriel cellulosenedbrydning. For det første er cellulose det kulhydrat, som forekommer i størst mængde i naturen, og for det andet er denne enorme fødereserve kun i ringe grad tilgængelig for mennesker og de fleste dyr, fordi deres fordøjelseskana! mangler de nødvendige enzymer til nedbrydningen. Blandt de højere dyr kan drøvtyggerne udnytte cellulose, fordi vommen hos dem indeholder en væske fyldt med bakterier og andre mikroorganismer, hvoraf nogle producerer cellulosenedbrydende enzymer. Efter nyere undersøgelser kan imidlertid en ringe mængde cellulose udnyttes af cellulosespaltende bakterier i tarmkanalen også hos mennesker og andre pattedyr. Andre motiver til at interessere sig for cellulosenedbrydning er dels muligheden for at fremstille nyttige organiske forbindelser som alkohol, acetone ect. i industriel målestok ud fra cellulose, dels problemet med at bortskaffe de stadigt stigende mængder celluloseholdigt affald, der ophobes i moderne samfund.

Trods interesse for bakteriel cellulosenedbrydning er der stadig mange huller i den eksisterende viden. Nogle af grundene hertil er, at det tog lang tid, inden det lykkedes at skaffe renkulturer især af de anaerobe cellulosespaltere, at måling af enzymaktiviteten kompliceres af at enzymsubstratet i sin rene form er uopløseligt, og formodentlig også den omstændighed, at bakteriel cellulosenedbrydning i naturen er resultatet af flere forskellige slags bakteriers samtidige aktivitet.

Den tyske kemiker Mitscherlich (1850) regnes som den første, der forbandt forestillingen om cellulosenedbrydning i naturen med bakteriers virksomhed, og von Tappeiner (1883-84) viste, at cellulosenedbrydning i vommen hos drøvtyggere skyldtes mikroorganismer. Den russiske bakteriolog Omelianski (1902) – en elev af den kendte jordbunds bakteriolog Winogradsky – gjorde de første

forsøg på rendyrkning, idet han anviste metoder til at fremstille berigede kulturer. Han kunne også vise, at de aktive bakterier var anaerobe sporedannere, men renkulturer lykkedes det ham ikke at opnå. Først Clausen (1931), der arbejdede i Kiel, fik vækst af rendyrkede enkeltkolonier på celluloseagar af anaerobe cellulosespaltere, og mere regelmæssigt lykkedes det først for Hungate fra USA (se fx. Hungate 1950), efter at han havde udarbejdet en forbedret teknik til anaerob dyrkning. Hungate og hans elever, især Bryant (1959) og McBee (1948)) har isoleret og beskrevet mange af de anaerobe cellulose-nedbrydere, der kendes i dag.

Sideløbende med denne række undersøgelser blev det også vist, at der fandtes fakultativt anaerobe og strikt aerobe bakterier med evne til cellulosenedbrydning. De vigtigste bidrag skyldtes van Iterson (1903), Kellerman & McBeth (1912), Hutchinson & Clayton (1919), Winogradsky (1929) og Stanier (1942). Det drejer sig især om bakterier af slægterne *Cellulomonas*, *Cellvibrio* og *Cytophaga*.

Den første, der benyttede filtrerpapirstrimlers desintegrering som indikator for cellulosenedbrydning, synes at have været Popoff (1875), og de første, der anvendte en agarplade med inkorporeret finfordelt cellulose, hvor opklaring omkring enkeltkolonier markerede nedbrydningen, var Kellerman & McBeth (1912).

Pringsheim (1912) viste som den første, at cellobiose og glukose var intermediærprodukter ved cellulose nedbrydning.

Renfremstilling af cellulosespaltende enzymer er stadig ikke lykkedes, men der er i litteraturen talrige undersøgelser, hvor spaltningsprocessen og de nærmere omstændigheder for enzymets optimale virksomhed er søgt klarlagt. Som eksempler kan nævnes arbejder af Han & Srinivasan (1968), Berg et al. (1972a, b), Child et al. (1973), Lee & Blackburn (1975), Breuil & Kushner (1976), Kaufmann et al. (1976) og Thayer (1976).

## 2. Biokemisk baggrund

Cellulose er et polysakkarid fra plantevæv opbygget udelukkende af glukosemolekyler forbundet ved  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) bindinger. Molekylet er en ugrenet kæde med fra få hundrede til mange tusinde glukoseenheder. Cellulose forekommer i alle planteceller, men mængden varierer stærkt: blade indeholder ca. 2%, træmasse ca. 45% og bomuld ca. 98%. I de fleste tilfælde findes cellulosen sammenbygget med andre polymerer som lignin, hemicellulose, pektin og extensin. Ren cellulose, som fx. filtrerpapir og affedtede bomuldsfibre, er fuldstændig uopløseligt i vand og alle sædvanligt anvendte opløsningsmidler, men det er opløseligt i Schweizer's reagens (cupritetraaminhydroxyd) og kan

derfra udfældes med syre som et fint fordelt præcipitat. Kellerman & McBeth (1912) indførte brugen af således udfældet cellulose som bestanddel af agarplader. Også mekanisk findelte cellulosefibre anvendes i agarplader. Ved forskellige kemiske behandlinger kan dannes opløselige cellulosederivater som carboxymethylcellulose og ætylcellulose, der er kommercielt tilgængelige.

De nævnte forskellige celluloseprodukter angribes med forskellig lethed af cellulosespaltende enzymer, og nogle derivater angribes også af enzymer, der ikke spalter ren cellulose. Variationer i cellulosefibrestruktur og sammensætning påvirker også den lethed, hvormed de nedbrydes (Berg et al. 1972a, b). Af de anførte grunde er det nødvendigt altid at præcisere, hvilket substrat der har været benyttet til undersøgelse for evne til cellulosespaltning. Tidligere regnede man med, at den enzymatiske spaltning foregik ved hjælp af et enkelt enzym, cellulase, som var i stand til at afspalte to glukoseenheder ad gangen, således at der opstod cellobiose, som derefter af samme enzym spaltedes til to molekyler D-glukose.

Nyere undersøgelser har vist, at processen er mere kompliceret. Selv om spørgsmålet endnu ikke er fuldt opklaret, regner man i dag med, at "cellulase" er et kompleks af enzymer omfattende 1)  $C_1$ -cellulase, som spalter tilfældige bindinger i kæden, 2)  $C_x$ -cellulase, som fra frie ender afspalter cellobiose og 3) cellobiase, som spalter cellobiosen til glukose. I nogle tilfælde er det vist, at både  $C_x$ - og  $C_1$ -komponenterne indeholder underkomponenter med lidt varierende substratspecificitet.

Nogle bakterier danner en ekstracellulær cellulase, hos andre er enzymet intracellulært og frigøres først ved bakteriens lyse, og i endnu andre tilfælde er der påvist både frit og cellebundet enzym.

I alle tilfælde synes enzymets dannelse at kræve induktion med cellulose, og tilmed forudsættes en nær kontakt mellem bakteriecellen og substratet. På hvilken måde denne kontakt udløser enzymproduktionen er ikke kendt.

Tilstedeværelse af glukose og cellobiose i kulturerne hæmmer eller forhindrer enzymdannelsen. Det optimale pH for enzymaktiviteten er noget varierende, men ligger hyppigt omkring neutralpunktet.

Metoder til påvisning af cellulosespaltning i diagnostisk bakteriologi er enten synlig desintegrering af filtrerpapirstimler eller påvisning af opklaring omkring kolonierne på plader, som indeholder fint fordelt cellulose. Af kvantitative metoder, som især anvendes i biokemien, kan nævnes: vejning af cellulosemængden før og efter enzympåvirkning, ændringer i cellulosepræparatets viskositet, måling af den dannede mængde reducerende sukker og brug af  $^{14}\text{C}$ -mærket cellulose med måling af den frigjorte radioaktivitet.

### 3. Valg af metode

Diagnoseafdelingens erfaringer med påvisning af cellulosespaltende evne hos bakterier er begrænset til nogle få lejligheder, hvor der er blevet anvendt filterpapirstrimler i et flydende mineralmedium eller på overfladen af en speciel skrå-agar. Fordelen ved denne metode er, dels at den let lader sig improvisere i de sjældne tilfælde der vil være brug for den, dels at et positivt udfald virkelig er udtryk for spaltning af ren cellulose.

Af litteraturen fremgår, at spaltning af carboxymethylcellulose påvist ved viskositetsændring – en meget anvendt metode – kun forudsætter nærvær af  $C_x$ -komponenten. Denne prøve kan derfor ikke direkte sammenlignes med påvist desintegrering af filterpapir, som forudsætter, at også  $C_1$ -komponenten er til stede.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *Vækstmedium og enzymsubstrat*

Afhængig af bakteriernes vækstkrav anvendes et simpelt mineralmedium med  $(NH_4)_2SO_4$  eller  $NaNO_3$  som kvælstofkilde eller samme medium beriget med gærekstrakt og/eller pepton. En strimmel filterpapir tilsættes som kulstof- og energikilde.

Hvis bakterierne kan udnytte nitrat som kvælstofkilde, er det af hensyn til pH i kulturen under væksten en fordel at benytte nitrat fremfor et ammoniumsalt. Mediet kan bruges i flydende eller fast form. I det flydende medium anbringes – umiddelbart før tilsåningen – et stykke sterilt filterpapir (Whatman nr. 1 anbefales, men er næppe strengt nødvendigt), ca. 10 x 70 mm, således at ca.  $\frac{1}{3}$  rager op over væskens overflade. I fast form dispenserer mediet som en skrå-agar, og filterpapiret trykkes fast på den skrå overflade.

Mineralmediets sammensætning er ikke kritisk. Hutner's medium (se Cohen-Bazire et al. 1957 og den modificerede opskrift fra substratafdelingen) eller følgende kan anvendes:

NaCl	0,6 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,1 g
$KH_2PO_4$	0,05 g
$K_2HPO_4$	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
$CaCl_2$	0,01 g
i postevand	100 ml

pH indstilles til 7,0-7,4.

Af det flydende medium aftappes ca. 5 ml i reagensglas ca. 150 x 13 mm. Ikke tilsæede kontrolglas er strengt nødvendige.

### *Udførelse*

Inoculum tages fra en frisk renkultur på plade. Efter at filtrerpapiret i glasset er blevet fugtigt, så det klæber til glassets væg, tilsås det flydende medium ved at suspendere et moderat stort inoculum i væsken, og en skrå-agar tilsås ved at inoculum spredes på overfladen af filtrerpapiret.

Da nær kontakt mellem bakterier og filtrerpapir er en forudsætning for enzyminduktionen, vil det måske også være en fordel at tilså det flydende medium ved at sprede inoculum på strimlen, inden den anbringes i glasset. Det vil af hensyn til aflæsningen være en fordel at råde over 2-3 glas, der kan undersøges successivt.

Glassene anbringes ved optimal væksttemperatur. Termofile clostridier kan kræve op til 45°C, cytophaga-arter vokser som regel bedst ved stuetemperatur.

### *Aflæsning*

Prøverne aflæses dagligt i op til 30 dage, hvis cellulosespaltning ikke er konstateret forinden. Nedbrydningshastigheden kan variere fra få dage til 1 måned.

I de flydende medier med strikt aerobe bakterier vil cellulosespaltningen i typiske tilfælde vise sig ved, at filtrerpapirstrimlen går i to stykker, når glasset vippes, idet væksten og derfor cellulosespaltningen foregår i et smalt bælte svarende til substratoverfladen, så papiret knækker sammen, når spaltningen er tilstrækkelig vidt fremskreden. I andre tilfælde sker der en mere diffus spaltning resulterende i papirets omdannelse til en så blød masse, at det enten synker til bunds i glasset eller går i stykker ved berøring med en øsken eller pinçet. I et skråglas, hvor papiret ikke har mulighed for at knække eller synke sammen, påvises spaltningen ved at det er blevet så mørt, at det meget let går i stykker ved skub eller træk. I tvivlstilfælde er det vigtigt at sammenligne skørheden af papiret i prøveglas og kontrolglas.

### *Fortolkning*

Et knækket eller helt blødgjort stykke filtrerpapir er bevis for, at der har fundet en cellulosespaltning sted. I tilfælde, hvor spaltning ikke er helt oplagt, beror afgørelsen på en sammenligning med kontrollen. Fortsat inkubering af prøve- og kontrolglas med gentagne undersøgelser af papirets mørhedsgrad må anbefales i tvivlstilfælde.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Da mange grupper af bakterier ikke er undersøgt systematisk for evne til cellulosespaltning, er nedenstående liste nødvendigvis ufuldstændig. Fra Bergey's Manual er medtaget de taxa, hvor det er anført at hydrolyse af cellulose eller carboxymethylcellulose er iagttaget, og hertil er føjet enkelte observationer fra speciallitteraturen.

*Cytophaga*: nogle species.

*Sporocytophaga myxococcoides*

*Pseudomonas*: en enkelt stamme af *P. fluorescens*.

*Alcaligenes*: en enkelt stamme af *A. faecalis*.

*Serratia*: en enkelt stamme af *S. marcescens*.

*Bacteroides*: *B. ruminicola* og *B. succinogenes*.

*Butyrivibrio*: nogle stammer af *B. fibrisolvens*.

*Ruminococcus*: de fleste stammer.

*Bacillus*: svag aktivitet hos nogle stammer af *B. polymyxa*, *B. macerans* og *B. circulans*.

*Clostridium*: flere species (se 7. udg. i stedet for 8. udg. af Bergey's Manual).

*Cellulomonas*: alle stammer af eneste nu anerkendte species: *C. flavigena*;

I Bergey's Manual, 7. udg., flere andre species.

*Eubacterium cellulosolvens*

*Streptosporangium rubrum*

*Micromonospora*: 7 af de 16 species spalter cellulose, men i nogle tilfælde langsomt.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

I et klinisk-mikrobiologisk laboratorium vil prøven sjældent finde anvendelse, fordi de fleste isolater hører til bakteriegrupper, hvor cellulosespaltning efter vor nuværende viden ikke forekommer.

I sjældne tilfælde kan der være anledning til at undersøge en isoleret clostridieart eller en cytophaga-art. Da *Cellulomonas flavigena* kan forveksles med *Corynebacterium*, kunne der være grund til at anvende prøven på coryneforme isolater, især hvis de er gult pigmenterede.

## 8. Referencer

- Berg, B., Hofsten, B. v. & Petterson, G.: Growth and cellulase formation by *Cellvibrio fulvus*. J. appl. Bact. 35: 201, 1972a.
- Berg, B., Hofsten, B. v. & Petterson, G.: Electronmicroscopic observations on the degradation of cellulose fibres by *Cellvibrio fulvus* and *Sporocytophaga myxococcoides*. J. appl. Bact. 35: 215, 1972b.
- Breuil, C. & Kushner, D.J.: Cellulase induction and the use of cellulose as a preferred growth substrate by *Cellvibrio gilvus*. Canad. J. Microbiol. 22: 1776, 1976.
- Bryant, M.P.: Bacterial species of the rumen. Bact. Rev. 23: 125, 1959.
- Child, J.J., Eveleigh, D.E. & Sieben, A.S.: Determination of cellulase activity using hydroxyethylcellulose as substrate. Canad. J. Biochem. 51: 39, 1973.
- Clausen, P.: Studien über anaerobe Zellulosebazillen unter besonderer Berücksichtigung der Züchtungstechnik. Zbl. Bakt. 2. Abt. 84: 20, 1931.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y.: Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulphur purple bacteria. J. cell. comp. Physiol. 49: 25, 1957.
- Han, Y.W. & Srinivasan, V.R.: Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. Appl. Microbiol. 16: 1140, 1968.
- Hungate, R.E.: The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bact. Rev. 14: 1, 1960.
- Hutchinson, H.B. & Clayton, J.: On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (*Spirochaeta cytophaga*, n.sp.). J. agricult. Sciences 9: 143, 1918.
- Iterson, G. van, jr.: De aantasting van cellulose door aerobe mikro-organismen. Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Verslagen der Afdeeling Natuurk. D1. XI: 807, 1903.
- Kaufmann, A., Fegan, J., Doleac, P., Gainer, C., Wittich, D. & Glann, A.: Identification and characterization of a cellulolytic isolate. J. gen. Microbiol. 94: 405, 1976.
- Kellerman, K.F. & McBeth, I.G.: The fermentation of cellulose. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 34: 485, 1912.
- Lee, B.H. & Blackburn, T.H.: Cellulase production by a thermophilic *Clostridium* species. Appl. Microbiol. 30: 346, 1975.
- McBee, R.H.: The culture and physiology of a thermophilic cellulose-fermenting bacterium. J. Bact. 56: 653, 1948.
- Mitscherlich, E.: Über die Zusammensetzung der Wand der Pflanzenzelle. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königl. Preuss. Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1850, p. 102.
- Omelianski, W.: Über die Gärung der Cellulose. Cbl. Bakt. II. Abt. 8: 225, 1902.
- Popoff, L.: Ueber die Sumpfgasgärung. Arch. ges. Physiol. 10: 113, 1875.
- Pringsheim, H.: Über den fermentativen Abbau der Cellulose. Z. physiol. Chemie 78: 266, 1912.
- Stanier, R.Y.: The cytophaga group: A contribution to the biology of myxobacteria. Bact. Rev. 6: 143, 1942.
- Tappeiner, H.: Untersuchungen über die Gärung der Cellulose insbesondere über deren Lösung in Darmkanale. Z. Biol. 20: 52, 1884.
- Thayer, D.W.: Facultative wood-digesting bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. J. gen. Microbiol. 95: 287, 1976.
- Winogradsky, S.: Études sur la microbiologie du sol. IV Mem. Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. Ann. Inst. Pasteur 43: 549, 1929.

## Kapitel 25

# Pektinspaltningprøver

Med disse prøver påvises bakteriers evne til at spalte pektinholdigt plantevæv.

### 1. Historisk indledning

Interessen for bakteriel pektinspaltning stammer dels fra den såkaldte "rødning"proces, som er første trin i fremstilling af hør og hamp, dels fra plantesygdommen "fugtig råd" eller hvidbakteriose der angriber mange slags grøntsager (ordene "røde" og "råd" er begge gamle betegnelser for forrådnelse). Ved "rødning" blev i ældre tid hør- og hampeplanterne nedlagt nogle uger i et vandløb dækket med slam, hvorved pektin og andre kitsubstanser opløstes, så taverne, dvs. cellulosefibrene, derefter kunne frigøres ved en mekanisk behandling. Forestillingen om at mikroorganismer kunne spille en rolle ved processen var tidligere fremsat, da Winogradsky (1895) sammen med sin elev, Fribo, i St. Petersburg udførte nogle opformeringsforsøg med hørplanter som substrat og fra kulturerne isolerede en anaerob sporedanner, der var i stand til at nedbryde pektinholdigt materiale, men ikke angreb cellulose. I 1904 blev disse forsøg bekræftet af Beijerinck & van Delden i Holland og af flere andre. Beijerinck isolerede to forskellige anaerobe sporedannere og udfældede af kulturerne et enzym, pektosinase, som bl.a. fremkaldte henfald af kartoffelskiver. Baseret på Beijerinck's resultater gik man i hør- og hampeindustrien derefter over til at foretage rødningprocessen i opvarmede tanke tilsat kulturer af de aktive sporedannere. Et eksempel på, at der stadig er bakteriologer der interesserer sig for rødningprocessen, er Betrabet & Bhat's arbejde fra Indien i 1958. Siden Winogradsky's og Beijerinck's dage er det vist, at også fakultativt anaerobe og strikt aerobe bakterier kan bidrage til rødning af hørplanter.

Påvisning af *Erwinia carotovora* som årsag til fugtig råd hos gulerødder og andre rodfrugter skyldes den amerikanske plantepatolog Jones (1901, 1905). Han arbejdede i Wisconsin sammen med plantepatologen Erwin F. Smith, som har givet navn til slægten *Erwinia*. Jones påviste bakteriernes pektinspaltende evne ved direkte inokulation af sterile gulerodsskiver. Her kan det

nævnes, at den franske læge Davaine, der ellers især er kendt for sine miltbrandundersøgelser, allerede i 1868 inokulerede plantevæv med bakterier og derved fremkaldte fugtig råd (cit. efter Clark 1961).

En anden amerikansk plantepatolog, Starr, angav i 1947 en ny metode til påvisning af pektinspaltning baseret på at et vækstsustrat indeholdende en pektingel, der bliver flydende, hvis bakterierne danner pektinolytiske enzymer. Året efter viste han sammen med Burkholder, at også xanthomonader kan spalte pektin, og i 1967 undersøgte han sammen med Nasuno nærmere, hvilke pektinolytiske enzymer der forekommer i denne gruppe. I en oversigt fra 1972 har han givet en detaljeret redegørelse for de pektinolytiske enzymer i slægten *Erwinia* (Starr & Chatterjee 1972).

Schneider (1912) var den første der undersøgte, om nogle af de i tarmkanalen forekommende bakterier havde evne til at spalte pektin, og senere har mange andre gentaget undersøgelsen (McCoy & Peterson 1928; Barker & Martin 1936; Kertesz 1940; Davis & Ewing 1964 og flere andre). Nogle undersøgelser på dette område var inspireret af brugen af revne, rå æbler (der er meget pektinholdige) som middel mod diarré (Steinhaus & Georgi 1941; Werch et al. 1942). Det samlede resultat var, at når der ses bort fra *Erwinia*, var der ingen bakterier i familien *Enterobacteriaceae* der spaltede pektin. En enkelt senere undersøger hævder dog, at *Klebsiella* af biotypen *oxytoca* og alle *Yersinia*-arter danner pektolytiske enzymer (van Riesen 1975, 1976).

Enkelte forfattere har i de seneste år særlig interesseret sig for pektinolyse blandt *Bacillus*-arter, hvoraf en del er positive (Ottow 1972; Steinigeweg & Ottow 1974; Lajudie & Dumanoir 1976).

Den biokemiske analyse gjorde i mange år kun langsomme fremskridt, men siden det i 1960 af Albersheim et al. blev vist, at nogle af de implicerede enzymer er lyaser, som fører til dannelsen af umættede galakturonider, har der tilsyneladende været en opblussen i interessen, og nyere metoder er taget i brug ved enzymundersøgelserne (se fx. Fuchs 1965; Hsu & Vaughn 1969; Nagel & Wilson 1970; Zucker & Hankin 1971; Davé & Vaughn 1971). Et fremskridt er muligvis også en ny metode til påvisning af pektinspaltning i det bakteriologiske laboratorium (Jayasankar & Graham 1970; Hankin et al. 1971). Pektin er her indlejret i en plade stivnet ved hjælp af agar (i tidligere anvendte substrater var det pektingelen selv, der tjente som geleringsmiddel), og spaltningen påvises ved at flyde pladen med cetavlon = cetyl-

trimetylammoniumbromid, hvorved uspaltet pektin udfældes, så der dannes opklarede zoner omkring kolonier med pektinolytisk aktivitet.

## 2. Biokemisk baggrund

I naturen forekommer pektin i størst mængde i umodne frugter, især æbler, og desuden i rødder og rodknolde. Pektin er i plantevævet den intercellulære kitsubstans, som holder cellerne på plads i et bestemt mønster og bliver derved intimt forbundet med cellevæggenes cellulosefibre.

Kemisk er det en polymer af galakturonsyre-enheder bundet sammen med  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) glykosidbindinger, men desuden er et større eller mindre antal metylgrupper bundet i esterbinding til de frie carboxylgrupper.

I plantevæv er pektin vandopløseligt, men i rensset form er det delvis opløseligt og tåler dårligt autoklavering, især ved pH-værdier uden for neutralpunktet. Det er en karakteristisk egenskab ved pektin, at det i nærvær af calciumjoner går i forbindelse med stoffer, der indeholder hydroxylgrupper, og danner en fast gel. Denne pektingel er basis for frugtgeléer, hvor sukkeret leverer hydroxylgrupperne. Man kan forstærke de naturlige frugtsafters gelédannende evne ved tilsætning af ekstra pektin, og som følge heraf er det opstået en pektinindustri, som også er leverandør af de produkter, der anvendes i laboratorierne. Den gelédannende evne går tabt ved enzymatisk nedbrydning.

Det er tvivlsomt, om bakteriel pektinspaltning altid foregår på samme måde; i hvert fald ser det ud til, at forskellige bakterier kan have forskellige kombinationer af de indtil nu kendte enzymer, der falder i følgende 3 grupper (referencer, se historisk indledning):

1) Pektinmetylesterase eller blot pektinesterase – tidligere kaldet ”pektase” – fraspalter metyl fra carboxylgrupperne, hvorved pektin bliver til pektinsyre, dvs. polygalakturonsyre.

2) Flere forskellige hydrolytiske polygalakturonaser eller pektatglykosidaser – tidligere kaldet ”pektinase” – som spalter glykosidbindinger enten tilfældige steder i kæden eller fra den reducerende ende, således at der dannes galakturonsyre og/eller oligogalakturonider med forskelligt antal monomerer.

3) Flere forskellige polygalakturonatlyaser eller transeliminaser – også kaldet pektatlyase – som samtidig med spaltning af en glykosidbinding om-

danner et molekyle galakturonsyre til en umættet forbindelse ved eliminering af brintatomer.

Normal eller umættet galakturonsyre og normale eller umættede galakturonider udgør altså pektinets primære spaltning produkter. Nogle bakterier har enzymer til videre metabolisering af disse produkter. Det antages, at den umættede galakturonsyre spontant omdannes til 4-deoxy-L-threohexose-ulose-uronsyre, der ligesom normal galakturonsyre ender som 2-keto-3-deoxyglukonsyre, der efter fosforylering nedbrydes ad Entner-Doudoroff vejen.

Samspillet mellem disse 3 slags enzymer er ikke ganske klart, men det synes at gælde generelt, at pektatlyaseaktivitet forudsætter, at metylgrupperne er afspaltede ved hjælp af pektinesterasen.

Alle de nævnte enzymer dannes ekstracellulært. Polygalakturonase kræver sur reaktion (pH 4-6) både for at dannes og fungere. Pektatlyase kræver ligeledes sur reaktion ved dannelsen, men aktiviteten er størst ved svag alkalisk reaktion.

Begge disse enzymer angives hyppigst som konstitutive, men hos nogle bakterier er i hvert fald lyasen inducerbar (*P. fluorescens*, *Bacillus pumilus* og *Cytophaga pectinovorum*).

Hos en *Aeromonas*-stamme er det vist, at den konstitutive lyase i udtalt grad er under katabolit repression næsten uanset hvilke stoffer, der anvendes som kulstof- og energikilde (Hsu & Vaughn 1969). Hvis det samme er tilfældet for andre arter, er det et spørgsmål, hvor mange af litteraturens oplysninger om manglende evne til pektinspaltning, man kan stole på.

Zucker & Hankin (1971) har vist, at der i kartofler findes en faktor, som synergistisk forstærker induktionen af lyaseenzymet hos en *Pseudomonas*-stamme og andre jordbunds bakterier. Der er ingen forklaring på mekanismen, men fænomenet er måske værd at erindre, hvis man planlægger undersøgelse af bakteriel pektinspaltning.

Både hydrolaser og lyaser kræver tilstedeværelse af calciumjoner.

De vigtigste metoder til biokemisk analyse af pektinspaltning processen er viskometri, titrering af frie syregrupper, spektrofotometri og papirkromatografi, men disse prøver er for komplicerede til rutinebrug i bakteriologiske laboratorier. Her har man anvendt påvisning af ændring i pektinholdigt plantevæv, påvisning af ændring i pektinpræparaters fysiske tilstand og påvisning af spaltning produkter ved nedbrydning af et pektinpræparat.

### 3. Valg af metode

Diagnoseafdelingens erfaringer med pektinspaltning er begrænset til en enkelt serie forsøg med nogle *Erwinia*-stammer, der blev inokuleret direkte på sterile gulerodsskiver. Tilsyneladende fungerede metoden godt, og også af litteraturen får man indtryk af, at den er velegnet, måske bedst hvis gulerods- eller kartoffelskiven anbringes i et flydende vækstmedium. Her bør man dog tænke på den mulighed, at der i det flydende substrat kan dannes kataboliter, som hæmmer dannelsen af de pektolytiske enzymer.

Af litteraturen fremgår, at prøver der er baseret på smeltning eller sammensynkning af en pektingel – enten som en søjle i et reagensglas eller som en lagkageplade med pektingelen øverst – ikke er ganske tilfredsstillende, hvad der muligvis hænger sammen med, at gelen let undergår forandringer ved den nødvendige steriliseringsproces. Mere lovende er tilsyneladende agarplader med indstøbt pektin, hvor senere flydning med et polysakkaridfældende reagens markerer, om spaltning har fundet sted.

Her vil vi nøjes med at beskrive den oprindelige metode med direkte inokulation af sterile skiver af rodfrugter – vi betegner den som Jones' metode (Jones 1901, 1905) uden at være helt sikre på, at han var den første, som brugte den. Samtidig vil vi dog gøre opmærksom på, at hvis man står over for en systematisk undersøgelse af bakteriegrupper, hvor der kan være grund til at undersøge for pektolytisk aktivitet, vil det være rimeligt at inkludere andre metoder, fx. Jayasanker & Graham's (1970), der også er beskrevet hos Hankin et al. (1971), eller andre af de i den nyeste litteratur beskrevne fremgangsmåder, fx. hos Ottow (1974) og Lajudie & Dumanoir (1976).

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Jones' metode, dvs. direkte inokulering af sterile skiver af rodfrugter*

*Substrat:* Hos grønthandleren køber man – så vidt muligt friske – grøntsager, fx. gulerødder, radiser eller kartofler. Efter mekanisk rengøring af overfladen nedlægges materialet 2 minutter i 0,2% HgCl<sub>2</sub> eller et andet desinfektionsmiddel for at dræbe bakterier på overfladen. Desinfektionsmidlet afskylles derefter grundigt. Rodfrugten udskæres sterilt i skiver, ca. 5 mm tykke, og anbringes i en steril petriskål med vandfugtet sterilt filterpapir i bunden.

*Udførelse:* Tilsåningen kan ske enten fra en renkultur på plade eller fra et flydende medium. I første tilfælde indgives kulturmassen med en øsken på skivens overflade, i det andet tilfælde pådryppes overfladen nogle få dråber af kulturen. Inkubering sker ved bakteriernes optimumstemperatur.

*Aflæsning:* Når der er kommet synlig vækst på overfladen, prøver man ved at trykke en øsken eller glasstav mod overfladen, om vævet er blevet blødt. Til sammenligning tjener en utilsået skive. Kommer der ikke vækst, kan prøven ikke udføres med denne metodik, og man må evt. prøve at anbringe sterile stykker af rodfrugten i et flydende medium, hvor bakterierne kan vokse, og på samme måde prøve om plantevævet bliver mørt og henfaldende.

*Fortolkning:* Forskellen mellem det normale hårde plantevæv og det ved pektinolyse blødgjorte, macererede væv er i typiske tilfælde så udtalt, at der ikke hersker tvivl om prøvens udfald.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Fortegnelsen må tages med stort forbehold, både fordi mange bakteriegrupper endnu ikke har været undersøgt, og fordi de tidligere anvendte metoder muligvis ikke har været pålidelige. Nogle af de som positive anførte taxa er ikke anført som sådan i Bergey's Manual.

*Pseudomonas:* nogle stammer af *P. fluorescens* og *P. solanacearum* og muligvis stammer af flere andre species.

*Xanthomonas:* ca. halvdelen af de benævnte species.

*Aeromonas:* en enkelt stamme af *A. liquefaciens*

*Klebsiella:* alle stammer af biotypen *oxytoca*.

*Yersinia*

*Erwinia:* *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. salicis* og *E. rubrifaciens*.

*Streptococcus bovis* (isoleret fra rumen)

*Bacillus:* *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. macerans* og nogle stammer af andre species.

*Clostridium:* flere arter, men bortset fra *Cl. felsineum* ingen præcise data.

*Eubacterium:* nogle stammer af *E. cellulosolvens*.

*Streptomyces:* nogle stammer, men ingen præcise data.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Plantepatologer bruger regelmæssigt prøven ved differentiering inden for slægten *Erwinia*, men i klinisk-bakteriologiske laboratorier anvendes den

meget sjældent. Efter nyere undersøgelser burde den måske bruges oftere, da den ser ud til at kunne være af værdi ved diagnostik af *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Clostridium* og muligvis flere andre grupper.

Før prøven kan få praktisk betydning i medicinsk bakteriologi, er det dog nødvendigt at finde frem til en egnet rutinemetode og derefter gennemføre systematiske undersøgelser af relevante bakteriegrupper.

## 8. Referencer

- Albersheim, P., Neukom, H. & Deuel, H.: Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes Enzym. *Helv. chim. Acta* 43: 1422, 1960.
- Barker, F. & Martin, R.: Some observations of the iodophile microflora of the coecum of the rabbits; with special regard to the disintegration of cell-wall substances. *Zbl. Bakt.* 2. Abt. 96: 18, 1937.
- Beijerinck, M.W. & van Delden, A.: Sur les bactéries actives dans le rouissage du lin. *Arch. néerl. Sci. exactes et nat.* 9: 418, 1904.
- Betrabet, S.M. & Bhat, J.V.: Pectin decomposition by species of *Pseudomonas* and their role in the retting of malvaceous plants. *Appl. Microbiol.* 6: 89, 1958.
- Burkholder, W.H. & Starr, M.P.: The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 38: 494, 1948.
- Clark, P.F.: *Pioneer Microbiologists of America*. Univ. Wisconsin Press, 1961, p. 228.
- Davé, B.A. & Vaughn, R.H.: Purification and properties of a polygalacturonic acid *trans*-eliminase produced by *Bacillus pumilus*. *J. Bact.* 108: 166, 1971.
- Davis, B.R. & Ewing, W.H.: Lipolytic, pectolytic, and alginolytic activities of *Enterobacteriaceae*. *J. Bact.* 88: 16, 1964.
- Fuchs, A.: The *trans*-eliminative breakdown of Na-polygalacturonate by *Pseudomonas fluorescens*. *Antonie v. Leeuwenhoek* 31: 323, 1965.
- Hankin, L., Zucker, M. & Sands, D.C.: Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22: 205, 1971.
- Hsu, E.J. & Vaughn, R.H.: Production and catabolite repression of the constitutive polygalacturonic acid *trans*-eliminase of *Aeromonas liquefaciens*. *J. Bact.* 98: 172, 1969.
- Jayasankar, N.P. & Graham, P.H.: An agar plate method for screening and enumerating pectinolytic microorganisms. *Canad. J. Microbiol.* 16: 1023, 1970.
- Jones, L.R.: *Bacillus carotovorus* n.sp., die Ursache einer weichen Fäulnis der Möhre. *Cbl. Bakt.* II. Abt. 7: 12, 1901.
- Jones, L.R.: The cytolytic enzyme produced by *Bacillus carotovorus* and certain other soft rot bacteria. *Cbl. Bakt.* II. Abt. 14: 257, 1905.
- Kertesz, Z.I.: Pectic enzymes. V. The fate of pectins in the animal body. *J. Nutrition* 20: 289, 1940.
- Lajudie, J. & Dumanoir, V.C.: Recherche de l'activité pectinolytique chez le genre *Bacillus*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 127 A: 423, 1976.
- McCoy, E. & Peterson, W.H.: The use of pectin in fermentation tests. *J. infect. Dis.* 43: 475, 1928.
- Nagel, C.W. & Wilson, T.M.: Pectic acid lyases of *Bacillus polymyxa*. *Appl. Microbiol.* 20: 374, 1970.

- Ottow, J.C.G.: Pectinolytic-, ureolytic-, and lecithinolytic activity as a diagnostic aid in the identification of species classified in the genus *Bacillus* Cohn. Zbl. Bakt. II. Abt. 127: 301, 1972.
- Riesen, V.L. von: Polypectate digestion by *Yersinia*. J. clin. Microbiol. 2: 552, 1975.
- Riesen, V.L. von: Pectinolytic, indole-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*. Int. J. system. Bact. 26: 143, 1976.
- Schneider, E.C.: A nutrition investigation on the insoluble carbohydrates or marc of the apple. Amer. J. Physiol. 30: 258, 1912.
- Starr, M.P.: The causal agent of bacterial root and stem disease of guayule. Phytopathology 37: 291, 1947.
- Starr, M.P. & Nasuno, S.: Pectolytic activity of phytopathogenic xanthomonads. J. gen. Microbiol. 46: 425, 1967.
- Starr, M.P. & Chatterjee, A.K.: The genus *Erwinia*: enterobacteria pathogenic to plants and animals. Ann. Rev. Microbiol. 26: 389, 1972.
- Steinhaus, J.E. & Georgi, C.E.: The effect of pectin, galacturonic acid and alpha methyl galacturonate upon the growth of Enterobacteriaceae. J. infect. Dis. 69: 1, 1941.
- Steinigeweg, R. & Ottow, J.C.G.: Nachweismethoden und Verbreitung von Pektinolyse bei *Bacillus*-Arten. Z. allg. Microbiol. 14: 419, 1974.
- Werch, S.C., Jung, R.W., Day, A.A., Friedmann, T.E. & Ivy, A.C.: The decomposition of pectin and galacturonic acid by intestinal bacteria. J. infect. Dis. 70: 231, 1942.
- Winogradsky, S.: Sur le rouissage du lin et son agent microbien. C.R. Acad. Sci. (Paris) 121: 742, 1895.
- Zucker, M. & Hankin, L.: Inducible pectate lyase synthesis and phytopathogenicity of *Pseudomonas fluorescens*. Canad. J. Microbiol. 17: 1313, 1971.

## Kapitel 26

### Prøve for 3-ketolaktosedannelse

Prøven påviser omdannelse af laktose til 3-ketolaktose, en omdannelse som skyldes enzymet hexopyranosid:cytokrom c oxidoreduktase.

#### 1. Historisk indledning

To belgiske biokemikere, Bernaerts og de Ley, har angivet denne prøve i 1963. Især de Ley har i mange år interesseret sig både for bakteriers kulhydratstofsifte og for resultaternes udnyttelse i bakterieklassifikationen. I 1958 opdagede de, at to bakterier isoleret fra flodvand var i stand til at omdanne disakkariderne laktose og maltose til stærkt reducerende forbindelser, som de identificerede som henholdsvis 3-ketolaktose og 3-ketomaltose (Bernaerts & de Ley 1960a, b). De to bakterier blev tentativt identificeret som hørende til slægten *Alcaligenes*, men da systematisk undersøgelse for produktion af 3-ketolaktose af et stort antal kendte arter viste, at *Agrobacterium tumefaciens* og *Agrobacterium radiobacter* var de to eneste arter, som var i stand til at fremkalde denne omdannelse, sluttede de med god grund, at flodvandsisolaterne også var agrobakterier (Bernaerts & de Ley 1963).

Da påvisning af 3-ketolaktose kan udføres på simpel måde ved hjælp af Fehling's væske, og da *Agrobacterium tumefaciens* er en plantepatogen bakterie af økonomisk betydning, som det hidtil kun har været muligt at identificere med sikkerhed ved langvarige inokulationsforsøg på planter, foreslog de i 1963 en 3-ketolaktose test, der kunne anvendes som en hurtig prøve til identifikation af *A. tumefaciens* og *A. radiobacter* (det er sandsynligt, at den plantepatogene art *A. tumefaciens* er en plasmidbærende variant af den ikke-patogene *A. radiobacter*).

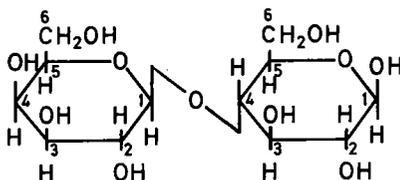
Senere undersøgelser (Hendrie et al. 1964; Beaud & Manigault 1966; Lautrop 1967; Kersters et al. 1973; Riley & Weaver 1977) har bekræftet, at med få undtagelser giver *A. tumefaciens* og *A. radiobacter* altid en positiv 3-ketolaktoseprøve. Andre, fx. Grebner et al. (1964), Kern (1966) og Clark (1969) har sat spørgsmålstegn ved, om disse bakterier er de eneste, der giver en positiv reaktion, men de har undersøgt så få stammer, at man må afvente yder-

ligere undersøgelser. I diagnoseafdelingen har Brita Bruun (upubliceret) fundet nogle 3-ketolaktose-positive stammer i et større materiale af såkaldt *Flavobacterium*, men den taxonomiske betydning af dette fund er endnu uafklaret.

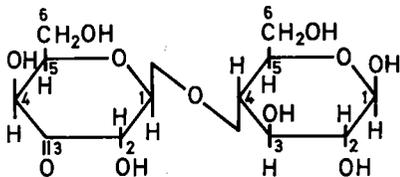
Da Bernaerts & de Ley i 1958 påviste 3-ketoglykosiderne, var disse glykosider så godt som ukendte. De har siden i fødevarerindustrien fået en vis betydning som antioxiderende midler, og nu fremstilles de industrielt (Tyler & Nakamura 1971).

## 2. Biokemisk baggrund

Disakkaridomdannelse indledes hyppigst med en spaltning af glykosidbindingen, så monosakkariderne frigives, men der kendes to eksempler på omdannelse, som sker uden at glykosidbindingen spaltes. Det ene er omdannelse af disakkaridet til de tilsvarende bionsyrer, og det andet er omdannelse til de tilsvarende 3-ketoglykosider.



LAKTOSE



3 - KETOLAKTOSE

Efter ovenstående formler for laktose og 3-ketolaktose kan man se, at ændringer i disakkaridet sker ved C<sub>3</sub> atomet i glykosyldelen, og at ændringen består i en oxidation (fjernelse af to brintatomer), således at der på dette sted dannes en ketogruppe; heraf fremgår navnet 3-ketolaktose.

Den mest karakteristiske egenskab ved 3-ketolaktose er en meget kraftig reducerende evne, så kraftig at Fehling's eller Benedict's væske reduceres ved almindelig temperatur, mens de reducerende sukkerarter ellers kræver opvarmning af blandingen for at reduktion skal foregå.

Denne kraftige reducerende evne udnyttes til at påvise, om omdannelsen af laktose til 3-ketolaktose har fundet sted, idet man flyder den laktoseholdige plade, hvor reaktionen foregår, med et tyndt lag Benedict's reagens.

Det er en alkalisk kobbersulfatopløsning i natriumcitrat, der holder kobberjernerne i opløsning, mens Fehling's væske er alkalisk kobbersulfat i en kaliumnatriumtartratopløsning. Hvis der er 3-ketolaktose til stede, vil kobberjernerne i reagenset udskilles som kuprioxyd ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), der er et rødt stof, og på den blå baggrund, som skyldes det kobbersulfatholdige reagens, vil udfældet kuprioxyd vise sig som en gul plet svarende til det område, hvor der er dannet 3-ketolaktose.

Bernaerts & de Ley (1960a, b) viste, at der kan dannes 3-ketoglykosider af både laktose og maltose og desuden af laktobionsyre og maltobionsyre, men prøven er baseret på laktose, fordi det er let tilgængeligt modsat bionsyrerne, og fordi der af maltose kun dannedes små mængder 3-ketomaltose. Tyler & Nakamura (1971) har senere vist, at ved industriel fremstilling af 3-ketoglykosider giver maltose et godt udbytte. Fukui & Hochster har i 1965 påvist dannelse af 3-ketosakkarose ud fra sakkarose.

De Ley & van Beeuman (1966) har renfremstillet den dehydrogenase, der katalyserer omdannelsen. Det er et flavoenzym kaldet hexopyranosid: cytochrom c oxidoreduktase. Det fremgår ikke, om enzymet er adaptivt, men ved prøvens udførelse er cellerne i kontakt med laktosen i 48 timer, før reagenset tilsættes. Bernaerts & de Ley (1967) viste, at reaktionsforløbet er ret upåvirket af pH værdien i mediet inden for grænserne pH 6–8. De mener, at et medium uden buffer med pH 6,5–6,7 er lidt bedre end et medium med fosfatbuffer, fordi der er vanskeligheder ved sterilisering af laktoseholdige medier med buffer. Ved pH over 7,5 sker der nogen nedbrydning af 3-ketolaktosen. Agrobakterierne, der giver en positiv 3-ketolaktoseprøve, vil ofte samtidig udføre en spaltning af glykosidbindingen, så der også dannes glukose og galaktose. Hos Tyler & Nakamura (1971) finder man data af relevans for maximumproduktion af 3-ketomaltose, og formodentlig har disse data også betydning for forståelse af optimale betingelser for udførelse af 3-ketolaktoseprøven, selv om produktionen er baseret på en voksende kultur, mens prøven repræsenterer et hvilende system. De lægger vægt på, at pH holdes mellem 6,5 og 7,5; de finder, at en temperatur på  $28^\circ\text{C}$  er gunstig modsat en temperatur på  $35^\circ\text{C}$ , og de anbefaler urinstof som kvælstofkilde og opnår herved samtidig den fordel, at pH holder sig mellem 7,0 og 7,5 uden buffer. De finder maximal ophobning efter 18–20 timer og derefter gradvis svind af 3-ketomaltosen.

### 3. Valg af metode

Der er foreløbig ikke store valgmuligheder. Clark (1969) angiver hvad han kalder en modificeret og forbedret 3-ketolaktosetest, men da man af artiklen ikke kan se, hvori forbedringen består, og substratmodifikationen væsentligst udgøres af en højere koncentration af gærekstrakt (0,5% i stedet for 0,1%) og tilsætning af 1%  $\text{CaCO}_3$ , er der i øjeblikket ikke grund til at afvige fra Bernaerts & de Ley's oprindelige metode.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Bernaerts & de Ley's 3-ketolaktoseprøve (1963)*

#### *Substrater*

##### *Vækstsubstrat*

Difco gærekstrakt	1 g
Glukose	2 g
$\text{CaCO}_3$	2 g
Agar	1,5-2,0 g
Dest. vand	100 ml
Ophældes som skrå-agar.	

##### *Reaktionssubstrat*

Difco gærekstrakt	0,1 g
Laktose	1,0 g
Agar	2 g
Dest. vand	100 ml
Ophældes i Petriskål.	

#### *Reagens*

Benedict's reagens som består af:

Natriumcitrat	17,3 g
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ , anhyd.	10,0 g
$\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$	1,73 g
Dest. vand	100 ml

### *Udførelse*

En skrå-agar indeholdende vækstmediet tilsås fra en frisk renkultur, så størstedelen af substratoverfladen dækkes. Skråglasset inkuberes ved 25–30°C i 1–2 dage. 1 dag er tilstrækkeligt, hvis der fra glasset kan høstes to store øskendefulde.

Den høstede kulturmasse overføres umiddelbart til reaktionssubstratet, hvor det placeres som en lille forhøjning stablet så højt som muligt på et areal, der ikke er over  $\frac{1}{2}$  cm i diameter. Der kan på denne måde undersøges 4–6 stammer i en lille Petriskål.

Reaktionsmediet med påsat kultur henstilles ved 28–30°C i 1–2 dage, inden reagenset påhældes. Da vi ingen sikker viden har om den optimale tid for reaktionens forløb, kan det anbefales at fremstille to plader og flyde den ene med reagens efter 24 timer og den anden efter 48 timer.

Princippet i prøven svarer nærmest til det velkendte i en direkte enzymtest, hvor de aktive celler produceres på vækstmediet og derefter overflyttes til kontakt med enzymsubstratet (laktose) på reaktionsmediet. Grunden til at enzymsubstratet findes i en plade i stedet for i opløsning i et reagensglas er bl.a., at man derved på en nem måde opnår den rigelige tilgang af luftens ilt, som processen kræver.

Før reagenset sættes til reaktionspladen kan det af hensyn til aflæsningen være hensigtsmæssigt at fjerne kulturmassen fra pladens overflade ved hjælp af en pødepind med vat. Benedict's reagens kan påhældes direkte fra flasken og skal ligge i et tyndt lag (ca. 1–2 mm) ud over hele overfladen. Pladen skal henstå med reagenset i mindst 1 time ved stuetemperatur, inden den endelige aflæsning finder sted.

*Aflæsning:* Der observeres for fremkomst af grøngule til gule pletter i den af reagenset blåfarvede plade. Farveomslaget ved positiv reaktion indtræder gradvis; det begynder svarende til de steder, hvor kulturmassen har været anbragt og breder sig koncentrisk udefter, så pletterne kan blive flere centimeter i diameter. I begyndelsen er farven grøngul, men som regel bliver den mere og mere gul. Pletternes afgrænsning mod det omgivende medium står ikke som en skarp rand, men farven toner gradvis over i den blå baggrundsfarve. Afhængigt af reaktionens styrke kan det vare kortere eller længere tid, inden pletterne dukker frem; efter ca. 20 minutter vil man i næsten alle tilfælde kunne se, om en reaktion vil blive positiv, men styrken vil som regel tiltage yderligere efter dette tidspunkt. Ret arbitrært er 1 time sat som grænse for den endelige aflæsning.

*Fortolkning:* Alle tydelige pletter fremkommet efter 1 time er, uanset deres størrelse og farvenuance, udtryk for en positiv reaktion. Man kan naturligvis gradere styrken efter pletternes diameter, men nogen diagnostisk betyd-

ning har det så vidt vides ikke. Pletter, der er så svagt antydet, at man er i tvivl om fortolkningen, må kunne forekomme. Et nyt forsøg med en større cellekoncentration på pladen kan anbefales i et sådant tilfælde.

### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Benedict's reagens er dels ætsende på grund af dets alkali-indhold og dels giftigt på grund af dets indhold af kobbersulfat. Kobbersulfat er også en bakteriegift og vil antagelig dræbe alle bakterier på reaktionspladen, således at infektionsrisikoen er væk fra det øjeblik reagenset er hældt på.

### 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Af den historiske indledning fremgår, at prøven endnu er så ny, at der mangler en systematisk afprøvning af mange bakteriegrupper. Hvad man indtil nu med sikkerhed ved, er, at næsten alle stammer af *Agrobacterium radiobacter* og *A. tumefaciens* giver en positiv reaktion. De ketolaktose-positive "flavobakterier", der er fundet i diagnoseafdelingen, er ikke altid gule; de er udtalt sakkarolytiske, og det kan ikke udelukkes, at de hører hjemme i slægten *Agrobacterium*. I slægten *Alcaligenes* eller, som nogle siger, *Achromobacter*, der vil kunne give anledning til forveksling med agrobakterier ved en overfladisk undersøgelse, har man hidtil ikke fundet arter, som giver en positiv 3-ketolaktoseprøve.

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven er først og fremmest af praktisk værdi for jordbunds bakteriologer og plantepatologer, men da agrobakterier undertiden også findes i kliniske prøver og som nævnt kan ligne *Alcaligenes*, kan prøven i sjældne tilfælde også være nyttig i det klinisk-bakteriologiske laboratorium. Her er det vigtigt at vide, dels at enkelte stammer af *A. radiobacter* og *A. tumefaciens* er negative,, dels at *A. rhizogenes*, der også er fundet i kliniske prøver, altid er negativ, hvis prøven udføres som her beskrevet (Lautrop 1967; Kesters et al. 1973).

## 8. Referencer

- Beaud, G. & Manigault, P.: Propriétés physiologiques de différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town) Conn. Ann. Inst. Pasteur *111*: 345, 1966.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: Microbiological formation and preparation of 3-ketoglycosides from disaccharides. J. gen. Microbiol. *22*: 129, 1960a.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: The structure of 3-ketoglycosides formed from disaccharides by certain bacteria. J. gen. Microbiol. *22*: 137, 1960b.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: A biochemical test for crown gall bacteria. Nature (Lond.) *197*: 406, 1963.
- Bernaerts, M.J. & Ley, J. de: Mechanism of the 3-ketolactose test for *Agrobacterium*. Arch. Mikrobiol. *56*: 81, 1967.
- Clark, A.G.: A selective medium for the isolation of *Agrobacterium* species. J. appl. Bact. *32*: 348, 1969.
- Fukui, S. & Hochster, R.M.: On the active transport of sucrose and of 3-ketosucrose in *Agrobacterium tumefaciens*. Cand. J. Biochem. *43*: 1129, 1965.
- Grebner, E.E., Durbin, R. & Feingold, D.S.: Formation of  $\beta$ -D-fructofuranosyl- $\alpha$ -D-ribohexopyranoside-3-ulose by a *Micrococcus* sp. Nature (Lond.) *201*: 419, 1964.
- Hendrie, M.S., Hodgkiss, W. & Shewan, J.M.: Considerations on organisms of the *Achromobacter-Alcaligenes* group. Ann. Inst. Pasteur Lille *15*: 43, 1964.
- Kern, H.: Zum Nachweis der Virulenz bei *Agrobacterium tumefaciens*. Arch. Microbiol. *53*: 92, 1966.
- Kerstens, K., Ley, J. de, Sneath, P.H.A. & Sackin, M.: Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. J. gen. Microbiol. *78*: 227, 1973.
- Lautrop, H.: *Agrobacterium* spp. isolated from clinical specimens. Proc. XV. Scand. Congr. Path. Bact. Copenhagen, June 19-22, 1967. Acta path. microbiol. scand. Suppl. *187*: 63, 1967.
- Ley, J. de & van Beeumen, J.: The aldo-hexose dehydrogenase from *Agrobacterium*. IX. Int. Congr. Microbiol. Moscow, July 24-30, 1966 (Abstracts).
- Riley, P.S. & Weaver, R.E.: Comparison of thirty-seven strains of Vd-3 bacteria with *Agrobacterium radiobacter*: Morphological and physiological observations. J. clin. Microbiol. *5*: 172, 1977.
- Tyler, D.D. & Nakamura, L.K.: Conditions for production of 3-ketomaltose from *Agrobacterium tumefaciens*. Appl. Microbiol. *21*: 175, 1971.

## Kapitel 27

### Prøver for dextran- og levandannelse

Prøver der påviser de bakterielle enzymer levansukrase og/eller dextransukrase, som i sakkaroseholdige medier fører til dannelse af polysakkariderne levan og/eller dextran.

#### 1. Historisk indledning

Studiet af såkaldte viskøse gæringer karakteriseret ved dannelse af slim- eller gummiagtige stoffer går tilbage til begyndelsen af 1800-tallet. At de skyldes mikroorganismer, blev først hævdet af Pasteur (1861) og senere af Jubert (1874) og Mendes (1875), som særligt beskæftigede sig med deres forekomst i sukkerraffinaderier, hvor man hyppigt var generet af disse slimmasser, som tilstoppede filtre og rørledninger (cit. efter van Tieghem 1878). I 1874 havde Scheibler vist, at slimen i sukkerfabrikkerne bestod af polysakkaridet dextran (cit. efter van Tieghem 1878), og i 1878 isolerede Cienkowski i Lenin-grad og van Tieghem i Paris uafhængigt af hinanden den skyldige bakterie, som af van Tieghem fik navnet *Leuconostoc mesenteroides* (van Tieghem 1878). Bakterierne var omgivet af store slimkapsler, så de i mikroskopet lignede en klump frøæg; deraf kommer det tyske navn Froschlauchpilz. Liesenberg & Zopf (1892) var de første, som arbejdede med renkulturer af *L. mesenteroides*, og de viste, at når bakterierne dyrkes på sakkarosefri medier, dannes der ikke slimkapsler, og de ligner da almindelige streptokokker.

Det andet polysakkarid, levan, er først beskrevet af kemikeren Lipmann i 1881 (cit. efter Harrison et al. 1930), og i 1901 isolerede og beskrev Greig Smith i Australien fra rørsukker en polysakkariddannende *Bacillus*, hvor slimen blev identificeret som levan (Steel 1901).

I 1912 publicerede Beijerinck et grundlæggende arbejde om levan- og dextrandannelse hos bakterier. Han viste, at der var flere forskellige *Bacillus*-arter, som dannede levan, og beskrev en ny dextrandannende bakterie, *Lactococcus dextranicus*, senere omdøbt til *Leuconostoc dextranicum*. Han fastslog, at sakkarose og raffinose var de eneste blandt de almindeligt forekommende kulhydrater, som gav anledning til levan- og dextrandannelse, og han

beskrev med mange detaljer de forskellige sakkarosekulturers udseende. Deraf mente han bl.a. at kunne udlede, at dextranenzymet altid er cellebundet, mens levanenzymet også forekommer i fri, diffusibel form, hvilket medfører, at der på en sakkaroseholdig plade kan optræde kolonilignende slimhobe, der ikke indeholder bakterier. I flydende medier med dextran og levan iagttog han en tydelig opalescens.

De første polysakkariddannende bakterier af human oprindelse er beskrevet af Hlava i Prag (1902). Han fandt, at der i svælgpodninger både fra syge og sunde hyppigt fandtes bakterier, som dannede store slimkapsler når de dyrkedes på sakkaroseholdige plader. Jeppe Ørskov på Serum instituttet (1930) og Ørskov & Poulsen (1931) genopdagede de dextrandannende bakterier fra svælget, og i forlængelse af disse arbejder viste F.E. Koch (1933/34, 1935), at de fandtes i den normale mundflora. Hlava betegnede sine bakterier som *Leuconostoc hominis*, mens Ørskov regnede sine til streptokokkerne. Koch mente ikke, der var så stor forskel mellem mundhulestammerne og de fra sukkerfabrikkerne kendte stammer, at de burde henregnes til forskellige slægter. En afklaring på dette punkt var dog allerede sket takket være en meget grundig undersøgelse af Hucker & Pederson (1930), der viste, at *Leuconostoc* var forskellig fra både streptokokker og lactobaciller, og at der trods de mange beskrevne arter i litteraturen under forskellige navne kun var to forskellige arter af *Leuconostoc* karakteriseret ved dextrandannelse: *L. mesenteroides* og *L. dextransicum*.

Inspireret af Ørskovs arbejder opdagede Niven og hans medarbejdere i 1941, at de hyppigt forekommende svælgstreptokokker, som dannede mucoide kolonier på sakkaroseplader var den tidligere beskrevne *Streptococcus salivarius*. Ved samme lejlighed blev det vist, at en enkelt stamme af *S. bovis* havde samme egenskab (Niven et al. 1941a, b; Sherman et al. 1943). Da man lidt senere gik over til at undersøge for dextran- og levandannelse i flydende medier, viste det sig, at mange flere bovisstammer var dextrandannende, og at det samme gjaldt nogle stammer af *S. mitis* (senere har disse dextrandannende stammer fået betegnelsen *S. mitior*) og en ny endocarditis fremkaldende art, *S. sanguis*, der var identisk med nogle tidligere undersøgte gruppe H streptokokker (Niven & White 1946; Niven et al. 1946; White & Niven 1946; Hehre & Neill 1946; Niven et al. 1948). Langt senere er det vist, at også *Streptococcus mutans* hører til de polysakkariddannende streptokokker.

I samme tidsrum klarlagdes en lang række forhold vedrørende streptokokpolysakkaridernes dannelse og egenskaber, især takket være arbejder af Hehre og hans medarbejdere i USA. Det blev først vist, at levan og dextran var antigenene og kunne påvises og skelnes serologisk, hvilket i høj grad lettede undersøgelseerne. Enzymaktiviteten i cellefri suspensioner blev påvist og syntesens

biokemi klarlagt. Det blev endvidere vist, at hverken dextran eller levan var et i fysisk-kemisk henseende enkelt veldefineret stof, men at hvert af dem omfattede flere varianter med noget vekslende egenskaber, afhængigt af den anvendte stamme og dyrkningsbetingelserne, og at nogle arter, som fortrinsvis producerede den ene polymer, samtidig dannede små mængder af den anden. Den begunstigende indflydelse anaerobiose og/eller CO<sub>2</sub>-tilsætning har på polysakkariddannelsen hos nogle arter af streptokokker blev også påvist og forklarede diskrepansen mellem undersøgelser udført på plade og i flydende kultur (se Hehre et al. 1945; Hehre 1946; Hehre & Neill 1946; Dain et al. 1956; Baily & Oxford 1958).

I 1959 foretog Fuchs i Leyden en større undersøgelse over forekomsten af levandannelse hos bakterier. Blandt 25 forskellige genera var 10 i stand til at danne levan. Særlig hyppig var forekomsten i slægten *Pseudomonas*, hvor dels *P. fluorescens* dels mange plantepatogene arter var positive, et resultat som senere er bekræftet af Jessen (1965) og Stanier et al. (1966). Andre arbejder, der rapporterer om levan- og dextrandannende bakterier, er Jeanes et al. (1954), Hestrin (1962), Sutherland (1972) og Sidebotham (1974).

Påvisning af mucoide kolonier på sakkroseagar er i sig selv ikke tilstrækkelig evidens for, at en stamme danner levan eller dextran; polysakkaridet må analyseres nærmere. Fx. angav Sutherland, at en bestemt *Xanthomonas* dannede levan, men senere er det vist, at der er tale om et hetero-polysakkarid (Stanier et al. 1976). Flere *Neisseria*-arter danner også polysakkarid på en sakkroseplade (Berger 1963), og analysen viser, at det udelukkende består af glukosemolekyler ligesom dextran, men da jodprøven er positiv hører stoffet til stivelses-glykogengruppen. Skønt påvisningen af dette polysakkarid udnyttes diagnostisk, kan undersøgelsen ikke regnes blandt levan- og dextranprøverne.

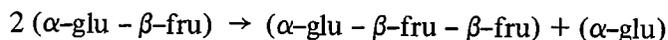
Dextran har fundet anvendelse på forskellig måde og produceres derfor industrielt. Dels anvendes det siden 1944 som en bestanddel af transfusionsvæsker, dels benyttes det ved søjlekromatografi (fx. Sephadex) til adskillelse af stoffer med forskellig molekylvægt. Talrige studier af disse stoffer og deres dannelse er siden 1960'erne udsprunget af arbejdet med at finde årsagen til tandsygdommen caries. Dannelsen af såkaldte plaque på tænderne anses nu for at være udgangspunkt for caries, og det er vist, at plaquedannelsen øjensynlig er knyttet til bakteriernes evne til at danne levan eller dextran. Interessen har særlig samlet sig om de to streptokokarter *S. mutans* og *S. sanguis* og bakterien *Actinomyces viscosus*, som også er dextrandanner (se fx. Gibbons & Banghart 1967; Facklam 1974; Montville et al. 1977 og Warner og Miller 1978).

## 2. Biokemisk baggrund

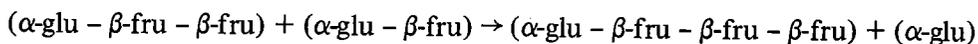
De kapsler eller den ekstracellulære slim, som mange bakterier danner, er næsten alle polysakkarider. De fleste er heteropolysakkarider, dvs. de indeholder to eller flere forskellige monosakkarider bygget sammen på en måde, som er karakteristisk for hvert polysakkarid. Heteropolysakkarider syntetiseres under energiforbrug af cellens normale metaboliske apparat og er stort set uafhængige af, hvilke kulhydrater der er til stede i vækstsustraterne.

De to polysakkarider dextran og levan dannes på en hel anden måde og er desuden såkaldte homopolysakkarider, dvs. lange kæder opbygget af kun én slags monosakkarider, dextran af glukosemolekyler og levan af fruktosemolekyler. Dannelsen er for det første betinget af tilstedeværelsen af et specielt enzym – dextransukrase eller levansukrase – for det andet af at der i vækstsubstratet findes sakkrose eller raffinose, da ingen andre kulhydrater kan danne udgangspunkt for syntesen. Det er et særligt og usædvanlig træk, at syntesen sker uden energiforbrug; forklaringen herpå er, at den energi som findes bundet i sakkrosens glykosidbinding, umiddelbart kan overføres til den ny glykosidbinding, som skal dannes hver gang der under syntesen føjes et nyt led til kæden. Denne syntesemekanisme forklarer, hvorfor monosakkarider ikke kan være udgangspunkt for syntesen: de mangler den glykosidbinding energien skal tages fra. Det forhold, at dextran og levan kun dannes i sakkroseholdige medier, men ikke i glukose- eller fruktoseholdige, er af praktisk betydning, da det herved bliver muligt på en nem måde at skelne dem fra heteropolysakkarider, som vil kunne dannes på begge slags medier. Man skal dog ikke overse muligheden for, at en given stamme foruden levan eller dextran kan danne et heteropolymer eller glemme, at *Neisseria*-stammernes slimdannelse også specielt er betinget af tilstedeværelsen af sakkrose.

Syntesen af fx. levan kan illustreres ved hjælp af følgende formler, idet sakkrose som består af  $\alpha$ -glukose +  $\beta$ -fruktose, skrives som ( $\alpha$ -glu- $\beta$ -fru). Først omdannes 2 molekyler sakkrose af enzymet levansukrase til den begyndende kæde ved at fruktosedelen af det ene molekyle kobles til fruktosedelen af det andet, mens den tiloversblevne glukosedel frigøres:



Næste trin i syntesen foregår på samme måde ved at fruktosedelen af et nyt sakkrose molekyle overføres til kæden, mens glukosedelen frigøres som glukose:



Af disse formler kan man se, at det ikke er helt korrekt at betragte levan som en polymer udelukkende bestående af fruktoseenheder; der vil nemlig altid være et enkelt terminalt glukosemolekyle. Ved dextransyntese dannes efter samme mønster kæder af sammenkoblede glukoseenheder med en enkelt terminal fruktoseenhed, mens der i øvrigt frigøres frie fruktosemolekyler (se Stanier et al. 1976).

Bindingerne i levanets hovedkæde er altid (2→6) og i dextranets (1→6), men fra begge slags hovedkæder vil der som regel afgå kortere eller længere sidegrene fra bestemte positioner, så det enkelte polysakkarid indeholder et varierende antal af andre bindinger. Dette forhold har bl.a. været udnyttet til karakteristik af forskellige dextraner (Jeanes et al. 1954). Kædelængden er stærkt varierende, dels stammebestemt dels miljøbestemt. I dextran varierer molekylvægten fra 15.000 til 20.000.000. I vandig opløsning vil kæderne indgå i et tredimensionalt netværk, som bestemmer karakteren af den gel, som dannes, og stoffets større eller mindre vandopløselighed (Sidebotham 1974). Dextran og levan er optisk aktive, dvs. i stand til at dreje polariseret lys, og navnene er afledt af denne drejningsevne, idet levan drejer det polariserede lys til venstre (lat. *levo* = venstre), og dextran drejer det til højre (lat. *dextra* = højre).

Dextran- og levansukrase hører til enzymgruppen glykosyltransferase, som generelt medvirker til at overføre en kulhydrat-monomer fra et bestemt donormolekyle til et andet bestemt acceptormolekyle. Da samme enzym kan formidle overførelsen mellem forskellige donorer og acceptorer, er forløbet i et givet system ret uoverskueligt. Dette kan være forklaringen på, at enzymprodukterne ikke er ens i alle detaljer, men uensartetheden kunne også skyldes, at de enkelte bakterier indeholder et kompleks af enzymer med lidt varierende affinitet for bestemte donorer og acceptorer.

Enzymerne kan findes dels ekstracellulært dels bundet til cellerne, og de kan være adaptive eller konstitutive (Fuchs 1959). Det første forhold påvirker koloniernes udseende på faste substrater, som allerede bemærket af Beijerinck; men for koloniudseendet spiller det også en rolle, om bakterierne samtidig danner levan- og dextranspaltende enzymer, hvilket kan være tilfældet både hos *Pseudomonas* og *Bacillus* (Fuchs 1959). Helt nye iagttagelser synes at vise, at enzymaktiviteten øges i nærvær af fosfoglycerider, specielt lysofosfatidylkolin, en iagttagelse som også er gjort med andre membranbundne enzymer (Harlander & Schachtele 1978). Både pH- og temperaturoptimum for syntesens forløb varierer meget i forskellige systemer.

Til kvantitativ bestemmelse af enzymaktiviteten anvendes i biokemien for dextransukrases vedkommende titrering af den frigjorte fruktosemængde i reaktionsblandingen. Bestemmelse af levansukraseaktivitet er kompliceret

af, at der samtidig med syntesen altid sker hydrolytisk spaltning af en vis mængde sakkarose, hvorfor det er nødvendigt først at udfælde den dannede levan med alkohol og derpå efter syrehydrolyse at bestemme fruktosemængden. Semikvantitative metoder er baseret på påvisning af viskositetsændringer, opalescens, serologisk aktivitet og forekomst af alkoholpræcipiterbart materiale. Til kvalitativ påvisning i bakteriologien nøjes man med kulturernes udseende (mucoid vækst på plader og geldannelse i flydende kulturer) eller dannelse af et alkoholpræcipitat i flydende kulturer.

### 3. Valg af metode

En sakkaroseholdig bouillonagarplade, hvor kulturens mucoide karakter umiddelbart kan erkendes, er velegnet og tilstrækkelig ved undersøgelse af stammer af *Leuconostoc*, *Bacillus* og *Pseudomonas*.

Ved undersøgelse af streptokokker anvender man serumagar tilsat 5% sakkarose inkuberet både i almindelig atmosfære og under anaerobe forhold med tilsætning af ekstra CO<sub>2</sub>. Desuden anvendes et flydende sakkarosemedium, hvor dels kulturens udseende og konsistens dels fældning med alkohol i to forskellige mængdeforhold kan give oplysning om, hvorvidt polysakkaridet er levan eller dextran. Metodebeskrivelsen omfatter tre procedurer, nemlig anvendelse af:

- (1) Bouillonagarplade med 5% sakkarose
- (2) Serumagarplade med 5% sakkarose
- (3) Acetat-bufferet bouillon med 8,5% sakkarose

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Metode (1): Bouillonagarplade med 5% sakkarose, især til undersøgelse af pseudomonader*

*Substrat:* Den sædvanlige bouillonagar tilsat 5% sakkarose og en tilsvarende kontrolplade tilsat 5% glukose.

*Udførelse:* Tilsåning med ca. 24 timer gammel renkultur på en sådan måde, at der dannes enkeltliggende kolonier. Inkubation i almindelig atmosfære og ved stammens optimale væksttemperatur; til pseudomonader vælges stuetemperatur eller 30°C.

*Aflæsning og fortolkning:* Daglig aflæsning i indtil 4 dage med inspektion af enkeltkolonierne makroskopisk og evt. under mikroskopet med lav for-

størrelse. Levandannende pseudomonader danner i løbet af nogle dage kolonier, som er betydeligt større på sakkrosepladen end på glukosepladen; de er stærkt kuplede og konsistensen som en fast gelé. Under mikroskopet iagttages i kolonierne et karakteristisk mønster bestående af radiære strøg af næsten cellefri polysakkarid skiftende med strøg, der indeholder mer eller mindre tætlejrede bakterier. I kolonier af ikke-levandannende bakterier vil bakterierne alle vegne ligge tæt sammenpakket. Levandannelse kan påvises noget tidligere ved mikroskopisk undersøgelse end ved makroskopisk inspektion.

*Metode (2): Serumagarplade med 5% sakkrose, især til undersøgelse af streptokokker*

*Substrat:* Til bouillonagar tilsættes 5% sakkrose og 5% sterilt hesteserum. Som kontrolsubstrat anvendes i streptokokafdelingen en 5% blodagarplade med særligt henblik på streptokokker, der danner hyaluronsyre. En yderligere kontrolplade af serumagar tilsat 5% glukose kan anbefales.

*Udførelse:* Tilsåning med 24 timer gammel renkultur, så der dannes enkeltliggende kolonier. Inkubering ved 35°C i CO<sub>2</sub>-holdig krukke. Hvis der efter 24 timers inkubation ikke er tegn på polysakkariddannelse, overflyttes pladen til en anaerob krukke med 10% CO<sub>2</sub>, og der inkuberes yderligere i 3 døgn før endelig aflæsning.

*Aflæsning og fortolkning:* Kolonier af polysakkarid-dannende streptokokker ser forskellige ud. Kolonier af *S. salivarius* er typisk kuplede og mucoide, kolonier af *S. bovis* er typisk henflydende og vandige, og kolonier af *S. sanguis* og *S. mutans* er typisk tørre, hårde og adhærente. Der kan være ret store afvigelser fra det typiske udseende, især efter kun 1 døgn inkubation, men ved fortsat inkubation bliver udseendet mere karakteristisk; afgørende er en forskel i udseende på sakkrosepladen og kontrolpladen. Hyaluronsyredannende streptokokker vil være mucoide både på sakkrosepladen og på blodpladen uden sakkrose. Udvikling af de enkelte arters typiske kolonier begunstiges af en bestemt inkubationsatmosfære: *S. salivarius* foretrækker atmosfærisk luft, *S. sanguis* anaerob atmosfære og *S. mutans* og *S. bovis* atmosfærisk luft tilsat ekstra CO<sub>2</sub>. Resultatet af observationerne på plade sammenholdes med udfaldet af dyrkning i flydende medium med sakkrose.

*Metode (3): Sakkarsebouillon med acetatbuffer, især til undersøgelse af streptokokker* (efter Baily & Oxford 1958, cit. hos Colman 1970)

*Substrat*

Trypton (Oxoid)	1,4%
Gærekstrakt (Oxoid)	0,5%
Sakkarose (sterilfiltreret)	8,5%
Natriumacetat	2,0%
Kaliumcarbonat (sterilfiltreret)	0,055%

Efter kogning indstilles pH på 7,4. Substratet filtreres. Slut-pH ca. 7,6. 8 ml aftappes i almindelige reagensglas (155 x 14/15 mm). Som kontrolsubstrat et tilsvarende glas, hvor sakkrose er erstattet af glukose.

*Udførelse:* Fra en 24 timer gammel renkultur tilsås prøveglas og kontrolglas rigeligt, og begge inkuberes ved 35–37°C i 5–7 dage.

*Aflæsning direkte:* Tegn på polysakkariddannelse er enten at glassets indhold bliver viskøst, hvilket lettest iagttages ved at ryste glasset, så nogle luftblærer indfanges, eller at der optræder en svag blålig opalescens. Ved fortsat inkubering kan nogle stammer af *S. sanguis* danne en så udtalt gel, at hele glasset får konsistens som et glas med halvflydende agar. Polysakkariddannelse, der ikke markerer sig tydeligt ved direkte inspektion af glasset, kan evt. iagttages efter centrifugering ved moderat hastighed, hvorved der nedadtil i glasset kan samles en blød gelatinøs masse, som kan udgøre fra 10–90% af substratsøjleens højde. *S. mutans*-polysakkaridet er tilbøjeligt til at klæbe til glassets sider og slynges ikke ned ved centrifugering.

*Aflæsning efter tilsætning af alkohol:* Efter centrifugering af kulturen (5000 omdr./min. i ½ time) laves af supernatanten to fortyndinger med en 10% opløsning af natriumacetat, den ene i forholdet 1:10, den anden 1:100. Den højeste fortynding medtages, fordi der er erfaring for at høje koncentrationer af dextran kan hæmme alkoholudfældningen. Til to glas af fortyndingerne sættes derefter henholdsvis 1,2 ml og 2,5 ml 96% ætylalkohol og glassene henstilles i 3 timer. Udfældningen kan ske umiddelbart i form af en diffus uklarhed i glassene eller indtræde lidt efter lidt. Sker der udfældning i glasset med 2,5 ml alkohol, men ikke i det med 1,2 ml, er det sandsynligt, at det dannede polysakkarid er levan. Sker der udfældning i begge glas, kan udfældningen skyldes dextran alene eller en blanding af dextran og levan. For i dette tilfælde at kunne skelne mellem de to muligheder udføres en kemisk analyse, hvor præcipitatet hydrolyseres med myresyre, og produktet analy-

seres for glukose og fruktose ved hjælp af papirkromatografi. Teknikken som den anvendes i streptokokafdelingen er beskrevet dels i Colman's disputats (1970) dels i Smith (1960). Ved aflæsning efter tilsætning af alkohol medtages altid kontrolglasset, der behandles på samme måde som sakkroseglasset.

*Serologisk påvisning af dextran og levan i flydende sakkrosekulturer:*

Hvis man råder over egnede sera, kan man ved at anvende kultursupernatanten som antigen opnå præcipitationsreaktioner, som kan vise, om dextran og/eller levan er til stede. Streptokokafdelingen anvender af og til pneumokok type 2 antiserum, der giver et præcipitat med dextran.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige ud over de sædvanlige ved håndtering af human-patogene bakterier.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Genus *Pseudomonas*:

*P. fluorescens*, biotype I, II og IV danner levan.

*P. chlororaphis* danner levan.

*P. aureofaciens* danner levan.

*P. syringae* (som samleart rumme den et flertal af de tidligere som individuelle arter beskrevne plantepatogene pseudomonader); de fleste stammer danner levan.

Genus *Xanthomonas*:

Sutherland (1972) angiver, at mange plantepatogene arter af slægten danner levan. I Bergey's Manual 8. udg. nævnes intet om levan eller dextran, men for arterne *X. campestris* (samleart) og *X. fragariae* er det anført, at de danner mucoide kolonier på glukoseagar, hvoraf intet med sikkerhed kan udledes.

Fam. *Enterobacteriaceae*:

Oplysningerne er meget sparsomme. Flere forfattere omtaler stammen *Aerobacter levanicus* (se Fuchs 1959) som aktiv levandanner; dens identitet er usikker, muligvis er det en *Enterobacter liquefaciens*. Fuchs har beskrevet en enkelt stamme af *Serratia kiliensis* som dannede levan. I *Erwinia*-gruppen er de fleste stammer af *E. amylovora* og 3 andre species fra amylovoragruppen levandannere.

Genus *Streptococcus*:

- S. salivarius*: de fleste stammer danner både dextran og levan, det sidste i størst mængde.
- S. mutans*: de fleste stammer danner både dextran og levan, det første i størst mængde.
- S. sanguis*: næsten alle stammer danner dextran og små mængder levan.
- S. bovis*: næsten alle stammer danner dextran.
- S. mitior*: nogle stammer danner dextran.

Genus *Leuconostoc*:

- L. mesenteroides*: danner dextran.
- L. dextranicum* danner dextran.

Genus *Bacillus*:

- B. cereus* danner levan, dog ikke varieteten *mycoides*.
- B. subtilis* danner levan.
- B. pumilus* danner levan.
- B. licheniformis* danner levan.
- B. megaterium* danner levan, men desuden en heteropolymer.
- B. polymyxa*: enkelte stammer danner levan og flertallet en heteropolymer.

Genus *Lactobacillus*:

Sidebotham (1974) nævner 6 arter som danner dextran:

- L. acidophilus*
- L. brevis*
- L. casei*
- L. musicus*
- L. pastorianus*
- L. viridescens*

Bergey's Manual 8. udg. oplyser intet om dextran- og levandannelse. I 7. udgave omtales, at *L. pastorianus* danner en slimproducerende variant, men polysakkaridets natur er ikke oplyst.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Selvstændig diagnostisk værdi har prøven ikke. Dertil kommer, at en sikker påvisning af at dannet polysakkarid er dextran eller levan i de fleste tilfælde kræver et speciallaboratorium med stor erfaring.

I streptokokklassifikationen har dextran- og levandannelse været et værdifuldt kriterium ved den nugældende afgrænsning af arterne *S. salivarius*, *S. sanguis* og *S. mutans*. I rutinediagnostik af streptokokker er prøven nyttig på linie med et antal andre prøver, men den er i mange tilfælde ikke uundværlig, og det bliver således især i diagnostisk vanskelige tilfælde den får betydning.

Ved inddeling af *Pseudomonas fluorescens* i biotyper er det nødvendigt at undersøge stammerne for evne til levandannelse, men da biotypeinddelingen i sig selv er af tvivlsom værdi, er prøvens betydning på dette område ikke stor. Som markør ved epidemiologiske undersøgelser, fx. i hospitalsmiljø, kan påvisning af egenskaben dog være nyttig.

På mange områder er forholdene så dårligt undersøgt, at man for tiden intet kan sige om prøvens anvendelighed.

## 8. Referencer

- Bailey, R.W. & Oxford, A.E.: Pre-requisites for dextran production by *Streptococcus bovis*. *Nature* 182: 185, 1958.
- Beijerinck, M.W.: Die durch Bakterien aus Rohrzucker erzeugten schleimigen Wandstoffe. *Folia Microbiologica*, Delft, I: 377, 1912. (Versamelde Geschriften van M.W. Beijerinck, 5. del, s. 89-110, Delft, 1921).
- Berger, U.: Die anspruchslosen Neisserien. *Ergebn. Mikrobiol.* 36: 97, 1963.
- Cienkowski: Die Gallertbildungen des Zuckerrübensaftes. Charkow 1878.
- Colman, G.: The classification of streptococcal strains. Thesis, London University 1970, p. 18.
- Dain, J.A., Neal, A.L. & Seeley, H.W.: The effect of carbon dioxide on polysaccharide production by *Streptococcus bovis*. *J. Bact.* 72: 209, 1956.
- Facklam, R.R.: Characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and blood. *Int. J. system. Bact.* 24: 313, 1974.
- Fuchs, A.: On the synthesis and breakdown of levan by bacteria. Thesis, Uitgeverij Waltman, Delft 1959.
- Gibbons, R.J. & Banghart, S.B.: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Arch. oral Biol.* 12: 11, 1967.
- Harlander, S.K. & Schactele, C.F.: *Streptococcus mutans* dextansucrase: stimulation of glucan formation by phosphoglycerides. *Infect. Immun.* 19: 450, 1978.
- Harrison, F.C., Tarr, H.L.A. & Hibbert, H.: Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXIII. The synthesis of polysaccharides by bacteria and enzymes. *Canad. J. Res.* 3: 449, 1930.
- Hehre, E.J., Genghof, D.S. & Neill, J.M.: Serological reactions of two bacterial levans. *J. Immunol.* 51: 5, 1945.
- Hehre, E.J.: Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. *J. biol. Chem.* 163: 221, 1946.

- Hehre, E.J. & Neill, J.M.: Formation of serologically reactive dextrans by streptococci from subacute bacterial endocarditis. *J. exp. Med.* **83**: 147, 1946.
- Hestrin, S.: Synthesis of polymeric homosaccharides. In: Gunsalus, J.C. & Stanier, R.Y. (eds.): *The Bacteria*, vol. 3, Academic Press, 1962, p. 373.
- Hlava, J.: *Leuconostoc hominis* und seine Rolle bei den akuten exanthematischen Krankheiten (Scharlach, Masern, Flecktyphus). *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **32**: 263, 1902.
- Hucker, G.J. & Pederson, C.S.: Studies on the *Coccaceae*. XVI. The genus *Leuconostoc*. N.Y. St. Agric. Exp. Station, Technical Bulletin 167, 1930, p. 3, 22 and 66.
- Jeanes, A., Haynes, W.C., Wilham, C.A., Rankin, J.C., Melvin, E.H., Austin, M.J., Cluskey, J.E., Fisher, B.E. Tsuchiya, H.M. & Rist, E.C.: Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Amer. chem. Soc.* **76**: 5041, 1954.
- Jessen, O.: *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads. Disputats, Munksgaard, København 1965.
- Koch, F.E.: Die polysaccharidbildenden Speichelstreptokokken und die Froschlaichstreptokokken der Zuckerfabriken. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **130**: 381, 1933/34.
- Koch, F.E.: Biologische Untersuchungen über die Verwandtschaft der polysaccharidbildenden Speichelstreptokokken und Froschlaichstreptokokken der Zuckerfabriken. *Cbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **134**: 341, 1935.
- Liesenberg, C. & Zopf, W.: Ueber den sogenannten Froschlaichpilz (*Leuconostoc*) der europäischen Rübenzucker- und der javanischen Rohrzuckerfabriken. *Cbl. Bakt.* **12**: 659, 1892.
- Montville, T.J., Cooney, C.L. & Sinskey, A.J.: Distribution of dextransucrase in *Streptococcus mutans* and observations on the effect of soluble dextran on dextransucrase activities. *Infect. Immun.* **18**: 629, 1977.
- Niven, C.F. jr., Smiley, K.L. & Sherman, J.M.: The production of large amounts of a polysaccharide by *Streptococcus salivarius*. *J. Bact.* **41**: 479, 1941a.
- Niven, C.F. jr., Smiley, K.L. & Sherman, J.M.: The polysaccharide synthesized by *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus bovis*. *J. Biol. Chem.* **140**: 105, 1941b.
- Niven, C.F. jr., Kiziuta, Z. & White, J.C.: Synthesis of a polysaccharide from sucrose by *Streptococcus s.b.e.* *J. Bact.* **51**: 711, 1946.
- Niven, C.F. jr. & White, J.C.: A study of streptococci associated with subacute bacterial endocarditis. *J. Bact.* **51**: 790, 1946.
- Niven, C.F. jr., Washburn, M.R. & White, J.C.: Nutrition of *Streptococcus bovis*. *J. Bact.* **55**: 601, 1948.
- Pasteur, L.: Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique. *Bull. Soc. Chim. (Paris)* 1861, p. 30 (Oeuvres de Pasteur, Tome II, p. 134. Masson et Cie, Paris 1922).
- Sherman, J.M., Niven, C.F. jr. & Smiley, K.L.: *Streptococcus salivarius* and other non-hemolytic streptococci of the human throat. *J. Bact.* **45**: 249, 1943.
- Sidebotham, R.L.: Dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**: 371, 1974.
- Smith, I.: *Chromatographic and Electrophoretic Technique*, 2. ed. vol. 11: 246, 1960. William Heineman, London.
- Smith, R.G.: The gum fermentation of sugar cane juice. *Proc. Linnean Soc. N. South Wales* **26**: 589, 1901.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study, *J. gen. Microbiol.* **43**: 159, 1966.
- Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. & Ingraham, J.: *The Microbial World*. Printice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1976.

- Steel, T.: The chemical properties of bacterial gum levan, Proc. Linnean Soc. N. South Wales 26: 626, 1901.
- Sutherland, I.W.: Bacterial exopolysaccharides. Adv. Microb. Physiol. 8: 143, 1972.
- Tieghem, P. van: Sur la gomme de sucrerie. *Leuconostoc mesenteroides*. Ann. Sciences naturelles, 6 sér. vol. 7: 180, 1878.
- Warner, T.N. & Miller, C.H.: Cell-associated levan of *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun. 19: 711, 1978.
- White, J.C. & Niven, C.F., jr.: Streptococcus s.b.e.: a streptococcus associated with subacute bacterial endocarditis. J. Bact. 51: 717, 1946.
- Ørskov, J.: Untersuchungen über einen exzessiv Polysaccharid-bildenden Streptokokkus. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 119: 88, 1930.
- Ørskov, J. & Poulsen, K.A.: Das häufige Vorkommen von Streptokokken im menschlichen Rachen, die bei Wachstum auf der Oberfläche fester, Saccharose (oder Raffinose) enthaltender Substrate exzessiv Polysaccharid produzieren. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 120: 125, 1931.

# **Undersøgelse af proteinomsætning**

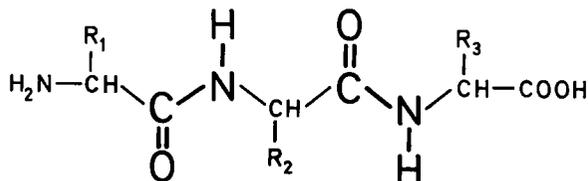


## Kapitel 28

### Alment om proteinomsætning

I alle levende celler udgør protein (æggehvide) omkring halvdelen af tørstoffet. Det siger noget om proteinstoffernes fundamentale betydning for cellernes liv og forklarer, at de træffes overalt i naturen. Antallet af forskellige proteinstoffer er enormt stort, og de har talrige forskelligartede funktioner i de levende organismer. En almen klassificering af proteinstoffer er derfor nærmest umulig, men en ofte anvendt deling er at skelne mellem strukturproteiner og funktionelle proteiner, selv om der ikke er nogen helt skarp grænse. De funktionelle proteiner er først og fremmest enzymer, af hvilke man kender over 2000 forskellige, og strukturelle proteiner består især af de proteiner, som indgår i celler og organismer som en del af selve organismens substans. Det er navnlig strukturproteinerne, der menes, når man taler om protein som substrat i forbindelse med bakteriologiske undersøgelser til påvisning af proteinomsætning.

Alle proteiner består af kæder af aminosyrer, indbyrdes forbundet ved peptidbindinger, en kemisk binding mellem en terminal carboxylgruppe i den ene aminosyre og en aminogruppe i  $\alpha$ -stilling i den næste. Et fælles træk for alle aminosyrer er nemlig, at de indeholder en endestillet carboxylgruppe og en aminogruppe i  $\alpha$ -stilling, dvs. bundet til det kulstofatom der ligger nærmest carboxylgruppens kulstofatom. Resten af molekylet (sidekæden) i de 20 forskellige aminosyrer, som indgår i levende organismer, er bygget på forskellig måde og udgør grundlaget for de forskelle, der karakteriserer de individuelle aminosyrer. Figuren viser skematisk 3 aminosyrer forbundne ved 2 peptidbindinger.



Skematisk fremstilling af 2 peptidbindinger angivet ved store typer mellem 3 aminosyrer med sidekæderne  $\text{R}_1$ - $\text{R}_3$ . På aminosyren til venstre en fri  $\text{NH}_2$  gruppe og på aminosyren til højre en fri carboxylgruppe. Ved dannelse af en peptidbinding mellem en  $-\text{NH}_2$  gruppe og en  $-\text{COOH}$  gruppe fraspaltes vand.

Aminosyrekæderne benævnes på grund af peptidbindingen polypeptider. Kædelængden kan variere meget, men hyppigst er der 100 til 300 aminosyrer; forgreninger forekommer ikke. Proteiner består ofte af aggregater af flere polypeptider, der kan være ens eller forskellige. Et for funktionen helt afgørende træk ved de enkelte polypeptider er den bestemte rækkefølge, hvori aminosyrerne optræder i kæderne. Rækkefølgen bestemmes af den pågældende organismes DNA, dvs. den er arveligt bestemt (se kapitel 37).

Kæder af polypeptider kan enten foldes sammen, så proteinmolekylet som helhed nærmest bliver kugleformet, et såkaldt globulært protein, eller de kan holdes sammen i bundter som lange trådformede molekyler, såkaldt fibrillært protein. Enzymer er som regel globulære proteiner. Eksempler på fibrillære proteiner er kollagen, elastin og keratin, der udgør substansen i knoglevæv, bindevæv, hud, hår og negle hos dyr.

Når dyr og planter er døde, nedbrydes alle de organiske forbindelser, de er opbygget af (proteiner, kulhydrater, fedtstoffer og nukleinsyrer), til uorganiske forbindelser som salte, vand og  $\text{CO}_2$ . Under eet kaldes denne omdannelse i naturen en mineralisationsproces, fordi slutproduktet bl.a. omfatter mineralsalte. Den modsatte proces, hvor  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  og mineralsalte opbygges til organisk stof, sker i fotosyntetiske organismer som planter og fotosyntetiske bakterier under udnyttelse af solenergi, og det således dannede organiske stof spredes til andre levende organismer gennem fødekæderne. Der foregår altså i naturen et kredsløb fra uorganisk stof til organisk stof og tilbage til uorganisk. Dette kredsløb ville gå i stå, hvis der ikke fandtes bakterier til at gennemføre mineralisationsprocessen. En del af mineralisationsprocessen er bedre kendt under betegnelsen forrådnelsesprocesser, som specielt angår nedbrydning af protein.

Alle bakteriologiske prøver, der har med omsætning af proteinstof at gøre, er prøver som påviser et eller andet trin i den del af mineralisationsprocessen, som angår proteinnedbrydning, mens man foreløbig ikke har prøver, der påviser den modsatte proces: opbygning af protein.

Første trin i nedbrydningen af protein er en spaltning af polypeptidkæderne – først til mindre stykker af vekslende længde, kaldet peptider eller oligopeptider, og til sidst til de enkelte aminosyrer. De involverede enzymer er proteaser og peptidaser, der er omtalt i kapitel 29 om gelatinesmeltning. Det kan her indskydes, at den samme nedbrydning, men udført kemisk eller ved en kontrolleret enzymatisk proces, anvendes ved fremstilling af bakteriesubstratet pepton, som altså består af en blanding af peptider og aminosyrer.

Næste trin er nedbrydningen af de enkelte aminosyrer. Mange forskellige enzymer deltager, deriblandt decarboxylaser, som af carboxylgruppen danner  $\text{CO}_2$ , og deaminaser, som fjerner aminogruupper under dannelse af ammoniak.

Aminosyredecarboxylaser er omtalt i kapitel 30 og fenylalanindeaminase, er omtalt i kapitel 32. Nedbrydning af aminosyren arginin kan ske på særlig måde ved hjælp af enzymer, der sammenfattes under betegnelsen arginindihydrolase, det er omtalt i kapitel 31. Afspaltning af indol fra aminosyren tryptofan er omtalt i kapitel 33.

I to aminosyrer, methionin og cystein, findes svovl, der ved nedbrydningen i hvert fald delvis frigøres som svovlbrinte. Prøver til påvisning af frigjort svovlbrinte er omtalt i kapitel 34. Da omdannelsen formentlig hyppigst sker ved en primær oxidation efterfulgt af en sekundær reduktion af de oxiderede uorganiske svovlforbindelser og altså principielt er nært beslægtet med reduktionen af oxiderede kvælstofforbindelser som nitrat og nitrit, burde man egentlig placere svovlbrinteprøverne sammen med nitratreduktionsprøverne under oxidations-reduktionsprøver. Der er imidlertid i bakteriologien tradition for at behandle svovlbrinteprøverne sammen med prøverne for proteinomsætning.

Ureaseprøvens placering blandt prøver for proteinomsætning (se kapitel 35) er heller ikke helt logisk fra et biokemisk synspunkt, da prøven ikke direkte viser noget om proteinnedbrydning. Indirekte er der dog den forbindelse, at urinstof dannes ved en særlig proces i bestemte højere organismer, som skaffer sig af med aminogrupeer fra aminosyrerne ved at omdanne dem til det neutrale urinstof, som udskilles gennem nyrene.

## *Kapitel 29*

### **Gelatinesmeltningsprøver**

Gelatinesmeltningsprøver påviser gelatinaser, dvs. enzymer som er i stand til at nedbryde proteinstoffet gelatine, så dets tilstandsform ændres fra fast til flydende. Gelatinesmeltning er et eksempel på nedbrydning af protein til peptider og aminosyrer.

#### **1. Historisk indledning**

Robert Koch indførte i 1881 brugen af faste næringssubstrater som et middel til at opnå renkulturer. For at få de flydende næringssubstrater til at stivne brugte han først gelatine (Koch 1881), og året efter indførtes agar-agar (se Hitchens & Leikind 1939). I begyndelsen lod han substraterne stivne på en afkølet glasplade, en teknik han var fortrolig med fra fremstilling af sine egne fotografiske plader. Pladerne stilledes under en glasklokke. I 1887 indførtes Petri's glasskåle.

Visse bakteriers evne til at gøre gelatine flydende blev straks iagttaget, og forskellen mellem forskellige bakteriers evne i denne henseende omtales allerede i 1883 af Koch og blev senere udnyttet i forbindelse med hans koleraundersøgelser (Koch 1884). Efter dyrkning på plade overførte han renkulturer til et reagensglas med en søjle af stivnet næringsgelatine ved et stik ned i substratet. Dette klassiske gelatinestik fik hurtig stor udbredelse og er omtalt i ældre arbejder af Hauser (1885), Liborius (1886), Senger (1887), Sternberg (1887), og Fermi (1890, 1891).

Eijkman (1901) foretog en sammenligning mellem evne til gelatinesmeltning og evne til opløsning af kasein og fandt, at de to egenskaber fulgtes ad.

To nye fremgangsmåder til påvisning af gelatinesmeltning blev introduceret i 1926. Gates (1927) foreslog at anvende en eksponeret og fremkaldt, dvs. sort filmstrimmel, som substrat. En fotografisk film er et tyndt gelatinelag med inkorporeret sølvbromid på en gennemsigtig bærestrimmel, og når strimlen udsættes for enzymernes påvirkning i en kultur, vil gelatinelaget fordøjes og sølvsaltet frigøres, hvorved det sorte lags gennemsigtighed ændres. Denne ændring kan på forskellig vis måles, så man kan få et kvantitativt udtryk for

enzymaktiviteten. Samme princip i forskellige udformninger er senere blevet udnyttet af andre (se fx. Hoyt & Pickett 1957 og Porres & Harris 1974).

Frazier's metode (1926) var baseret på, at tunge metalsalte er i stand til at fælde gelatine, mens den enzymatisk nedbrudte gelatine ikke fældes. Gelatinen inkorporerede han i en agarplade, som blev tilsæt med en plet på midten. Efter en vækstperiode på 2-3 dage ved 30°C blev pladen overhældt med en opløsning af HgCl<sub>2</sub> i saltsyre. Herved blev pladen på grund af udfældning uklar alle steder, hvor gelatinen var uændret, mens gelatinesmeltende bakterier viste en ring af klart substrat omkring pletten. Metoden gav med de fleste bakterier et hurtigere resultat end det klassiske gelatinestik og har siden været meget anvendt i forskellige modifikationer.

Da de eksisterende prøver til påvisning af gelatinesmeltning på grund af deres langsomhed stadig kun var af begrænset værdi i den kliniske bakteriologi, forsøgte man på forskellig måde at fremskynde reaktionen.

Kohn foreslog i 1953 at anvende formalinhærdet gelatine med inkorporeret kulpulver, hvorved han opnåede dels at prøven kan udføres ved 37°C, da formalinhærdet gelatine ikke varmesmeltes, dels at kun en ringe mængde gelatine skal nedbrydes enzymatisk, før det kan ses ved frigørelse af kulpulver, der lægger sig på bunden af glasset. Lautrop (1956a) anvendte Kohns gelatine sat til tætte bakteriesuspensioner og opnåede derved en yderligere afkortning af den nødvendige observationstid. Samtidig blev det vist, at der var forskellige gelatinaser, idet nogle krævede nærvær af calciumjoner og andre ikke, og nogle hæmmedes af toluol-tilsætning, mens andre var upåvirkede.

I tidens løb er der beskrevet mange hurtigmetoder til påvisning af gelatinesmeltning, men alle udformet på grundlag af de allerede beskrevne principper og vanskelige at tage stilling til uden selv at have prøvet dem (se fx. Greene & Larks 1955; Thirst 1957; McDade & Weaver 1958; Smith & Goodner 1958; Pitt & Dey 1970). For at gøre gelatinesmeltningsprøver til et endnu mere nyttigt hjælpemiddel i diagnostisk bakteriologi end de er i øjeblikket, tror vi, at man i fremtiden snarere bør stile mod metoder, som vil gøre det muligt at skelne mellem forskellige slags gelatinaser, fremfor at prøve at opnå resultaterne hurtigere end det allerede er muligt.

## 2. Biokemisk baggrund

Af hud eller knogler fremstilles proteinstoffet kollagen, som når det koges længe optager vand og bliver til gelatine. Ved temperaturer over 22-25°C er gelatine en tyktflydende, viskøs substans, som ved afkøling bliver til et fast stof. Det er opbygget af lange spiralsnoede polypeptidkæder.

Mange bakterier indeholder enzymer med evne til at spalte peptidbindingerne i gelatinens polypeptider, så de omdannes til kortere kæder, oligopeptider, med det resultat, at gelatinen omdannes til en tyndtflydende opløsning.

Der er uden tvivl flere forskellige slags enzymer, men da de præcise betingelser, hvorunder de enkelte enzymer virker, ikke kendes, samles de under betegnelsen gelatinaser, og deres virkning beskrives generelt som gelatinesmeltning. Denne enzymatiske smeltning er helt forskellig fra den varmesmeltning der sker ved temperaturer over 22–25°C.

Den enzymatiske gelatinesmeltning, hvis grad er afhængig af gelatinens art og koncentration og af temperaturen, vil i nogle tilfælde efterfølges af en nedbrydning af oligopeptiderne ved hjælp af andre enzymer, peptidaser, så der dannes tri- og dipeptider og aminosyrer, som derefter kan udnyttes af bakterierne i deres stofskifte.

Blandt gelatinaserne er nogle specifikke, for så vidt som de kun nedbryder gelatine, men ikke andre proteinstoffer; de findes især inden for slægten *Clostridium*. Andre har en bredere substratspecificitet og kan nedbryde flere slags protein og kaldes derfor også proteaser eller proteinaser; dem finder man fx. i *Pseudomonas aeruginosa* og *Serratia marcescens* (Maschmann 1943).

Til yderligere karakteristik af proteaser i almindelighed kan man bruge deres stabilitet over for ilt. De ekstracellulære enzymer, der især dannes tidligt under væksten, er stort set iltstabile, mens de intracellulære, der frigøres ved autolyse af cellerne er iltlabile. Nogle clostridier har begge slags enzymer. De fleste iltstabile proteaser hæmmes af stoffer i normalt serum, men der er undtagelser som fx. *Cl. welcii* (Maschmann 1943). Hartley (1960) har givet en af de nyeste inddelinger af de proteolytiske enzymer.

Så vidt vides er gelatinaserne konstitutive, således at en induktion ikke er nødvendig. Glukose i substratet har en hæmmende virkning, enten fordi syredannelse vil forrykke pH fra de 7,0–7,5, som er gelatinasernes optimum, eller/og fordi enzymproduktionen hæmmes. Gelatinasernes stabilitet nedsættes med stigende temperatur, men i nogle tilfælde kan stabiliteten forøges, hvis der er overskud af calciumjoner i miljøet, mens omvendt fosfat, citrat og andre anjoner som fælder calcium nedsætter stabiliteten (Gorini 1950; Gorini & Fromageot 1950). For stafylokokkers og *Proteus*' vedkommende er det vist, at dyrkning i 10–20% CO<sub>2</sub> atmosfære forøger gelatinase-aktiviteten (Birch-Hirschfeld 1940; Kourilsky et al. 1953).

Kommerciel gelatine til bakteriologisk brug er et variabelt produkt, bl.a. afhængigt af udgangsmaterialet og fremstillingsprocesserne. Nogle egenskaber som gelstyrke, viskositet og pH, kan bestemmes, men alligevel må man være forberedt på variationer, som kan påvirke udfaldet af gelatinesmeltningsprøverne.

Ved forskellige kemiske påvirkninger, fx. behandling med formalin, hexametylentetramin, acetaldehyd etc., kan man "hærde" gelatinen, så den ikke længere varmesmelter. Det har praktisk betydning ved udformning af nogle gelatinaseprøver (Zimmerman 1939; Kohn 1953).

### 3. Valg af metode

Det klassiske gelatinestik er så simpelt at anvende, at det ville være svært at erstatte. Det fungerer stort set tilfredsstillende med alle hurtigt gelatinestmeltende bakterier, dvs. stammer som viser smeltning i løbet af et par dage eller højst een uge. Jo langsommere bakterierne smelter gelatinen, desto mindre bliver prøvens praktiske værdi, og desuden er det ganske vilkårligt, hvor længe et gelatinestik skal observeres, før man vil udelukke evne til gelatinestmeltning.

De langsomt smeltende stammers enzymer kan påvises betydelig hurtigere, hvis man bruger en direkte enzymtest med tætte toluenbehandlede suspensioner og Kohns formalinhærdede kulgelatine. Desværre kan nogle af de hurtigtstmeltende stammer ikke behandles med toluen, da dette af uopklarede grunde har vist sig at hæmme enzymaktiviteten (Lautrop 1956a, b).

Det bedste kompromis med ukendte stammer er derfor samtidig brug af to metoder: det klassiske gelatinestik, som vil være det hurtigste til nogle stammer, og Kohn-Lautrop's metode, som vil være den hurtigste til andre stammer. Mange positive resultater vil foreligge i løbet af 1 døgn, men 4 døgn observation er nødvendigt, hvis ikke for mange gelatinestmeltende stammer fejlagtigt skal karakteriseres som uden evne til gelatinestmeltning.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### A. *Det klassiske gelatinestik* (med samtidig påvisning af H<sub>2</sub>S dannelse)

##### *Substrat*

Kødekstrakt	0,75%
Pepton	2,50%
NaCl	0,50%
Gelatine	12,00%
pH indstilles til	7,6
FeCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0,05%
pH	7,8

Aftappes i 6 cm høj søjle i tynde reagensglas (155 x 10/11 mm) og lukkes med paraffineret korkprop.

Ved nye indkøb af pepton, kødekstrakt og gelatine udvælges de fabriktionsnumre, der antages at ville give resultater i overensstemmelse med de hidtidige. Desuden undersøges H<sub>2</sub>S reaktionen for 6 *E. coli* stammer, der normalt betragtes som ikke H<sub>2</sub>S dannere. Sværtningen skal her være minimal på 7. dagen samtidig med, at *C. freundii* skal være tydelig positiv på 2. dagen og *Proteus vulgaris* på 1. dagen.

*Udførelse:* Fra en renkultur på standardmedium tages med en lang, lige platinnål et stort inoculum, som anbringes ved et stik helt til bunds midt i søjlen. Den paraffinerede prop sættes på plads efter flambering af glassets øverste ende, for at den smeltede paraffin kan lukke glasset tæt, så fordampning undgås. (Tæt lukning af glasset har også betydning for at undgå oxidation af det dannede sulfid). Inkubering ved 22°C. I visse håndbøger anbefales inkubering ved 35-37°C, hvor alle glas vil være flydende, og aflæsning ved at se hvilke glas, der stivner når de afkøles under vandhanen. Metoden giver, udført på denne måde, særlig mange lunefulde resultater og kan derfor ikke anbefales.

*Aflæsning:* Glassene aflæses dagligt i op til 7 dage, idet man ser efter, om noget af gelatinen er blevet flydende, ved at vende glassene skråt nedad og lægge mærke til, om substratet flyder ned ad væggen. Sker det, er noget af gelatinen smeltet og prøven positiv. Endnu tidligere kan begyndende smeltning konstateres, hvis man ser efter, om væksten øverst i stikket ligger i en lille forsækning, og hvis det er tilfældet, slår glasset hårdt mod håndfladen, så eventuelt flydende gelatine slynges ud og sætter sig som en dråbe på væggen oven over substratet. Hvis man er sikker på, at det er gelatine og ikke blot noget af kulturen, som har sat sig på væggen, er det tilstrækkeligt til at fastslå, at stammen kan smelte gelatine. Ved fortsat observation vil mængden af flydende gelatine tiltage, men der er store variationer. I nogle tilfælde er hele søjlen smeltet på mindre end 24 timer, i andre skrider processen meget langsomt frem, og i atter andre går den på et vist tidspunkt helt i stå. Fortsat observation er kun nødvendig, hvis smeltningen er så ubetydelig, at der kan være tvivl om aflæsningen.

*Fortolkning:* Varmesmeltning kan forveksles med enzymatisk smeltning, men vil kun forekomme, hvis temperaturreguleringen har svigtet, så glassene har stået ved for høj temperatur. Et negativt resultat kan skyldes en dårlig gelatine, og hvis resultatet er mod forventning, er der god grund til at gentage undersøgelsen med et glas fra en ny portion substrat.

*B. Direkte enzymtest a.m. Kohn-Lautrop*

*Substrat:* Kohn's formalinhærdede kulgelatine findes udskåret i små stykker opbevaret i vand i særlige glas med skruelåg eller enkeltvis tilsat suspensionsglasset. Angående fremstillingen henvises til Kohn's artikel 1953.

*Suspensionsvæsken* består af fysiologisk saltvand enten i et WR-glas eller et Widalglass.

*Cellesuspensionen* høstes fra en bouillon-agarplade, som har været inkuberet ved 30°C natten over. Pladen inspiceres for evt. forureninger, som fjernes ved udskæring med en kniv, før kulturen høstes. De 30°C er et kompromis, idet man med nogle stammer finder størst aktivitet efter vækst ved 35°C og med andre efter vækst ved 20°C. Det er vigtigt, at suspensionerne er så tætte som muligt; selv med kraftigt voksende bakterier bør man bruge hele væksten fra en lille plade suspenderet i 3–4 ml suspensionsvæske, men reducerer man det samlede volumen suspensionsvæske, kan bakteriemængden nedsættes tilsvarende.

*Udførelse:* Kulturen skræbes af pladen, fx. med en svagt bøjet Pasteurpipette, og overføres til suspensionsmediet. Derefter tilsættes ca. 0,2 ml toluen, og der foretages en omhyggelig homogenisering med pipette, hvorved samtidig det uopløselige toluen bringes i kontakt med cellerne. Med pincet anbringes et stykke gelatine forsigtigt i suspensionen, så det hviler på bunden af glasset. Glasset henstilles ved 35°C og observeres dagligt i 4 dage.

*Aflæsning:* En positiv reaktion giver sig til kende ved et bundfald af frigjort kulpulver. I den tætte suspension med gelatinestykket hvilende på bunden kan det være vanskeligt at se meget små mængder frigjort kul, men eftersynet lettes ved at holde glasset lidt skråt og kigge op mod bunden. Glasset må ikke rystes, da et meget lille bundfald kan forsvinde i den tætte suspension. Så snart en lidt større mængde kul er frigjort, er der ingen vanskelighed ved aflæsningen, for ikke at tale om når hele gelatinestykket er forsvundet.

*Fortolkning:* Det sker, at et par små stumper går af gelatinestykket og lægger sig på bunden. På grund af deres størrelse i forhold til de enkelte meget små fine kulpartikler bør de ikke kunne forveksles med kul frigjort ved smeltning og tolkes som et positivt resultat. En svagt positiv prøve kan skyldes en forurening af suspensionen med en aktivt smeltende stamme; det må som nævnt forebygges ved et omhyggeligt eftersyn af pladen, før kulturen høstes. Ved henstand i meget lang tid, fx. 10–14 dage, kan gelatinestykket blive blødt og synke sammen på bunden og simulere et bundfald, men ved rystning afsløres det, at bundfaldet ikke består af frie kulpartikler. I øvrigt er det ikke meningsfuldt at fortsætte observationen så længe.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Arbejdet med de meget tætte suspensioner og specielt homogeniseringen rummer risiko for infektion, hvis proceduren ikke udføres med tilstrækkelig forsigtighed. Da toluen er brændbart, må flasken og den fyldte pipette ikke komme i nærhed af gasflammen. Toluennemængden i suspensionen er dog så lille, at man uden risiko kan flambere glasset, når det sker inden toluenen igen samler sig i et lag på overfladen.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

*Pseudomonas*: flere species, deriblandt *P. aeruginosa* og de fleste stammer af *P. fluorescens*. Desuden *P. maltophilia* og *P. pseudomallei*.

*Xanthomonas*: enkelte species.

*Salmonella*: nogle serotyper, deriblandt alle som tidligere regnedes til slægten *Arizona*.

*Klebsiella*: kun "oxytoca"-gruppens stammer.

*Enterobacter*: alle species.

*Serratia*: alle species.

*Proteus*: 2 species.

*Erwinia*: flere species.

*Vibrio*: alle species.

*Aeromonas*: alle species.

*Photobacterium*: nogle stammer.

*Lucibacterium*: alle stammer.

*Flavobacterium*: de fleste species.

*Actinobacillus*: 1 species.

*Bacteroides*: nogle species.

*Fusobacterium*: enkelte stammer.

*Acinetobacter*: nogle stammer.

*Staphylococcus*: mange stammer af alle species.

*Micrococcus*: mange stammer af alle species.

*Planococcus*: alle stammer.

*Streptococcus*: enkelte stammer af enkelte species.

*Peptococcus*: en enkelt species.

*Peptostreptococcus*: enkelte stammer.

*Bacillus*: de fleste species.

*Clostridium*: en del species.

*Corynebacterium*: enkelte stammer af 2 species.

*Arthrobacter*: mange species.

*Eubacterium*: enkelte species og enkelte stammer af andre species.

*Actinomyces*: enkelte stammer af få species.

*Nocardia*: få arter.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Som helhed har gelatinesmeltningerne begrænset værdi. Der er to hovedårsager hertil: (1) Med alle eksisterende metoder er grænsen mellem smeltende og ikke-smeltende stammer fastsat arbitrært, og ofte er ikke engang denne arbitrære grænse klart defineret. (2) Det erfaringsgrundlag, der er en forudsætning for at udnytte evnen til gelatinesmeltning i diagnostikken, er både ufuldstændigt og heterogent, dels fordi gelatinstykket ved 22°C ikke kan anvendes til alle slags bakterier, dels fordi nogle af de andre metoder anvendt på forskellige grupper af bakterier giver forskelligt resultat og derfor kun kan udnyttes, hvis undersøgelsen af den ukendte stamme er foretaget med samme metode, som er anvendt til at fremskaffe de i litteraturen angivne data. Disse vanskeligheder gælder tildels også for andre af de karakteriseringsprøver vi anvender, men de er særligt iøjnefaldende for gelatinesmeltningerne, måske fordi der her er tale om påvisning af flere forskellige slags enzymer med metoder, som kun ufuldstændigt er i stand til at skelne mellem de enkelte enzymer.

Konsekvensen af det ovenstående er, at gelatinesmeltningernes værdi er begrænset til bestemte, snævre områder af bakteriologien, hvor erfaringerne — især med det klassiske gelatinstik — giver det nødvendige faste grundlag for en praktisk udnyttelse.

Til disse områder hører familien *Enterobacteriaceae*. I slægten *Proteus* er den konstante, hurtige evne til smeltning hos arterne *P. vulgaris* og *P. mirabilis* af differentialdiagnostisk værdi over for de øvrige *Proteus*-arter. Alle *Serratia*-arternes evne til gelatinesmeltning har også praktisk betydning, især når det drejer sig om ikke-pigmenterede stammer. Adskillelsen mellem *Salmonella* og *Arizona* på grundlag af en sen gelatinesmeltning har mistet sin betydning, efter at man er enedes om, at *Arizona*-gruppen bør inkluderes i *Salmonella*, der derved bliver en taxon som er variabel med hensyn til gelatinesmeltning. I slægten *Klebsiella* findes nogle langsomt smeltende stammer, der fra gammel tid har været benævnt "oxytoca" stammer. Nogle opfatter disse stammer, når de samtidig er indol-positive, som en selvstændig art, andre opfatter dem som en biotype af *Klebsiella pneumoniae*. *Enterobacter cloacae* hører til de langsomt smeltende stammer.

I slægten *Pseudomonas* med dens overordentlig mange species er påvisning af evne til gelatinesmeltning af værdi ved diagnosen af *P. aeruginosa*

*P. pseudomallei* og *P. maltophilia*. De er alle hurtigt smeltende arter. En del af de fluorescerende pseudomonader, inklusive flere af de plantepatogene arter, har evne til langsom smeltning. Den postulerede forskel mellem *P. fluorescens* som smeltende og *P. putida* som ikke-smeltende (Stanier et al. 1966) gælder som hovedregel, men en del *P. fluorescens* mangler evne til smeltning i gelatinestik.

I slægterne *Bacillus* og *Clostridium* findes en del hurtige smeltere, og efter litteraturen at dømme har prøven værdi ved artsdiagnosen.

## 8. Referencer

- Birch-Hirschfeld, L.: Die sekretorische Staphylokokkenproteinase und ihre Beziehung zu den Plasma-virksamen Stoffen pyogener Staphylokokken. Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. 145: 476, 1940.
- Eijkman, C.: Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 29: 841, 1901.
- Fermi, C.: Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. Centralbl. Bakt. 7: 469, 1890.
- Fermi, C.: Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. Centralbl. Bakt. 10: 401, 1891.
- Frazier, W.C.: A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. J. infect. Dis. 39: 302, 1926.
- Gates, F.L.: A method of proteolytic enzyme titration. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 24: 936, 1927.
- Gorini, L.: Le rôle du calcium dans l'activité et la stabilité de quelques protéinases bactériennes. Biochim. biophys. Acta. 6: 237, 1950.
- Gorini, L. & Fromageot, C.: Les facteurs physiologiques conditionnant la présence de protéinase dans les cultures de *Micrococcus lysodeikticus*. Biochim. biophys. Acta 5: 524, 1950.
- Greene, R.A. & Larks, G.G.: A quick method for the detection of gelatin liquefying bacteria. J. Bact. 69: 224, 1955.
- Hartley, B.S.: Proteolytic Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 29: 45, 1960.
- Hauser, G.: Über Fäulnisbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie. Ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze. Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig, 1885.
- Hitchens, A.P. & Leikind, M.C.: The introduction of agar-agar into bacteriology. J. Bact. 37: 485, 1939.
- Hoyt, R.E. & Pickett, M.J.: Use of "rapid substrate" tablets in the recognition of enteric bacteria. Amer. J. clin. Path. 27: 343, 1957.
- Koch, R.: Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mitteilungen aus den Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. I, 1881. (Gesammelte Werke von Robert Koch, Bd. I, p. 112. Verlag von Georg Thieme, Leipzig 1912).
- Koch, R.: Über die neuen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Mikrokosmen in Boden, Luft und Wasser. Ärztliches Vereinsblatt f. Deutschland, 1883, Nr. 137. (Gesammelte Werke von Robert Koch, Bd. I, p. 274. Verlag von Georg Thieme, Leipzig 1912).

- Koch, R.: Erste Konferenz zur Erörterung der Cholerafrage am 26. Juli 1884 in Berlin. Berl. klin. Wschr. 1884. (Gesammelte Werke von Robert Koch, Bd. II, 1. del, p. 20. Verlag von Georg Thieme, Leipzig 1912).
- Kohn, J.: A preliminary report of a new gelatin liquefaction method. J. clin. Path. 6: 249, 1953.
- Kourilsky, R., Richou, R. & Schlaepfer, J.: Recherches sur les diastases microbiennes. De l'existence de principes gélatinolytiques dans les filtrats de culture de *Proteus*. C.R. Soc. Biol. (Paris) 147: 18, 1953.
- Lautrop, H.: A modified Kohn's test for the demonstration of bacterial gelatin liquefaction. Acta path. microbiol. scand. 39: 357, 1956a.
- Lautrop, H.: Observations on gelatin-liquefying strains of the *Salmonella*-group. Acta path. microbiol. scand. 39: 370, 1956b.
- Liborius, P.: Beiträge zur Kenntniss des Sauerstoffbedürfnisses der Bacterien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 1: 115, 1886.
- Maschmann, E.: Bakterien-Proteasen. Ergebnisse der Enzymforschung. Akademische Verlagsgesellschaft. Becker & Erler Vol. 9, Leipzig 1943, p. 155.
- McDade, J.J. & Weaver, R.H.: Rapid methods for the detection of gelatin hydrolysis. J. Bact. 77: 60, 1958.
- Petri, R.J.: Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens. Centralbl. Bakt. 1: 279, 1887.
- Pitt, T.L. & Dey, D.: A method for the detection of gelatinase production by bacteria. J. appl. Bact. 33: 687, 1970.
- Porres, J.M. & Harris, D.: Rapid gelatin liquefaction test. Amer. J. clin. Path. 62: 428, 1974.
- Rietsch, In: Baumgarten, P. (ed.): Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Pathogenen Mikroorganismen umfassend Bacterien, Pilze und Protozoën. III. Jahrgang, 1887, p. 362.
- Senger, E.: Ueber die Einwirkung des Jodoforms auf das Wachstum und die Virulenz der Milzbrandbacillen. Dtsche med. Wschr. 13: 726, 752, 1887.
- Smith, H.L. & Goodner, K.: Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. J. Bact. 76: 662, 1958.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. gen. Microbiol. 43: 159, 1966.
- Sternberg, In: Baumgarten, P. (ed.): Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Pathogenen Mikroorganismen umfassend Bacterien, Pilze und Protozoën. III. Jahrgang, 1887, p. 363.
- Thirst, M.L.: Gelatin liquefaction: a microtest. J. gen. Microbiol. 17: 396, 1957.
- Zimmermann, W.: Demonstration neuer Nährböden als Ersatz für Agar. Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. 144: 65, 1939.

## Kapitel 30

### Aminosyredecarboxylaseprøver

Med disse prøver påviser man bakterielle decarboxylaser, som kan omdanne aminosyrer til de tilsvarende aminer.

#### 1. Historisk indledning

I sit arbejde "Studier over Gæring og Forrådnelse" 1876 skrev Panum: "Jeg er derfor tilbøjelig til at antage at flere forskellige Bakterierformer og rimeligvis tildels virkelig forskellige Arter bidrager til Æggehvidestoffernes "sædvanlige stinkende Forrådnelse", og at Lugtens Forskellighed står i genetisk Forbindelse hermed". Blandt de stinkende stoffer, der her er tale om, er også de forskellige aminer, cadaverin, putrescin, agmatin, isobutylamin og isoamylamin, som opstår ved forskellige aminosyrers decarboxylering. I virkeligheden antyder Panum, at man kan lugte sig til, hvilken art der er tale om, og det gælder jo faktisk i en del tilfælde. Sammenhængen blev først tilfredsstillende oplyst ved undersøgelser over bakteriers decarboxylaser, som biokemikeren E.F. Gale og hans gruppe udførte i 1940'erne i Cambridge (Gale & Epps 1944a, b; Epps 1944, 1945).

Gale viste, at der for 6 forskellige aminosyrer fandtes specifikke decarboxylaser i forskellige bakterier. Nogle arter af bakterier havde et enkelt af enzymerne, andre havde et større antal eller dem alle. Gale bestemte også de nærmere betingelser for enzymdannelse og enzymaktivitet og viste, at fire af disse enzymer krævede en særlig, hidtil ikke kendt, prostetisk gruppe, der senere er identificeret som pyridoxalfosfat.

Som diagnostisk hjælpemiddel anvendte Sharpe (1948) en af Gale udarbejdet tyrosindecarboxylase-test på et større antal streptokokker, og Proom & Woiwod (1951) undersøgte værdien af en papirkromatografisk metode til påvisning af glutaminsyredecarboxylase blandt *Enterobacteriaceae*.

Gale's elev, Vagn Møller, arbejdede i 1950'erne på Serumintituttet med at udforme decarboxylase-prøver for arginin, lysin, ornithin og glutaminsyre i en form, der var egnet til rutinemæssig brug ved diagnosen af *Enterobacteriaceae*, og han demonstrerede i sin disputats deres differentialdiagnostiske

værdi. Møllers simplificerede decarboxylase-prøver, baseret på den pH forskydning til alkalisk side som finder sted ved en decarboxylering, har vundet stor udbredelse og betragtes idag som standardmetoden. Prøvernes begrænsning i Møllers udformning ligger i, at de kun er anvendelige på stammer, der kan vokse anaerobt med glukose som kulstof- og energikilde. Det skyldes, dels at et initialt pH-fald som følge af glukosefermentation er nødvendigt af hensyn til decarboxylasernes lave pH optimum, dels at en evt. sekundær oxidation af peptonet ville føre til en alkalisering, som ikke ville kunne skelnes fra den alkalisering, som skyldes decarboxyleringen (Møller 1955, 1956).

Blandt senere udformede decarboxylase-prøver kan nævnes:

Carlquist's (1956), hvor lysinets amin cadaverin påvises med ninhydrin;

Falkow's (1958) lysinprøve, der kun er en lettere modifikation af Møllers tilsvarende, og som ved at udelade paraffinolie-laget netop giver de problemer, som Møller undgik ved at gøre forholdende anaerobe med paraffinolie;

Edwards & Fife (1961) inkluderede lysin i et skråagarmedium, hvor den sekundære alkalisering som følge af peptonoxidation undgås, fordi det faste medium hæmmer ilt diffusionen.

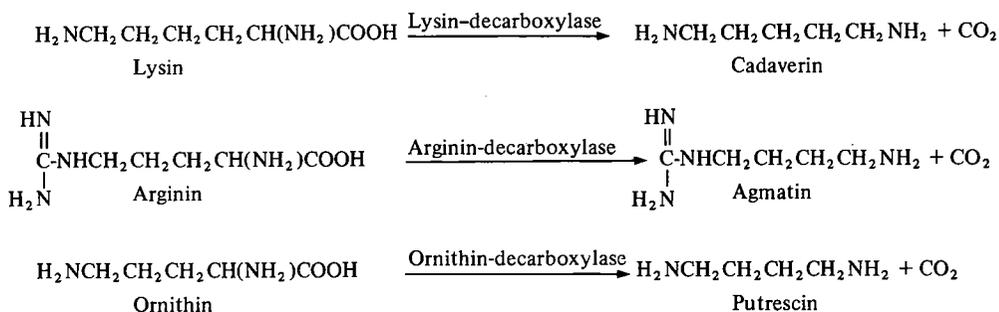
Ederer & Clark (1970) brugte ligeledes agartil sætning og kunne derved utvetydigt påvise ornithin decarboxylering uden at bruge paraffinolie-lag;

Fay & Barry (1972) og Brooker et al. (1973) udformede hurtigprøver (4 timer) til påvisning af henholdsvis ornithin og lysin ved at indstille mediets udgangs-pH til 5,5.

Tyndtlagskromatografi til rutinebrug er foreslået af Goldschmidt & Lockhart (1971), Williams et al. (1971) og Zolg & Ottow (1973). Denne tekniks særlige fordel er, at den tillader at skelne mellem arginin decarboxylase- og arginin dihydrolase-aktivitet. Det samme kan naturligvis opnås ved gaskromatografi (Lambert & Moss 1973).

### 3. Biokemisk baggrund

Her vil kun blive omtalt decarboxylering af de 3 aminosyrer, som anvendes i de nuværende rutineprøver: arginin, lysin og ornithin. Foruden de terminale grupper, COOH og NH<sub>2</sub> gruppen, har alle disse 3 aminosyrer en ekstra NH<sub>2</sub> gruppe, således at der ialt er 3 polære grupper, hvilket ifølge Gale er en forudsætning for, at en aminosyre kan decarboxyleres enzymatisk af bakterier. Decarboxyleringsprocessen ses af følgende formler:



Disse aminer med deres to  $\text{NH}_2$  grupper vil i vandig opløsning reagere stærkt basisk, og det er fremkomsten af denne basiske reaktion påvist med en indikator, der tages som udtryk for, at en decarboxylering har fundet sted. Under de betingelser, der anvendes ved prøvernes udførelse, vil aminerne ophobes, mens de under andre betingelser ville kunne nedbrydes yderligere.

De 3 decarboxylaser, der her er tale om, er alle udtalt substrat-specifikke, men udviser ellers stor lighed med hensyn til deres struktur (Appelbaum et al. 1975) og betingelserne for deres dannelse og aktivitet. De er således alle inducerbare enzymer, som kun dannes, hvis substratet er tilstede. De dannes kun, når dyrkningsmediet har et stærkt surt pH, 5,0–5,5, men da bakterier vokser dårligt ved så lavt pH, bruger man tilsætning af et fermenterbart kulhydrat (glukose), således at pH falder gradvis. Det er vist, at enzymdannelsen er maximal på det tidspunkt, da aktiv celledeling er ved at ophøre. Alle 3 enzymer kræver for at kunne fungere tilstedeværelse af pyridoxalfosfat, der udgør enzymets prostetiske gruppe.

pH-optimum for enzymaktiviteten angives af Gale at ligge usædvanlig lavt. Lysin-decarboxylasen har optimum ved pH 6, de andres ligger derunder. Vagn Møller angiver for lysin og ornithin, at aktiviteten er optimal på et pH-niveau mellem 6 og 7, og mener, at forklaringen på denne uoverensstemmelse kan skyldes, at han bruger tilsætning af pyridoxalfosfat og en anden buffer.

I Møllers udformning af decarboxylase-prøverne er der tale om et lukket vækstsysteem, hvor enzymet induceres, dannes og virker i samme system. Et væsentligt træk ved dynamikken i systemet er, at der først sker et kraftigt pH-fald og derefter – når aminen dannes – en sekundær stigning. Det er en komplikation, at væksts substratet på grund af sit indhold af pepton vil give anledning til alkalidannelse, hvis bakteriernes respiratoriske stofskifte går igang, men det forhindrer man ved at gøre systemet (delvis) anaerobt ved hjælp af et lag paraffinolie over mediet. Med lysin og ornithin vil et indikatorslag under de givne betingelser med stor sikkerhed kunne tolkes som

en stedfunden decarboxylering, det samme er ikke tilfældet med arginin som substrat. Det skyldes, at arginin under prøvens betingelser kan metaboliseres på en anden måde end ved decarboxylering, nemlig ved hjælp af dihydrolasesystemet, som spalter arginin til citrullin, der går videre i en energigivende proces, som fører til dannelse af ammoniak, der også vil medføre en pH-stigning. I en prøve udformet efter Møllers princip kan disse to – helt forskellige – enzymatiske processer altså ikke adskilles uden supplerende undersøgelser. Når det drejer sig om fakultativt anaerobe bakterier, har man på Serum instituttet gjort det til en vedtægt at tolke et positivt indikatoromslag i argininglasset som en positiv reaktion for decarboxylase, vel vidende at der kan være tale om decarboxylase alene, dihydrolasesystemet alene eller begge enzymer samtidigt. Om brug af Møllers argininglas til dihydrolasepåvisning ved en direkte enzymtest, se kapitel 31.

### 3. Valg af metode

På Serum instituttet har man naturligt nok holdt sig til den af Møller angivne metode. Andre metoder baseret på indikatoromslag ses ikke at frembyde umiddelbare fordele, hvorimod kromatografiske metoder, specielt gaskromatografi, i princippet nok må foretrækkes, hvis den fornødne tekniske kapacitet er til stede, især af hensyn til argininprøven.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Møllers forenklede metode til påvisning af aminosyredecarboxylase*  
*Substrat*

Pepton	0,5%
Kødekstrakt	0,5%
Bromkresolpurpur (1:500)	0,5%
Kresolrødt (1:500)	0,25%
Pyridoxal	0,0005%
Glukose	0,05%
i dest. vand	

Til substratet sættes en af de følgende aminosyrer:

1% L(+)-lysindihydroklorid	glas mærket "lysin"
1% L(+)-argininmonohydroklorid	" " "arginin"
1% L(+)-ornithindihydroklorid	" " "ornithin"
Som kontrol substrat uden aminosyre	" " "kontrol"

pH indstilles til 6,0.

Af substraterne aftappes ca. 1,1 ml i snævre reagensglas (155 x 10/11 mm), og efter autoklaveringen tilsættes steril paraffinolie, så der dannes et ca. 5 mm højt lag over substratet.

Ved nye indkøb af pepton eller kødekstrakt udvælges fabriktionsnumre, der giver passende tydelige reaktioner, således at prøverne ikke bliver for følsomme eller for svage.

*Udførelse:* Glassene tilsås med lige platinnål fra en døgngammel renkultur på bouillonagar eller blodagar. Det er tilstrækkeligt at føre nålen med inoculum gennem paraffinlaget ned i mediet som ved inokulation af et forgæringsglas. De tilsåede glas inkuberes ved 35°C i 4 dage. Gale har anbefalet en lavere inkubationstemperatur, men Møller fandt 35°C bedre og mener, det skyldes de anaerobe vækstbetingelser.

*Aflæsning:* Glassene aflæses dagligt i 4 dage. Når indikatorsystemet viser strågul farve, aflæses prøven som negativ, og når det viser violet farve som positiv. I omslagsområdet viser glassene en grålig farve, der kan aflæses som en svag positiv reaktion, når kontrolglasset er strågult. Man kan se svagt positive reaktioner ved aflæsning senere end 4 døgn, men da de i diagnoseskemaerne ikke er registreret som positive, bør aflæsninger efter 4 døgn ikke medtages.

*Fortolkning:* En positiv reaktion i lysin- og ornithinglasset kan umiddelbart tolkes som tilstedeværelse af henholdsvis lysin- og ornithindecaboxylase. Som nævnt kan en positiv reaktion i argininglasset betyde, enten at bakterierne har en arginindecarboxylase eller en arginindihydrolase eller at begge enzymer er til stede. En hurtigt indtrædende og kraftig positiv reaktion tyder på, at arginindihydrolase er til stede, mens sene og svage reaktioner er typiske for decarboxylasen. Møller har foreslået ved hjælp af Nessler's reagens at undersøge, om der er ammoniak til stede i glasset, da dette vil være udtryk for dihydrolaseaktivitet, men Nessler's ammoniakprøve giver ikke altid klare resultater, og vi bruger den ikke i diagnoseafdelingen. Da diagnoseskemaerne for *Enterobacteriaceae* anfører positivt udfald for Møllers argininglas uden at skelne mellem, om den skyldes det ene eller det andet enzym, skal positive

prøver altid fortolkes som decarboxylase-positive, når der er tale om stammer af *Enterobacteriaceae*.

### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ved flambering af platinnåle, der har været stukket igennem et lag paraffin, fremkaldes et spruttende fyrværkeri af brændende paraffindråber, der medfører risiko for samtidig spredning af bakterier. Flamberingen bør derfor ske i særlige Bunsen-brændere omgivet af en kappe, der opfanger de klumper og dråber, der springer fra nålen ved opvarmningen.

### 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Forekomsten af decarboxylaser er først og fremmest undersøgt systematisk i familien *Enterobacteriaceae*. Det største materiale kommer fra CDC, Atlanta, publiceret af Ewing i 1973, og vi har valgt at reproducere en oversigtstabel fra dette arbejde, som har den fordel, at resultaterne er angivet i procent, og at de såvidt man kan se må være udført med Møllers teknik – den samme som vi bruger.

#### Decarboxylasereaktioner indenfor *Enterobacteriaceae* (modificeret efter Ewing 1973)

Species	Antal stammer	Lysin		Arginin		Ornithin	
		tegn	% <sup>+1</sup> (% <sup>+2</sup> )	tegn	% <sup>+1</sup> (% <sup>+2</sup> )	tegn	% <sup>+1</sup> (% <sup>+2</sup> )
<i>E. coli</i>	872	d	81 (1,5)	d	16 (39)	d	58 (8)
<i>A-D</i> <sup>3)</sup>	618	d	74 (8)	d	7 (43)	d	12 (3,4)
<i>S. dysenteriae</i>	400	-	0	d	1,5 (11)	-	0
<i>S. flexneri</i>	1817	-	0	-	8 (1,6)	-	0
<i>S. boydii</i>	400	-	0	d	18 (32)	-	2,5 <sup>4)</sup>
<i>S. sonnei</i>	633	-	0	-	0,5 (5)	+	99
<i>E. tarda</i>	494	+	100	-	0 (0,2)	+	100 (0,2)
<i>S. cholerae-suis</i>	20	+	95	(+)	0 (95)	+	100
<i>S. typhi</i>	288	+	100	-/(+)	0 (22)	-	0
<i>S. enteritidis</i>	995	+	95	+/(+)	65 (27)	+	0
<i>A. hinshawii</i> <sup>5)</sup>	315	+	99 (0,3)	(+)/+	25 (74)	+	100
<i>C. freundii</i>	582	-	0	d	45 (45)	d	13 (0,2)
<i>C. diversus</i> = <i>C. koseri</i>	226	-	0	+/(+)	62 (35)	+	100
<i>K. pneumoniae</i>	3560	+	98 (0,1)	-	0,2 <sup>w</sup>	-	0
<i>K. ozaenae</i>	256	d	36 (6,3)	-	4,2 (4)	-	1
<i>K. rhinoscleromatis</i>	50	-	0	-	0	-	0

Species	Antal stammer	Lysin		Arginin		Ornithin	
		tegn	% <sup>1)</sup> (% <sup>2)</sup>	tegn	% <sup>1)</sup> (% <sup>2)</sup>	tegn	% <sup>1)</sup> (% <sup>2)</sup>
<i>E. cloacae</i>	460	-	0	+	92 (2)	+	94 (1,3)
<i>E. aerogenes</i>	121	+	98	-	0	+	96 (1)
<i>E. hafnia</i>	286	+	100	d	5 (7)	+	99
<i>E. agglomerans</i> = <i>Erwinia herbicola</i>	536	-	0	-	0	-	0
<i>S. marcescens</i>	1402	+	100	-	(0,9)	+	100
<i>S. liquefaciens</i>	109	+/(+)	64 (31)	-	0	+	100
<i>S. rubidaea</i>	49	+/(+)	61 (31)	-	0	-	0
<i>P. vulgaris</i>	70	-	0	-	0	-	0
<i>P. mirabilis</i>	372	-	0	-	0	+	98
<i>P. morgani</i>	208	-	0 (1,5 <sup>w</sup> )	-	0	+	96
<i>P. rettgeri</i>	170	-	0	-	0	-	0
<i>P. alcalifaciens</i>	249	-	0 (1 <sup>w</sup> )	-	0 (0,4 <sup>w</sup> )	-	1,2 <sup>w</sup>
<i>P. stuartii</i>	162	-	0 (0,6 <sup>w</sup> )	-	0	-	0
<i>Erwinia</i> spp.	16	-	0	-	0	-	0
<i>Pectobacterium</i> spp.	95	-	0	-	0 (10)	-	0
<i>Y. enterocolitica</i> <sup>6)</sup>	330	-	0	-	0	+	93
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	20	-	0	-	0	-	0

1) % positive efter 1-2 døgns inkubation.

2) % positive efter 3-4 døgns inkubation.

3) A-D = Alkalescens-Dispar (bioserotyper af *E. coli*).

4) Alle var *S. boydii* biotype 13.

5) *A. hinshawii* repræsenterer den tidligere genus *Arizona*.

6) Data fra Niléhn (1969).

### Nøgle

+  $\geq 90\%$  positive inden for 1-2 døgn.

(+) positiv reaktion efter 3 eller flere døgn.

-  $\geq 90\%$  viser ingen reaktion.

-/(+) de fleste negative, nogle stammer dog sent positive.

+/(+) de fleste reaktioner kommer inden for 1-2 døgn, nogle dog senere.

d vekslende udfald af reaktionen (+, (+), -).

w svagt positiv reaktion.

Skråstreg skal i alle tilfælde læses som "eller".

Desuden er decarboxylaserne værdifulde ved adskillelsen af de to genera, *Vibrio* og *Aeromonas*. Hovedmønstrer er:

	Arg	Lys	Orn
<i>Vibrio</i>	-	+	+
<i>Aeromonas</i>	+	d+	-

Arterne *Vibrio parahaemolyticus* og *V. alginolyticus* er dog ofte ornithin-negative. I genus *Plesiomonas* er alle 3 decarboxylaser til stede.

I genus *Pasteurella* er det vist af Frederiksen (1973) og andre, at *P. multocida* og *P. pneumotropica* som regel er ornithin-positive, mens *P. ureae* er negativ. De øvrige decarboxylaser er kun meget sjældent til stede. Ornithindecarboxylase anvendes som led i en biotypeinddeling af *H. influenzae* og *H. parainfluenzae* (Kilian 1976; Bruun & Friis-Møller 1976).

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Det er ikke helt sjældent at finde en negativ decarboxylasereaktion hos stammer, hvor reaktionen efter diagnoseskemaet kunne forventes at være positiv. Om dette skyldes, at prøven ikke er tilstrækkelig følsom, eller om tabsmutanter er særligt hyppige, vides ikke; det kunne også være, fordi de eksisterende diagnoseskemaer trænger til at revideres.

Selv om undtagelser forekommer, har de fleste species af *Enterobacteriaceae* et ret stabilt mønster af bestemte decarboxylasereaktioner, der er af betydelig værdi ved diagnosen. Særlig kan fremhæves *Klebsiella pneumoniae* mønstrer, hvor der alene findes en kraftig lysindecarboxylase. Samme mønstrer findes hos *S. typhi* og hos nogle *Serratia rubidaea*, men det forringer ikke prøvens værdi ved identifikation af *Klebsiella*. Differentialdiagnostisk har det stor værdi, at *Salmonella* regelmæssigt er lysin-positiv og *Citrobacter* lysin-negativ. En undtagelse herfra er *S. paratyphi A*, som er lysin-negativ. Adskillelse mellem *Vibrio* og *Aeromonas* er tidligere omtalt. *Pseudomonas maltophilia* og *Alteromonas putrefaciens* er ornithindecarboxylase-positive.

### 8. Referencer

- Applebaum, D., Sabo, D.L., Fischer, E.H. & Morris, D.R.: Biodegradative ornithine decarboxylase of *Escherichia coli*. Purification, properties, and pyridoxal 5'-phosphate binding site. *Biochemistry* 14: 3675, 1975.

- Brooker, D.C., Lund, M.E. & Blazevic, D.J.: Rapid test for lysine decarboxylase activity in *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 26: 622, 1973.
- Bruun, B. & Friis-Møller, A.: Ampicillin sensitivity and biotypes of recent Danish isolates of *Haemophilus influenzae*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 84: 201, 1976.
- Carlquist, P.R.: A biochemical test for separating paracolon groups. *J. Bact.* 71: 339, 1956.
- Ederer, G.M. & Clark, M.: Motility-indole-ornithine medium. *Appl. Microbiol.* 20: 849, 1970.
- Edwards, P.R. & Fife, M.A.: Lysine-iron agar in the detection of *Arizona* cultures. *Appl. Microbiol.* 9: 478, 1961.
- Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 2. 1(-)-tyrosine decarboxylase from *Streptococcus faecalis*. *Biochem. J.* 38: 242, 1944.
- Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 4. 1(-)-histidine decarboxylase from *Cl. welchii* type A. *Biochem. J.* 39: 42, 1945.
- Ewing, H.E.: Differentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Reactions. Revised. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. DHEW Publ. No. (CDC) 74-8270. Atlanta, Georgia, 1973.
- Falkow, S.: Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of Salmonellae and Shigellae. *J. clin. Path.* 29: 598, 1958.
- Fay, G.D. & Barry, A.L.: Rapid ornithine decarboxylase test for the identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 23: 710, 1972.
- Frederiksen, W.: *Pasteurella* Taxonomy and Nomenclature. In: Winblad, S. (Ed.): Contributions to Microbiology and Immunology, Vol. 2, S. Karger, Basel, 1973, p. 170.
- Gale, E.F. & Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 1. 1(+)-lysine decarboxylase. *Biochem. J.* 38: 232, 1944a.
- Gale, E.F. & Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 3. Distribution and preparation of codecarboxylase. *Biochem. J.* 38: 250, 1944b.
- Goldschmidt, M. & Lockhart, B.M.: Rapid methods for determining decarboxylase activity: arginine decarboxylase. *Appl. Microbiol.* 22: 350, 1971.
- Kilian, M.: A Taxonomic Study of the Genus *Haemophilus*, with the Proposal of a New Species. (Disputats) *J. gen. Microbiol.* 93: 9, 1976.
- Lambert, M.A. & Moss, C.W.: Use of gas chromatography for detecting ornithine and lysine decarboxylase activity in bacteria. *Appl. Microbiol.* 26: 517, 1973.
- Møller, V.: Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta path. microbiol. scand.* 36: 158, 1955.
- Møller, V.: Bidrag til den biokemiske inddeling af Enterobacteriaceae. Disputats, Christreus Bogtrykkeri, København 1956.
- Niléhn, B.: Studies on *Yersinia enterocolitica* with Special Reference to Bacterial Diagnosis and Occurrence in Human Acute Enteric Disease. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 206, 1969.
- Panum, P.L.: Studier over Gåring och Förrådelse med särskilt Hensyn til de mikroskopiske Organismers Andel i Fermentvirkningerne. I. Indledning, Overblik og Plan. *Nordisk medicinsk Arkiv*, Bd. VIII, Nr. 25. 1876, p. 1.
- Proom, H. & Woiwod, A.J.: The distribution of glutamic acid decarboxylase in the family *Enterobacteriaceae*, examined by a simple chromatographic method. *J. gen. Microbiol.* 5: 681, 1951.
- Sharpe, M.E.: Some biochemical characteristics of group D streptococci isolated from infant faeces with reference to their tyrosine decarboxylase activities. *Proc. Soc. appl. Bact.* 1948, p. 13.
- Williams, G.A., Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Detection of arginine dihydrolase in non-fermentative Gram-negative bacteria by use of thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 22: 1135, 1971.
- Zolg, W. & Ottow, J.C.G.: Improved thin-layer technique for detection of arginine dihydrolase among the *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 26: 1001, 1973.

## Kapitel 31

### Arginindihydrolaseprøver

Prøver der påviser de bakterielle enzymer, tilsammen kaldet arginindihydrolasesystemet, der spalter arginin til citrullin og dette videre til ornithin, CO<sub>2</sub> og NH<sub>3</sub> under energiudvikling.

#### 1. Historisk indledning

I 1940 viste Hills, at streptokokker og stafylokokker spaltede arginin til ornithin under samtidig dannelse af NH<sub>3</sub> og CO<sub>2</sub>. Han mente spaltningen skyldtes et specifikt enzym, som han foreslog at kalde arginindihydrolase, men han kunne ikke i detaljer angive reaktionsforløbet, da han hverken fandt citrullin eller urinstof som frie intermediærprodukter. Den i øjeblikket accepterede forklaring på reaktionsforløbet blev fundet af Knivett i 1952. Han viste, at citrullin faktisk optræder som intermediærprodukt, og at der ved dettes spaltning dannes ornithin og carbamylfosfat; dette sidste giver CO<sub>2</sub> og NH<sub>3</sub>, samtidig med at der dannes et molekyle ATP. Hills' dihydrolase var altså i virkeligheden et kompleks af flere enzymer, som nu kaldes dihydrolasesystemet. At denne argininspaltningsproces er energigivende blev siden vist på en meget direkte måde af Sherris et al. (1957) ved hjælp af en *Pseudomonas*-stamme, som i argininfrit medium hørte op med at bevæge sig, når ilten var opbrugt, men genoptog bevægelsen når der tilsattes arginin.

Som bakteriologisk prøve blev afspaltning af NH<sub>3</sub> fra arginin som udtryk for dihydrolase-aktivitet indført i streptokokdiagnostikken af Niven et al. i 1942, og til undersøgelse af lactobaciller indførtes den i 1953 af Briggs. I Møllers decarboxylase-prøve med arginin fra 1955 til undersøgelse af *Enterobacteriaceae* indgik for så vidt også dihydrolasepåvisning, som omtalt i afsnittet om decarboxylase-prøver. Slade et al. (1954) og Sherris et al. (1957) var de første som viste, at pseudomonader også indeholder dihydrolasesystemet. Mere målbevidste forsøg på at udnytte påvisning af dihydrolasesystemet i diagnostikken af gramnegative stave og forsøg på at udarbejde en simpel metode er udført af Hormaeche & Munilla (1957), Sherris et al. (1959), Thornley (1960) og Stanier et al. (1966), og blandt disse er det især Thornley's metode som har fundet anvendelse.

Thornley havde observeret, at i Hugh & Leifson's lukkede forgæringsglas viste en del pseudomonader omslag til basisk reaktion, og hun viste at denne alkalisering var uafhængig af, om der var vækst i glasset, og at den udeblev, hvis inoculum havde været opvarmet til 100°C. Der var altså tale om en virkning af præformede enzymer. I særlige forsøg viste Thornley, at det var arginin-indholdet i peptonen, der betingede reaktionen, og at der dannedes citrullin som intermediærprodukt, således at der ikke kunne være tvivl om, at det var dihydrolasesystemet der fremkaldte reaktionsforskydningen. Hun udformede derefter et særligt halvflydende medium med 0,1% pepton og 1,0% arginin og fenolrødt som indikator; pH var indstillet til 7,2, og efter inokulering dækkedes substratet med smeltet vaselin for at skabe delvis anaerobe forhold. Ved undersøgelse af et stort antal stammer fandtes en klar adskillelse i to grupper. Blandt de arginindihydrolase-positive stammer fandtes næsten alle undersøgte pseudomonader, nogle aeromonader, en enkelt vibrio og et par stammer af *Enterobacter cloacae*. Blandt de arginindihydrolase-negative fandtes *Achromobacter* (heri inkluderet *Acinetobacter*), *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, flertallet af *Enterobacteriaceae* og enkelte pseudomonader.

Thornley's resultater er siden bekræftet af Taylor og Whitby (1964) og af Stanier et al. (1966). De sidstnævnte påviste arginindihydrolasesystemet ved en kvantitativ bestemmelse af argininresten efter 2 timers indvirkning af bakteriesuspensionen i et glas med en bestemt ringe mængde tilsat arginin.

De viste også, at udnyttelse af arginin som eneste kulstof- og energikilde er en egenskab, som *ikke* er korreleret med forekomsten af arginindihydrolase. Desuden har de bekræftet, at enzymerne er konstitutive, og at de er inaktive i nærvær af ilt, men aktive under anaerobe forhold.

Analyse af arginin-nedbrydningsprodukter ved hjælp af tyndtlagskromatografi og gaskromatografi tillader bedre end de simplificerede metoder at afgøre, hvilke enzymer der har været aktive. De har også været anbefalet til rutinebrug (Williams et al. 1971; Moss et al. 1972; Zolg & Ottow 1973), specielt til at skelne mellem arginindecaboxylase og arginindihydrolasesystemet.

## 2. Biokemisk baggrund

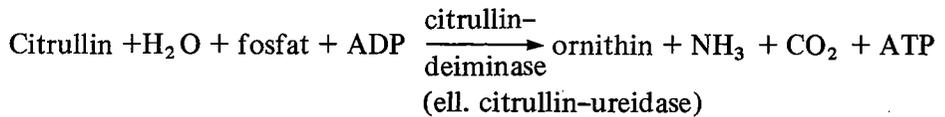
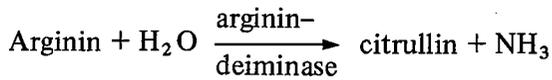
Der er mindst tre måder, hvorpå bakterier kan nedbryde arginin:

(1) Ved hjælp af en aminosyreoxidase, som er en deaminase, kan bl.a. *Proteus* danne den tilsvarende  $\alpha$ -ketosyre, dvs.  $\alpha$ -ketoglutarat med samtidig frigørelse af  $\text{NH}_3$  (se kapitel 32).

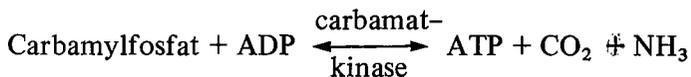
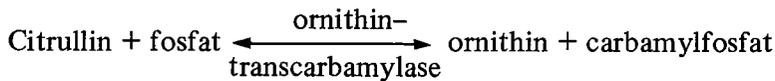
(2) Ved hjælp af en decaboxylase kan mange bakterier danne den tilsvarende amin, dvs. agmatin, som derefter af enzymet agmatinase i alle tilfælde spaltes videre til putrescin og urinstof, der evt. yderligere vil kunne spaltes til  $\text{NH}_3$  og  $\text{CO}_2$  (se kapitel 30).

(3) Ved hjælp af arginindihydrolasesystemet kan en del bakterier ved en hydrolytisk proces først danne citrullin og derefter ornithin; det er den proces dette kapitel handler om.

Reaktionsforløbet i dihydrolasesystemet er følgende:



Den sidste af de anførte reaktioner beskrives også som opdelt i to individuelle reaktioner (Barker 1961; Schimke et al. 1966):



Da de tre nævnte former for argininomdannelse alle fører til dannelse af alkaliske produkter, må to testbetingelser være opfyldt, for at man kan tolke et indikatoromslag til alkalisk side som udtryk for en positiv dihydrolase-reaktion: (1) Den oxidative deaminase må ikke kunne fungere, og det kan opnås ved at skabe anaerobe forhold i prøven. (2) Decarboxylasen må ikke kunne fungere, og det kan undgås hvis den nødvendige induktion ved lav pH forhindres, hvilket kan ske ved at holde pH omkring neutralpunktet i hele forsøgsperioden. På grund af dihydrolasesystemets egenskaber kan disse betingelser let opfyldes. Enzymerne er nemlig konstitutive, så induktion er overflødig, og de fungerer kun under anaerobe betingelser. Det, der kræves, er derfor: 1) en ikke på forhånd induceret celledisuspension, 2) en argininopløsning med moderat bufferkapacitet indstillet omkring neutralpunktet, og 3) anaerobe betingelser i reaktionsblandingen, som kan opnås med et lag paraffinolie. Under disse forhold kan man éntydigt fortolke et indikatoromslag til alkalisk retning som ensbetydende med tilstedeværelse af arginindihydrolase.

Modsat decarboxylasetesten, hvor vækst er en forudsætning, er dihydrolasetesten udpræget en direkte enzymtest baseret på præformeret enzym og kræver derfor et relativt stort inoculum.

Dannelse af dihydrolasesystemets enzymer er upåvirket af glukose i mediet. Syntesen er konstitutiv og foregår både under aerobe og anaerobe betingelser. Hvorvidt de udelukkende er aktive under anaerobe forhold, som hævdet af Stanier et al., er usikkert; litteraturen i øvrigt tyder på, at der er aktivitet både under aerobe og anaerobe forhold. Aktiviteten hæmmes ikke af cyanid, der er en kraftig inhibitor for decarboxylase (Taylor & Whitby 1964).

### 3. Valg af metode

Hvis man ønsker så vidt muligt at differentiere mellem tilstedeværelse af arginindecarboxylase og arginindihydrolase, må man udføre to prøver: (1) Møllers decarboxylase-prøve, og (2) Thornley's dihydrolase-prøve, hvor man er sikker på, at decarboxylasen ikke vil fungere. Hvis kun én af prøverne er positiv, er resultatet klart; hvis begge er positive er det sikkert, at dihydrolasesystemet er tilstede, men det er ikke dermed udelukket, at decarboxylasen samtidig er til stede.

I Møllers arginingsglas til decarboxylase-undersøgelse er det en forudsætning, at inoculum kommer i vækst, men det ser ud til – efter erfaringer på Serum-instituttet – at samme glas også kan bruges til en direkte enzymtest for dihydrolase ved at suspendere en større mængde kultur i mediet.

I hvert fald har det vist sig med pseudomonader – som kun vil vokse meget sparsomt eller slet ikke under paraffinolie – at man får positiv reaktion med stort set de samme pseudomonasarter, som gav positivt udfald med en modificeret Thornley-prøve (Reiter og Bruun i diagnoseafdelingen, upubliceret). I streptokokafdelingen har man over en længere periode sammenlignet Møllers arginin-prøve og den tidligere anvendte arginin-prøve med  $\text{NH}_3$  påvisning og ikke fundet systematiske forskelle.

Disse erfaringer synes at vise, at Møllers glas udmærket kan bruges til en dihydrolase-prøve for strikt aerobe bakterier, når man i stedet for at betragte det som et vækstmedium bruger det som argininopløsning og sørger for at lave en passende tæt bakteriesuspension i opløsningen. Der vil derfor i rutinediagnostik af strikt aerobe bakterier ikke være grund til at anvende en særskilt dihydrolase-prøve, hvorimod man til fakultative bakterier og ved systematiske eller specielle undersøgelser må anbefale at bruge både Møllers decarboxylase-prøve og Thornley's dihydrolase-prøve.

I det følgende beskrives kun Thornley's prøve til påvisning af arginin-dihydrolasesystemet, hvorimod der med henblik på anvendelse af Møllers arginingsglas til dihydrolase-påvisning henvises til ovenstående og til afsnittet om decarboxylaser (se kap. 30).

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Thornley's metode* (let modificeret, idet pepton er udeladt)

*Substrat*

L-arginin monohydroklorid	1,0%
NaCl	0,5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03%
Fenolrødt	0,001%
Agar	0,3%

Dest. vand; pH indstilles til 7,0–7,2.

Substratet aftappes i 5 cm høje lag i almindelige 155 x 14/15 mm reagensglas. Efter inokulation dækkes substratet med et lag smeltet paraffin eller man kan bruge et lag paraffinolie som i Møllers glas. Som kontrol anvendes samme substrat uden arginintilsætning. Det er vigtigt, at pH er indstillet på nøjagtig samme værdi, så prøveglas og kontrolglas har samme farve.

*Udførelse:* Glassene inokuleres fra en døgngammel renkultur på standardplade uden forgærbart kulhydrat. Inokuleringen skal være massiv i form af en synlig tyk søjle af bakterier ned igennem det halvflydende substrat. Dette opnås bedst ved hjælp af en pasteurpipette fyldt med en meget tæt suspension af renkulturen. Glasset inkuberes ved 35°C.

*Aflæsning:* Prøve- og kontrolglas aflæses efter 4 timer og efter 1 døgn. Indikatorens omslag til rød farve betegnes som positiv reaktion. Som ved en ureasereaktion skal der være klar farveforskel mellem kontrol- og prøveglas for at man kan stole på en positiv reaktion. Prøver, der er positive efter 4 timer, betegnes som stærke: +++, senere indtrædende omslag som svage: +. Farveomslaget vil være tydeligst lige omkring inoculum; man kan ikke forvente, at hele substratsøjlen skifter farve.

*Fortolkning:* Da en oxidativ desaminering er udelukket på grund af paraffinolie og arginin er eneste kvælstofholdige stof, kan et indikatoromslag med sikkerhed tolkes som tilstedeværelse af arginindihydrolasesystemet.

#### 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige ud over de sædvanlige ved omgang med patogene bakterier.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Den eksisterende viden om arginindihydrolasesystemets udbredelse blandt bakterier er meget mangelfuld. Af oplysningerne i litteraturen kan man ikke altid afgøre, om bestemte bakterier indeholder dihydrolase, decarboxylase eller begge enzymer. De følgende data er samlet fra de forskellige arbejder om dihydrolase, især Niven et al., Møller, Thornley, Stanier et al., og suppleret med egne erfaringer.

*Pseudomonas*: Følgende species er regelmæssigt positive: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. pseudomallei* og *P. mallei*. I følgende species er nogle stammer positive: *P. stutzeri*, *P. picketii*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes* og *P. fragi*.

*Enterobacteriaceae*: I særlige undersøgelser er det med sikkerhed vist, at praktisk talt alle stammer af *Salmonella* og *Enterobacter cloacae* er positive. Men *Salmonella* er så sent positive, at det tjener til at differentiere dem fra *E. cloacae* ved aflæsning på 2. dag. Formentlig er stammer af mange andre genera, fx. *Escherichia*, *Shigella* og *Citrobacter*, også positive.

*Vibrionaceae*: Dihydrolase er sikkert påvist i nogle *Aeromonas*-stammer og en enkelt stamme af *Vibrio anguillarum*, men systematiske undersøgelser mangler.

*Chromobacterium*: Nogle stammer af *C. violaceum*.

*Micrococcus*: Nogle stammer af *M. varians*.

*Staphylococcus*: Alle stammer af *S. aureus* og *S. epidermidis* og de fleste stammer af *S. saprophyticus*.

*Streptococcus*: De fleste species. Enkelte species som *S. bovis* og *S. salivarius* og stammer af gruppe M og O er negative.

*Bacillus*: *B. licheniformis* angives som positiv.

*Lactobacillus*: Ca.  $\frac{2}{5}$  af de undersøgte species.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Kun for genus *Streptococcus* er der et tilstrækkeligt stort erfaringsmateriale til at vise, at prøven er værdifuld til at differentiere på species-niveau. Det samme synes at være tilfældet i genus *Lactobacillus* og genus *Pseudomonas*, men i hvert fald for sidstnævntes vedkommende er erfaringerne med de sjældnere species foreløbig for små. Til adskillelse af *Micrococcus* og *Staphylococcus* har prøven en vis værdi, men nogle stammer i begge grupper afviger fra hovedmønstret.

I familien *Enterobacteriaceae* er situationen den, at man rutinemæssigt registrerer en alkalisk reaktion i Møllers decarboxylase-prøve som positiv

uden sikkert at kunne skelne mellem decarboxylase- og arginindihydrolaseaktivitet; også som sådan har prøven værdi, men en særskilt undersøgelse af dihydrolasens forekomst ville være ønskelig.

## 8. Referencer

- Barker, H.A.: Fermentation of nitrogenous compounds. In: Gunsalus, I.C. & Stanier, R.Y. (Eds.): *The Bacteria*, vol. II, Academic Press, 1961, p. 156.
- Briggs, M.: The classification of lactobacilli by means of physiological tests. *J. gen. Microbiol.* 9: 234, 1953.
- Hills, G.M.: Ammonia production by pathogenic bacteria. *Biochem. J.* 34: 1057, 1940.
- Hormaeche, E. & Munilla, M.: Biochemical tests for the differentiation of *Klebsiella* and *Cloaca*. *Int. Bull. bact. Nomencl. Tax.* 7: 1, 1957.
- Knivett, V.A.: Citrulline as an intermediate in the breakdown of arginine by *Streptococcus faecalis*. *Biochem. J.* 50: 30, 1952.
- Moss, C.W., Lambert, M.A. & Cherry, W.B.: Use of gas chromatography for determining catabolic products of arginine by bacteria. *Appl. Microbiol.* 23: 889, 1972.
- Møller, V.: Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta path. microbiol. scand.* 36: 158, 1955.
- Niven, C.F., Smiley, K.L. & Sherman, J.M.: The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bact.* 43: 651, 1942.
- Schimke, R.T., Berlin, C.M., Sweeney, E.W. & Carroll, W.R.: The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma hominis* 07. *J. biol. Chem.* 241: 2228, 1966.
- Sherris, J.C., Preston, N.W. & Shoesmith, J.G.: The influence of oxygen and arginine on the motility of a strain of *Pseudomonas* sp. *J. gen. Microbiol.* 16: 86, 1957.
- Sherris, J.C., Shoesmith, J.G., Parker, M.T. & Breckon, D.: Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria: their use in the identification of pseudomonads. *J. gen. Microbiol.* 21: 389, 1959.
- Slade, H.D., Doughty, C.C. & Slamp, W.C.: The synthesis of high-energy phosphate in the citrulline ureidase reaction by soluble enzymes of *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.* 48: 338, 1954.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.Y. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.* 43: 159, 1966.
- Taylor, J.J. & Whitby, J.L.: *Pseudomonas pyocyanea* and the arginine dihydrolase system. *J. clin. Path.* 17: 122, 1964.
- Thornley, M.J.: The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. appl. Bact.* 23: 37, 1960.
- Williams, G.A., Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Detection of arginine dihydrolase in non-fermentative Gram-negative bacteria by use of thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 22: 1135, 1971.
- Zolg, W. & Ottow, J.C.G.: Improved thin-layer technique for detection of arginine dihydrolase among the *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 26: 1001, 1973.

## Kapitel 32

### Fenylalanindeaminaseprøver

Enzymet fenylalanindeaminase påvises ved at konstatere at bakterierne er i stand til af aminosyren fenylalanin at danne fenylpyrodruesyre.

#### 1. Historisk indledning

Med et klassisk arbejde af Krebs i 1935 begyndte det nærmere studium af oxidativ aminosyrenedbrydning. Krebs anvendte lever- og nyrehomogener, men samme år viste Bernheim et al., at også en suspension af *Proteus*-bakterier var i stand til at oxidere, decarboxylere og deaminere en række aminosyrer, deriblandt fenylalanin. Stumpf & Green (1944) viste eksperimentelt, at der ved bakteriel deaminering af en bestemt  $\alpha$ -aminosyre dannedes den tilsvarende  $\alpha$ -ketosyre og ammoniak. (I enzym-nomenklaturen betegnes aminosyredeaminase som regel kun som aminosyreoxidase, hvad der kan virke lidt forvirrende).

Til aminosyren fenylalanin svarer ketosyren fenylpyrodruesyre, men at denne sidste faktisk dannes ved bakteriel deaminering af fenylalanin var ikke kendt i 1938, da Henriksen & Closs i Norge i forbindelse med nordmanden Fölling's (1934) grundlæggende arbejde over sygdommen fenylketonuri påtog sig at undersøge, om noget af den i urinen udskilte fenylpyrodruesyre stammede fra tarmbakteriers omsætning af fenylalanin. De viste, at en *Proteus*-stamme var i stand til af fenylalanin at danne store mængder fenylpyrodruesyre, som påvises ved fremkomst af en grøn farve efter tilsætning af ferriammoniumsulfat. Da en samtidig undersøgt colistamme ikke førte til dannelse af fenylpyrodruesyre, så forfatterne en mulighed for at anvende evnen til at danne fenylpyrodruesyre af fenylalanin i bakterieklassifikationen. De undersøgte derfor et større antal bakteriearter, idet de tilsatte tætte suspensioner til et mineralmedium indeholdende fenylalanin og glycerin og kunne vise, dels at en positiv farvereaktion indtrådte så hurtigt ( $\frac{1}{2}$  til 1 time), at den måtte skyldes præformeret enzym, dels at kun stammer af klassisk *Proteus* og Morgans bakterie gav kraftigt positive reaktioner.

Dette udmærkede og originale arbejde satte sig ingen spor, før Henriksen i 1950 publicerede et nyt arbejde om fenyropyrodruesyrereaktionen, som han dengang kaldte den, og påny viste, at blandt *Enterobacteriaceae* var *Proteus*-gruppen den eneste, som gav meget stærke reaktioner.

I årene derefter fulgte en lang række arbejder, hvor Henriksens resultater blev bekræftet og metoden modificeret på forskellig måde.

Singer & Volcani (1955) viste, at også *Providencia* gav en kraftig positiv reaktion, og foreslog dels at bruge ferriklorid som et mere følsomt reagens i stedet for ferriammoniumsulfat, dels at bruge aminosyren tryptofan i stedet for fenylalanin, fordi den røde farve, som indolpyrodruesyren danner, er mere stabil end den grønne farve, som dannes med fenyropyrodruesyre. Også Henriksen har senere været inde på tryptofanets fordel (Bøvre et al. 1974).

Allerede Henriksen & Closs havde fremhævet betydningen af god ilttilgang til suspensionen og anbefalet at lægge prøveglasset horizontalt; Singer & Volcani anbefalede af samme grund at sætte glassene i en rystemaskine.

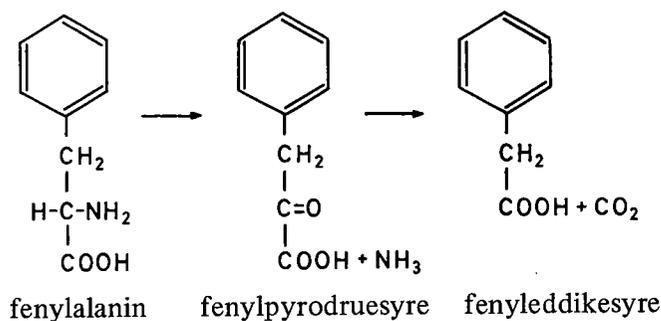
I Frankrig indførtes prøven af Buttiaux et al. (1954) og af Ben Hamida & Le Minor (1956); i England blev den først anvendt af Clarke & Shaw (1954) og Shaw & Clarke (1955). De anvendte fenylalanintesten kombineret med Leifson's malonattest og udformede den som en mikrometode. Ewing et al. (1957 citeret efter Ewing 1962) indførte prøven i USA og anbefalede at bruge en skråagar med tilsat fenylalanin og at flyde kulturen med reagenset.

Senere modifikationer skyldes Vassiliadis & Politi (1968) og Ederer et al. (1971), som kombinerede fenylalanin-prøven med en ureaseprøve.

Mikrometoder er foreslået af Stewart (1961) og af Bergquist & Searcy (1963) og paper-strip metoder ("Phenestix") af Smith & Free (1962) og Goldin & Glenn (1962).

## 2. Biokemisk baggrund

I den menneskelige organisme er det første trin i den oxidative nedbrydning af fenylalanin normalt en omdannelse til tyrosin ved hjælp af en hydroxylase. (Medfødt mangel på evne til at danne denne hydroxylase giver anledning til fenylketonuri, en stofskiftesygdom som medfører åndssvaghed). Denne hydroxylase er også påvist hos enkelte bakterier (Letendre et al. 1975), men det første trin i den oxidative nedbrydning af fenylalanin hos bakterier er normalt en deaminering til fenyropyrodruesyre. Næste trin kan være en decarboxylering, der fører til dannelse af fenyleddikesyre.



De fleste bakterier indeholder aminosyreoxidaser, som er i stand til at udføre den indledende deaminering til den tilsvarende ketosyre; det videre forløb af oxideringen af de forskellige aminosyrer kan arte sig meget forskelligt. Nogle aminosyreoxidaser udviser en tydelig substratspecificitet, andre kun en ringe. Bernheim et al. (1935) påviste, at suspensioner af *Proteus*-bakterier oxiderer en lang række aminosyrer; i nogle tilfælde skete der både en deaminering og en decarboxylering, i andre tilfælde kun en deaminering. Det sidste var bl.a. tilfældet med fenylalanin. Følgelig måtte man forvente en ophobning af fenylpyrodruesyre, og at dette var tilfældet viste Stumpf & Green (1944). Det har senere vist sig, at *Proteus*-bakterier er de eneste *Enterobacteriaceae*, der giver anledning til ophobning af fenylpyrodruesyre ved nedbrydning af fenylalanin, men om det skyldes mangel på en substrat-specifik decarboxylase eller en auto-intoksikation af suspensionen (Seidenberg et al. 1962) er ikke kendt.

Den dannede fenylpyrodruesyre påvises med ferrijoner som reagens ved fremkomst af en grøn farve ved sur reaktion. Reaktionen for denne proces er ikke med sikkerhed kendt. Ferrijoner danner også med visse andre ketosyrer forskellige farvede forbindelser, således en kirsebærrød farve med indolpyrodruesyre dannet af tryptofan (Singer & Volcani 1955). Farverektionen angives at være afhængig af, at carbonylgruppen i ketosyren optræder i enolform, og det er vist, at farvedannelsen er korreleret med suspensionernes mulighed for at danne de til ketosyren svarende hydrazoner. Nogen umiddelbar praktisk betydning for prøvens udførelse har disse konstateringer vistnok ikke. Derimod er det af betydning, at det er vist, at fosfat hæmmer dannelse af farvekomplekset (Smith & Free 1962).

Aminosyredeaminasens syntese stimuleres af alkalisk pH. Måske burde man derfor overveje at bruge suspensioner af kulturer dyrket på medier med pH omkring 8. Direkte induktion af enzymdannelsen med fenylalanin synes ikke at finde sted; tværtimod kan man vise, at suspensioner af kultur fra fenyl-

alaninholdigt medium viser nedsat aktivitet, muligvis fordi de dannede ammoniumjoner udøver repression på enzymdannelse og/eller -aktivitet. Glukose i vækstmediet nedsætter enzymaktiviteten. Rigelig ilttilførsel begunstiger den oxidative deaminering.

### 3. Valg af metode

Hvis fenylalanindeaminase-prøven alene bruges til at skille *Proteus*-stammer fra andre *Enterobacteriaceae*, opstår der ingen vanskeligheder, fordi den meget kraftige sortgrønne farve, som *Proteus* giver, uden vanskelighed skelnes fra de antydninger af grønfarvning, der kan forekomme med stammer af andre genera.

Hvis man derimod ønsker at anvende prøven inden for andre bakteriegrupper, fx. *Moraxella* og *Flavobacterium*, har det vist sig, at man kan komme til at stå overfor en skala af grønfarvning, hvor skellet mellem positive og negative reaktioner bliver ganske arbitrært.

Ifølge undersøgelser af Henriksen (Bøvre et al. 1974) kunne det se ud til, at en tryptofandeaminase-prøve vil være bedre egnet i disse tilfælde, da man med denne øjensynlig undgår de fleste af de reaktioner, som kun ytrer sig med en svag farvning i fenylalanindeaminase-prøven. Tryptofanprøven må dog først undersøges systematisk i flere laboratorier.

Den modifikation af Bergquist & Searcy's metode af fenylalanintesten, som har været anvendt i diagnoseafdelingen i de sidste 10 år, har fungeret tilfredsstillende, når talen er om *Proteus*, men det gør tilsyneladende de fleste udformninger af prøven. En større følsomhed, hvis det ønskes, kunne formentlig opnås ved en mere aktiv iltning af suspensionen, fx. ved at ryste glassene eller ved at reducere væskevolumen og lægge glassene horizontalt.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *Diagnoseafdelingens modifikation af Bergquist & Searcy's metode* *Substrat*

L-fenylalanin 0,5% i dest. vand

0,5 ml aftappet i Widalglass (70 x 10/11 mm)

Glas mærket: "Fenylal"

*Reagens*

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2%

5N HCl 1%

i dest. vand.

*Udførelse:* Fra en døgngammel renkultur på bouillon- eller blodagar opstemmes tæt i substratet. Suspensioner fra blodagar giver i nogle tilfælde stærkere reaktioner end suspensioner fra bouillonagar. Glasset henstilles i termostat ved 35°C i 2–4 timer, hvorefter et par dråber af reagenstilsættes.

*Aflæsning:* Prøven aflæses umiddelbart efter reagenstilsætning. En positiv prøve viser sig ved, at der omgående indtræder en kraftig mørkegrøn farvning af hele glassets indhold. Farven vil i nogle tilfælde hurtigt begynde at aftage i styrke, så glassene må ikke henstå til senere aflæsning.

*Fortolkning:* Kun glas der viser en kraftig mørkegrøn farve betragtes som sikkert positive. Svagere nuancer af grønt (grønlig farve) kan ses med visse bakterier, men tolkningen er her usikker og forudsætter kendskab til forholdene i den pågældende bakteriegruppe for at kunne udnyttes.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige ud over de sædvanlige ved arbejde med patogene bakterier.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Oplysninger om fenylalanindeaminase findes ikke systematisk i Bergey's Manual, 8. udg., undtagen for *Enterobacteriaceae*. Det skyldes, at mange grupper af bakterier aldrig har været undersøgt. De nedenanførte kommentarer er derfor stort set baseret på egne erfaringer.

*Alcaligenes*: *A. faecalis* (syn. *A. odorans*): grønlig farve.

*Enterobacteriaceae*: *Proteus*: alle species. Undtagelsesvis kan enkelte stammer være negative. *Erwinia herbicola*: en del stammer giver grønlig farve.

Undtagelsesvis kan en grønlig farve også ses hos stammer af alle andre species.

*Aeromonas*: enkelte stammer kan give en grønlig farve.

*Agrobacterium*: *A. radiobacter*.

*Flavobacterium*: en del kan give en grønlig farve.

*Moraxella*: *M. phenylpyruvica* og *M. urethralis*: alle stammer.

*Acinetobacter*: typiske stammer er altid negative; psychrofile stammer som ligner *Acinetobacter*, men er oxidase-positive (= Thornley's phenon 3, (Thornley, 1967)), kan give en grønlig farve.

*Bacillus*: *B. sphaericus*, *B. apiarius*, *B. pantothenicus* og *B. cirroflagellosus* og nogle stammer af *B. firmus* er angivet som positive.

*Mycobacterium*: blandt hurtigvoksende arter angives *M. phlei* og *M. vaccae* at være positive.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Til verifikation af diagnosen af alle *Proteus*-arter er prøven meget pålidelig, da kun meget få stammer (2-3%) er negative. Prøvens værdi i øvrigt er så dårligt undersøgt, at man ikke kan sige noget bestemt derom i øjeblikket.

## 8. Referencer

- Bergquist, L.M. & Searcy, R.L.: A micro method for detection of utilization of phenylalanine by microorganisms. *Amer. J. clin. Path.* 39: 544, 1963.
- Bernheim, F., Bernheim, M.L.C. & Webster, M.D.: Oxidation of certain amino acids by "resting" *Bacillus proteus*. *J. biol. Chem.* 110: 165, 1935.
- Buttiaux, R., Osteux, R., Fresnoy, R. & Moriamez, J.: Les propriétés biochimiques caractéristiques du genre *Proteus*. Inclusion souhaitable des *Providencia* dans celui-ci. *Ann. Inst. Pasteur* 87: 375, 1954.
- Bøvre, K., Fuglsang, J.E., Henriksen, S.D., Lapage, S.P., Lautrop, H. & Snell, J.J.S.: Studies on a collection of Gram-negative bacterial strains showing resemblance to *Moraxellae*: Examination by conventional bacteriological methods. *Int. J. system. Bact.* 24: 438, 1974.
- Clarke, P.H. & Shaw, C.: Biochemical tests for *Proteus* and *Providencia* cultures. *J. gen. Microbiol.* 10: 1, 1954.
- Ederer, G.M., Chu, J.H. & Blazevic, D.J.: Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production. *Appl. Microbiol.* 21: 545, 1971.
- Ewing, W.H., Davis, B.R. & Reavis, R.W.: Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. *Publ. Hlth Lab.* 15: 153, 1957.
- Ewing, W.H.: *Enterobacteriaceae*. Biochemical methods for group differentiation. U.S. Dept. Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Publ. no. 734, CDC, Atlanta, Georgia 1962.
- Fölling, A.: Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 227: 169, 1934.
- Goldin, M. & Glenn, A.: A simple phenylalanine paper strip method for identification of *Proteus* strains. *J. Bact.* 84: 870, 1962.
- Hamida, F.B. & Le Minor, L.: Une méthode rapide de recherche de la transformation de la L-phényl-alanine en acide phényl-pyruvique. *Ann. Inst. Pasteur* 90: 671, 1956.

- Henriksen, S.D. & Closs, K.: The production of phenylpyruvic acid by bacteria. *Acta path. microbiol. scand.* 15: 101, 1938.
- Henriksen, S.D.: A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of *Proteus* from other enteric organisms. *J. Bact.* 60: 225, 1950.
- Krebs, H.A.: Metabolism of amino-acids. III. Deamination of amino-acids. *Biochem. J.* 29: 1620, 1935.
- Letendre, C.H., Dickens, G. & Guroff, G.: Phenylalanine hydroxylase from *Pseudomonas* sp. (ATCC 11299 a) *J. biol. Chem.* 250: 6672, 1975.
- Seidenberg, M., Martinez, R.J. & Guthrie, R.: Phenylalanine metabolism: the production of phenylacetaldehyde by a *Proteus* species. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 470, 1962.
- Shaw, C. & Clarke, P.H.: Biochemical classification of *Proteus* and Providence cultures. *J. gen. Microbiol.* 13: 155, 1955.
- Singer, J. & Volcani, B.E.: An improved ferric chloride test for differentiating *Proteus*-Providence group from other *Enterobacteriaceae*. *J. Bact.* 69: 303, 1955.
- Smith, R.S. & Free, A.H.: A simplified chemical test for the differentiation of *Proteus*. *Amer. J. med. Techn.* 28: 24, 1962.
- Stewart, D.J.: A micro-method for performing the phenylalanine test on cultures from multi-carbohydrate media. *Nature (Lond.)* 191: 521, 1961.
- Stumpf, P.K. & Green, D.E.: L-amino acid oxidase of *Proteus vulgaris* *J. biol. Chem.* 153: 387, 1944.
- Thornley, M.J.: A taxonomic study of *Acinetobacter* and related genera. *J. gen. Microbiol.* 49: 211, 1967.
- Vassiliadis, P. & Politi, G.: Milieu combiné pour la recherche de l'uréase et la transformation de la L-phénylalanine en acid phénylpyruvique. *Ann. Inst. Pasteur* 114: 431, 1968.

## Kapitel 33

### Indolprøver

Prøver, der påviser tilstedeværelse af indol i bakteriekulturer. Påvist indol tages som udtryk for, at bakterierne har dannet enzymet tryptofanase, som spalter aminosyren L-tryptofan under dannelse af indol.

#### 1. Historisk indledning

Virchow har beskrevet, at han under kolera-epidemien i Europa 1848-49 ved undersøgelse af koleralig iagttagelse en smuk rosarød farve, når der blev hældt salpetersyre over tarmindeholdet, hvor han iøvrigt havde iagttaget "vibrioner og fimrende monader" (cit. fra Schuchardt 1887). Sandsynligvis skyldtes den røde farve indol i tarmindeholdet fremkaldt af vibrionerne, men det vidste Virchow ikke, dog satte han den i forbindelse med en eller anden form for proteinnedbrydning under forrådnelse.

Kort efter at Robert Koch i 1883 havde påvist koleravibrioner i Ægypten og Indien, blev der fundet en del andre vibrioner, og problemet blev derefter at finde kriterier, som kunne skille den ægte koleravibrion fra de uægte. Under dette arbejde opdagede flere forskere i 1886 og 1887 uafhængigt af hinanden og uafhængigt af Virchows iagttagelse, at hvis man satte svovlsyre til en kolera-kultur, fremkom der en rød farve – den såkaldte kolerarødt-reaktion. Prøven var ganske vist ikke til megen nytte i differentialdiagnosen, da de fleste vibriokulturer gav samme røde farve (Poehl 1886; Bujwid 1887; Dunham 1887).

En forklaring på kolerarødt-reaktionen gav kemikeren Salkowski i 1887. Han viste, at kemisk set er "kolerarødt" ikke noget særegent farvestof, men at der i kulturen foregår en nitrosoindolreaktion. Denne består i, at indol i nærvær af nitrit og ved stærk sur reaktion giver en rød farve. Reaktionen var angivet af kemikeren von Baeyer, der i 1870 brugte den til indolpåvisning under arbejde med farvestoffet indigo, som kemisk er nært beslægtet med indol. Det nødvendige nitrit til fremkaldelse af nitrosoindolreaktionen i kolerakulturerne stammede fra bakteriernes reduktion af de små mængder nitrat, der som regel var til stede i medierne som forurening. Ved samme lejlighed viste Salkowski, at nogle af de såkaldte forrådnelsesbakterier også gav en nitrosoindolreaktion.

Kitasato (1889), der på det tidspunkt arbejdede i Robert Koch's laboratorium, så de muligheder, der lå i at udnytte indolpåvisning som et middel til at skelne mellem forskellige bakterier, og viste bl.a., at *E. coli* var indol-positiv, mens tyfus-paratyfus-gruppens bakterier var indol-negative. Hurtigt derefter vandt metoden indpas i de bakteriologiske laboratorier, idet man nu foruden svovlsyre satte nitrat eller nitrit til kulturerne (Salkowski's prøve).

En ny form for indolprøve indførtes efter at det var blevet vist, at en rød farvereaktion, som Ehrlich havde opdaget i 1900 ved tilsætning af p-dimetylaminobenzaldehyd til urin, skyldtes indol. Max Neisser, der var elev af Ehrlich, prøvede reaktionen på bakteriekulturer og fik sin elev Böhme til at gennemarbejde metoden. I en artikel fra 1905 viste Böhme, at denne Ehrlich's indolreaktion var mere følsom end Salkowski's prøve, og anbefalede den til almindelig bakteriologisk brug; reagentet bestod af paradimetylaminobenzaldehyd opløst i 96% ætylalkohol og koncentreret saltsyre. Böhme anbefalede sekundær tilsætning af et oxidationsmiddel (kaliumpersulfat), som dog vist hurtigt gik af brug. Böhme bekræftede den tidligere erfaring, at det røde farvestof, som dannes ved reaktionen, er opløseligt i amylalkohol.

Formentlig med udgangspunkt i denne observation foreslog Kovacs i 1928 (Kovacs 1928, 1931) et nyt indolreagens, hvor paradimetylaminobenzaldehydet var opløst i amylalkohol. Fordelen herved er ikke umiddelbart indlysende, men sandsynligvis beror den på, at reagentet lettere bliver liggende som et lag oven på kulturen, fordi amylalkohol er mindre vandopløselig end ætylalkohol. Der synes dog også at være tale om en primitiv form for ekstraktion ved at bruge amylalkohol. Reagentet er mere ustabil end Ehrlich-Böhme's reagens, men Gadebusch & Gabriel (1956) har senere angivet at hvis man anvender isoamylalkohol, bliver det mere stabilt.

Ved de tre hidtil omtalte indolprøver, Salkowski's, Ehrlich's og Kovacs', sættes reagentet direkte til kulturen, men da der i bakteriekulturer kan dannes andre stoffer (forskellige indolderivater, glukosamin, hæm, osv.), som fremkalder samme røde farve med reagentet som indol, kan prøven udført på denne måde ikke éntydigt tolkes som en prøve for tilstedeværelse af enzymet tryptofanase. En større specificitet af prøven har man derfor forsøgt at opnå ved isolation af indolet ved destillation eller ekstraktion, før reagentet tilsættes. Da indol er mere flygtigt end de andre stoffer, som giver samme farvereaktion, foreslog Goré i 1921 (Malone & Goré 1921, Goré 1921) at udføre prøven ved at fugte glassets vatprop med reagentet og sætte kulturerne i et 100°C vandbad, hvorefter indoldampene sætter sig i proppen, der farves rød. Samme princip kan praktiseres ved at placere et stykke filterpapir fugtet med reagentet i låget over en pladekultur under inkubationen. Allerede tidligt blev der peget på muligheden for at anvende forskellige organiske opløsningsmidler til eks-

traktion af indolet før reagenstilsætningen, og i 1958 anbefalede Isenberg & Sundheim en metode baseret på ekstraktion med toluen, og Elisabeth O. King anvendte i 1959 en forudgående xylenekstraktion til påvisning af indoldannelse i kulturer af *Flavobacterium meningosepticum*. Det kan nævnes, at allerede i 1922 havde Martin Kristensen i diagnoseafdelingen, ved indolundersøgelse af *Haemophilus influenzae* foretaget udrystning med kloroform eller amylalkohol før reagenstilsætning. Ved en forudgående ekstraktion opnår man ikke blot en mere specifik reaktion, men ved at anvende et forholdsvis lille volumen ekstraktionsmiddel i forhold til kulturens volumen opnår man også en koncentreret af indolet og derved en moderat forøgelse af følsomheden i sammenligning med prøver, hvor reagenset tilsættes direkte.

For en fuldstændigheds skyld skal anføres to indolprøver baseret på andre kemiske reaktioner end de hidtil nævnte. Det er dels Gnezda's prøve (Gnezda 1899; Holman & Gonzales 1923), hvor reagenset er oxalsyre, dels en prøve anbefalet af Isenberg & Sundheim (1958), hvor reagenset er hydroxylamin. Den kemiske reaktion bag fremkomsten af den røde farve ved disse reaktioner kendes ikke. Efter litteraturen at dømme anvendes disse metoder ikke idag.

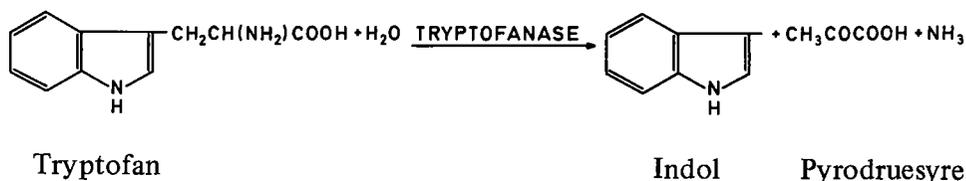
En direkte enzymprøve, hvor det præformerede enzym (tryptofanase) i en bakteriesuspension bringes i kontakt med det specifikke substrat (L-tryptofan) under optimale reaktionsbetingelser, er først beskrevet af Clarke & Cowan (1952) og her i landet anvendt af Bülow (upubliceret).

Angående forskellige mikrotests, spottests og striptests til indolpåvisning, som alle er tillæmpninger baseret på en af de ovennævnte metoder, henvises til Weaver et al. (1968), Blazevic et al. (1970), Sutter & Carter (1972) og Fung & Miller (1972).

## 2. Biokemisk baggrund

### Dannelse af indol

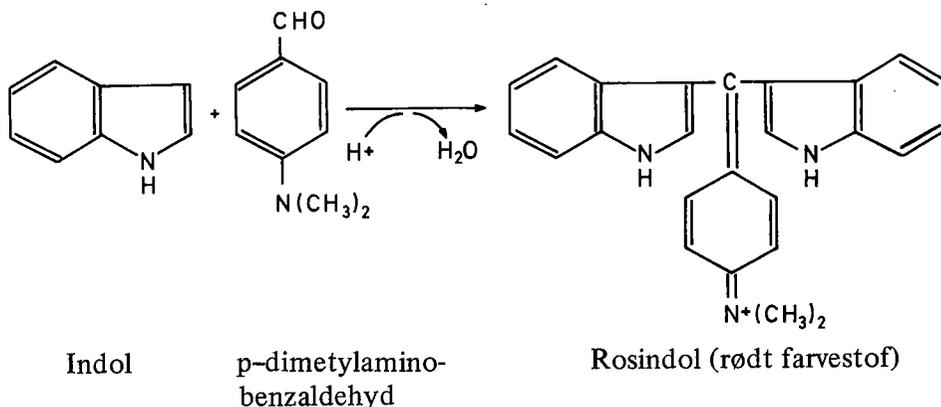
En af de måder, hvorpå aminosyren tryptofan kan omdannes af bakterier, er en spaltning ved hjælp af enzymet tryptofanase, hvorved der dannes frit indol, pyrodruesyre og ammoniak. Pyrodruesyren virker som repressor for tryptofanase.



Processen kræver tilstedeværelse af ilt, men muligvis bruges ilten kun ved den samtidige trinvis oxidation af sidekæden (Gale 1947; Wilson & Miles 1955). Dannelse af tryptofanase kræver induktion med tryptofan (Newton & Snell 1965), mens glukose i substratet medfører repression af enzymdannelsen, i hvert fald i mængder over 0,25%. Enzymets pH optimum er 7,4-7,8, og samtidig glukoseomsætning førende til syredannelse vil derfor hæmme enzymaktiviteten (Logie 1920; Suassuna et al. 1962a, b). Pyridoxalfosfat (vitamin B<sub>6</sub>) er prostetisk gruppe i co-enzymet, og i mutanter, som ikke kan syntetisere vitamin B<sub>6</sub>, er enzymet ude af stand til at fungere.

#### Påvisning af indol

Indolmolekylet danner ved kondensation med reagenset paradimetylamino-benzaldehyd en farveløs forbindelse, som ved opvarmning eller syretilsætning omdannes til et rødt kinonagtigt stof.



#### Videre omdannelse af indol

Indol kan nedbrydes videre af nogle bakterier, bl.a. *Clostridium tetani* (Reed 1942), og det kan under særlige omstændigheder resyntetiseres til tryptofan (Logie 1920; Newton & Snell 1965). Følgen er, at undertiden vil indol kun være til stede i kulturen over en vis periode, hvad der får betydning for valg af det rette tidspunkt til prøvens udførelse.

### 3. Valg af metode

Diagnoseafdelingen har i mange år brugt Ehrlich's indolprøve som standard-metode; i de senere år er denne prøve i særlige tilfælde suppleret med den af King anvendte xylenekstraktionsmetode, og i fæceslaboratoriet anvendes

til undersøgelse af pladekulturer et stykke reagensvædet filterpapir anbragt i låget under inkubationen.

Der er grund til at overveje, om man som standardmetode ikke burde foretrække enten en ekstraktionsmetode, fx. med xylen, eller en metode til direkte enzympåvisning, fx. den af Bülow udarbejdede, for at arbejde med en metode, som på samme tid er mere specifik og mere følsom end den nu anvendte. I det følgende beskrives 4 metoder:

- a) Ehrlich's indolreaktion med direkte tilsætning af reagens
- b) Ehrlich's indolreaktion med ekstraktion før reagenstilsætning
- c) Ehrlich's indolreaktion under fordampning fra pladekultur
- d) Direkte enzymtest for tryptofanase

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

##### a) Ehrlich's indolprøve med direkte tilsætning af reagens

*Substrat:* Den såkaldte indolbouillon består af 0,26% trypsinbehandlet kasein (NZ-amin) i demineraliseret vand, pH 7,7. Man vælger kasein på grund af dets relativt store tryptofanindhold, så ekstra tilsætning af tryptofan bliver unødvendig. Substratet aftappes i 5 cm høje lag i smalle glas (155 x 10/11 mm).

##### *Reagens (Ehrlich-Böhme)*

Paradimetylamino-benzaldehyd	10 g
Ætylalkohol 96-100%	950 ml
Saltsyre, konc., ren	200 ml

Reagenset, der er svagt gulligt, opbevares i brune pipetteflasker ved stuetemperatur og er her holdbart i månedsvi. Hvis reagenset er blevet brunligt, er det uanvendeligt.

*Udførelse:* Indolbouillonon inokuleres med stort inokulum og inkuberes rutinemæssigt ved 35°C, men ved lavere temperatur, hvis man ved, at bakterien har et lavere temperatur-optimum. Reaktionen udføres, når kulturen er udvokset; det vil hyppigst være efter 24 timer, men efter 48 timer eller endnu senere, hvis kulturen vokser langsomt. Hurtigt voksende kulturer bør ikke undersøges senere end efter 24 timer af hensyn til risikoen for sekundær nedbrydning af indolet eller resyntese til tryptofan. Reagenset tilsættes ved at lade 0,5-1,0 ml

fra pipetten løbe langsomt ned ad den indvendige side af glasset, som holdes næsten vandret. Glasset rejses derefter forsigtigt til lodret stilling, idet det gælder om, at reagenset kommer til at ligge som en skive oven over substratet, da man ikke kan se svage reaktioner, hvis reagenset blander sig med substratet.

*Aflæsning:* En positiv reaktion består i en rødviolet skive på grænsen mellem reagenslaget og kulturen. Selv den svageste røde farve regnes som positiv. Svage reaktioner ses tydeligere, hvis der holdes hvidt papir bag glasset. Stærke reaktioner optræder momentant, svagere reaktioner i løbet af få minutter. Reaktionen holder sig længe, men efter nogen tids henstand kan der i negative glas på grænselaget opstå en svagt brunfarvet skive, som kan give anledning til tvivl; derfor bør glassene så vidt muligt aflæses efter få minutters forløb.

*Fortolkning:* Traditionelt fortolker man fremkomsten af en rød farve som en positiv indolreaktion. I meget sjældne tilfælde er dette ikke rigtigt: en svagt rødpigmenteret *Serratia* kan give en indollignende reaktion, idet alkoholen i reagenset koncentrerer pigmentet, så det fra at have været næsten usynligt fremtræder som en tydelig rød skive. Pyocyanindannende stammer af *Pseudomonas aeruginosa* kan give falsk positiv reaktion, idet pyocyaninet ved den stærkt sure reaktion, som skyldes reagenset, bliver rødt.

I vore nuværende diagnoseskemaer betyder indol-positiv ikke blot en reaktion med det rene indol, men også med indolderivater og andre forbindelser, som reagerer ved Ehrlich's direkte test.

#### *b) Ehrlich's indolprøve med ekstraktion før reagenstilsætning*

*Substrat og reagens* som under a).

*Udførelse:* Inokulation og inkubation som under a). Før reagenstilsætningen tilsættes ca. 1,0 ml xylene, og kulturen rystes kraftigt, hvorefter den henstilles på bordet, til xylenen har samlet sig som et lag øverst i kulturen. Derefter tilsættes reagenset på samme måde som under a).

*Aflæsning* som under a).

*Fortolkning:* Ved fremkomst af en positiv reaktion kan man drage den slutning, at bakterierne danner enzymet tryptofanase. Det skyldes, at man med xylene kun ekstraherer indol, som derfor er det eneste stof, der får mulighed for at reagere.

#### *c) Ehrlich's indolreaktion under fordampning fra pladekultur*

Reaktionen kan anvendes, når man ønsker svar på indolreaktionen samtidig med, at den første subkultur er udvokset. Man bør i sådanne tilfælde tilsætte ekstra tryptofan til pladen. Man anbringer i låget af den tilsæede plade en strimmel filterpapir vædet med Ehrlich-Böhme's reagens, så den klæber til låget. Efterhånden som kulturen vokser frem, vil eventuelt dannet indol i et

vist omfang fordampe, og indoldampene vil reagere med reagenset på filterpapiret, som bliver rødt. Når pladen åbnes, kan man ved positiv reaktion også lugte indolet. Der er erfaring for, at kun bestemte slags filterpapir er egnede, men ethvert stykke kan gøres egnet efter kort neddykning i syre og påfølgende tørring, før reagenset dryppes på. Også ved denne udførelse er man sikker på, at en positiv reaktion skyldes tryptofanase, da de øvrige stoffer, som kan give den røde farve med reagenset, ikke – eller ikke så let – fordamper ved inkubationstemperaturen. Følsomheden er ifølge Gaarslev omtrent som ved ekstraktionsmetoderne.

#### *d) Direkte enzymtest for tryptofanase*

##### *Substrat*

L-tryptofan (1% i dest. vand)	50 ml
1/15 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$	85 ml
1/15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	915 ml

Blandingen af fosfater svarer til Sørensens fosfatbuffer med pH 7,8.

Aftappet i en mængde på 1 ml i Widalglas (70 x 10/11 mm).

##### *Reagenser*

Ehrlich-Böhme's indolreagens

Toluen

*Udførelse:* Kulturen høstes fra en renkultur på agarplade tilsat tryptofan og opslemmes tæt i et Widalglas med L-tryptofan-substratet. Derefter tilsættes straks 3 dråber toluen og 5 dråber indolreagens.

*Aflæsning:* Glasset observeres for fremkomst af en rød farve, som angiver positiv reaktion, dvs. tilstedeværelse af indol. Hvis den røde farve ikke fremkommer straks, betragtes prøven som negativ.

## **5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Ehrlich-Böhme's reagens er på grund af sit saltsyreindhold stærkt ætsende. Xylen, der anvendes til ekstraktion, er under mistanke som cancer-fremkaldende stof. Man kan i stedet anvende toluen. Både xylen og toluen er brandfarlige og må ikke komme i nærheden af åben ild.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste indol-positive bakterier

Fortegnelsen er baseret på Bergey's Manual, 8. udg.

*Escherichia*

*Edwardsiella*

*Citrobacter koseri* (*diversus*)

*Proteus*, alle species undtagen *P. mirabilis*

*Yersinia enterocolitica*, nogle stammer

*Shigella*, flere serotyper

*Klebsiella*, biotypen *oxytoca* og enkelte andre stammer

*Salmonella*, ganske få stammer

*Erwinia herbicola*, nogle stammer

*Vibrio*, 3 species inklusive *V. cholerae*

*Aeromonas*

*Lucibacterium*

*Flavobacterium meningosepticum*

*Haemophilus*, nogle stammer af flere species

*Pasteurella multocida* og *P. pneumotropica*

*Cardiobacterium hominis*

*Bacteroides*, flere species

*Fusobacterium*, flere species

*Peptococcus*, flere species

*Bacillus*, enkelte sjældne species

*Clostridium*, mange species

## 7. Prøvens diagnostiske værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven er pålidelig, da den er let at aflæse og har stor følsomhed. Den direkte Ehrlich-prøve giver ifølge litteraturen falsk positive reaktioner, men hvor hyppigt ved vi ikke. Man må gøre sig klart – især hvis man bruger andre metoder – at i de fleste af vore diagnoseskemaer er disse falske positive medtaget som sandt positive. Prøvens differentieringsevne er god i familien *Enterobacteriaceae* og i flere genera som *Flavobacterium*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptococcus* og *Clostridium*. I mange andre taxa har den ingen diagnostisk betydning; det gælder fx. alle genera af strikt aerobe bakterier, alle gramnegative kokker, grampositive kokker som *Micrococcus*, *Staphylococcus* og *Streptococcus*, og endvidere *Lactobacillus* og coryneforme bakterier fordi reaktionen – muligvis med ganske enkelte undtagelser – altid er negativ i disse taxa.

Blandt de gramnegative, fakultative stave forekommer en positiv indolreaktion og en positiv Voges-Proskauer reaktion relativt sjældent samtidig. Samtidig forekomst kan derfor blive en genvej til en diagnose. Samtidig forekomst træffes blandt oxidase-negative hos *Klebsiella oxytoca*, enkelte *Yersinia enterocolitica* og nogle *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*), og blandt oxidase-positive hos *Aeromonas hydrophila*, nogle stammer af *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* og *Vibrio anguillarum*.

## 8. Referencer

- Baeyer, A.: Ueber das Indol. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, VIII. Supplementband: 56, 1870.
- Blazevic, D.J., Ederer, G.M. & Matsen, J.M.: Evaluation of a new incubation-type indole strip test. *Appl. Microbiol.* 19: 547, 1970.
- Bujwid, O.: Eine chemische Reaction für die Cholera-bakterien. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 2: 52, 1887.
- Böhme, A.: Die Anwendung der Ehrlichschen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 40: 129, 1905.
- Clarke, P.H. & Cowan, S.T.: Biochemical methods for bacteriology. *J. gen. Microbiol.* 6: 187, 1952.
- Dunham, E.K.: Zur chemischen Reaction der Cholera-bakterien. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 2: 337, 1887.
- Epps, H.M.R. & Gale, E.F.: The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of *Escherichia coli*: Comparison of the effect with that produced by fermentation acids. *Biochem. J.* 36: 619, 1942.
- Fung, D.Y.C. & Miller, R.D.: Miniaturized techniques for imvic tests. *J. Milk Food Technol.* 35: 328, 1972.
- Gadebusch, H.H. & Gabriel, S.: Modified stable Kovacs' reagent for the detection of indole. *Amer. J. clin. Path.* 26: 1373, 1956.
- Gale, E.F.: *The Chemical Activities of Bacteria*. Univ. Tutorial Press Ltd., London 1947, p. 117.
- Gnezda, J.: Sur des réactions nouvelles des bases indoliques et des corps albuminoïdes. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 128: 1584, 1899.
- Goré, S.N.: The cotton wool plug test for indole. A new technique of applying Ehrlich's reaction for detecting indole in bacterial cultures. *Indian J. med. Res.* 8: 505, 1921.
- Holman, W.L. & Gonzales, F.L.: A test for indole based on the oxalic acid reaction of Gnezda. *J. Bact.* 8: 577, 1923.
- Isenberg, H.D. & Sundheim, L.H.: Indole reactions in bacteria. *J. Bact.* 75: 682, 1958.
- King, E.O.: Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. *Amer. J. clin. Path.* 31: 241, 1959.
- Kitasato, S.: Die negative Indol-Reaction der Typhusbacillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bacillenarten. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 7: 515, 1889.
- Kovacs, N.: Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. *Z. Immunforsch.* 55: 311, 1928.

- Kovacs, N.: Weitere Untersuchungen über den Indolnachweis in Bakterienkulturen. Die Indolbildung auf festen Nährböden. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 123: 391, 1931.
- Kristensen, M.: Investigations into the occurrence and classification of the haemoglobino-philic bacteria. Disputats, Levin & Munksgaard 1922, p. 164.
- Logie, W.J.: On the synthesis of tryptophane by certain bacteria and on the nature of indole formation. J. Path. Bact. 23: 224, 1920.
- Malone, R.H. & Goré, S.N.: The detection of indole in bacterial cultures. A criticism of various methods of applying the nitroso-indole and rosindole reactions, based on a comparative study of their delicacy and specificity. Indian J. med. Res. 8: 490, 1921.
- Newton, W.A. & Snell, E.E.: Formation and interrelationships of tryptophanase and tryptophan synthetases in *Escherichia coli*. J. Bact. 89: 355, 1965.
- Poehl, A.: Ueber einige biologisch-chemische Eigenschaften der Mikroorganismen im Allgemeinen und über die Bildung der Ptomaine durch die Cholera bacillen im Speciellen. Ber. dtsh. chem. Ges. 19: 1159, 1886.
- Reed, R.W.: Nitrate, nitrite and indole reactions of gas gangrene anaerobes. J. Bact. 44: 425, 1942.
- Salkowski, E.: Ueber das "Choleroth" und das Zustandekommen der Cholera reaction. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie 110: 366, 1887.
- Schuchardt, K.: Bemerkung über das "Choleroth". Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie 110: 373, 1887.
- Suassuna, I., Lacombe, S.C., Barreto, M.A. & Suassuna, I.R.: The indole reactions of Enterobacteriaceae. I. A comparison of reagents for qualitative tests. An. Microbiol. (Rio de J.) 10: 99, 1962.
- Suassuna, I. & Suassuna, I.R.: The indole reactions of Enterobacteriaceae. II. Cultural conditions affecting indole production. An. Microbiol. (Rio de J.) 10: 123, 1962.
- Sutter, V.L. & Carter, W.T.: Evaluation of media and reagents for indole-spot tests in anaerobic bacteriology. Amer. J. clin. Path. 58: 335, 1972.
- Weaver, D.K., Lee, E.K.H. & Leahy, M.S.: Comparison of reagent-impregnated paper strips and conventional methods for identification of Enterobacteriaceae. Amer. J. clin. Path. 49: 494, 1968.
- Wilson, G.S. & Miles, A.A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Edward Arnold & Co., London 1955, 4. ed. vol. 1, p. 64.

## Kapitel 34

### Svovlbrinteprøver

Prøver som påviser bakteriers evne til at danne svovlbrinte ( $H_2S$ ) af svovlholdige organiske og/eller uorganiske forbindelser.

#### 1. Historisk indledning

Svovlbrintes karakteristiske lugt har fra gammel tid være forbundet med forestillingen om forrådnelse især i æg. Pasteurs elev Gayon undersøgte mikroorganismers betydning for processerne i rådne æg, og til påvisning af svovlbrinte anvendte han filterpapir vædet med blyacetat, som bliver sort, hvis luftarten er til stede (Gayon 1875). Carl Julius Salomonsen anvendte samme teknik i sin disputats: "Studier over Blodets Forraadnelse" fra 1877. Da hønseæg på et lidt senere tidspunkt blev anvendt til dyrkning af bakterier, fandt Hueppe (1888), at koleravibrioner dannede  $H_2S$ , og Schrank (1888) fandt *Proteus* i rådne æg og viste, at de dannede  $H_2S$ . En anden teknik til påvisning af  $H_2S$  blev angivet af Fromme (1892). Den var også baseret på princippet, at  $H_2S$  med metalsalte danner mørkfarvede uopløselige metalsulfider, men han brugte jerntartrat eller jernsakkarat sat til gelatineplader, hvorved han opnåede at  $H_2S$ -dannende bakterier voksede med sorte kolonier, og han kunne bl.a. vise, at tyfusbakterier er kraftige  $H_2S$ -dannere.

Der var i disse år megen diskussion om betydningen af de forskellige mediers indhold af svovlholdige bestanddele og om hvordan svovlbrintefrigørelsen foregik (se fx. Holschewnikoff 1889), men Rubner (1893a, b) bragte en vis afklaring, idet han bl.a. viste, at det var svovl fra de organiske forbindelser i medierne, som omdannes til  $H_2S$ , og at processen var specifik og ikke udelukkende betinget af de almindelige reduktionsprocesser, der altid foregår i en voksende kultur. Lidt senere viste Beijerinck (1901) imidlertid, at nogle af de medicinske vigtige bakterier også kan danne  $H_2S$  af uorganiske svovlforbindelser som thiosulfat og sulfid som eneste svovlkilde. Påvisning af den særlige gruppe bakterier, som i naturen fremkalder sulfatreduktion og store svovlaflejringer, skyldes også Beijerinck, men det er strikt anaerobe, autotrofe bakterier, som falder uden for den medicinske bakteriologi.

De første arbejder, hvor et større antal forskellige bakterier blev karakteriseret efter deres evne til  $H_2S$ -dannelse, skyldes Petri & Maassen (1892, 1893a, b), Stagnitta-Balistreri (1893) og Morris (1897). De to sidstnævnte arbejdede hos Rubner, og Morris indførte den teknik, som derefter anvendtes af de fleste til ind i 1930'erne, dvs. tilsætning af blyacetat direkte til mediet. Eksempler på medier af denne slags er angivet af Kligler (1917) og Jordan & Victorson (1917), som særligt fremhævede  $H_2S$ -reaktionens betydning i *Salmonella*-diagnostik. I litteraturen nævnes det ofte, at Orłowski i St. Petersburg (1897) var den første som brugte blyacetat i medierne, og at han som den første fremhævede forskellen mellem  $H_2S$ -negative *E. coli* og  $H_2S$ -positive *Salmonella*. Ingen af disse påstande er efter vore undersøgelser rigtige. Det uheldige i at sætte giftige metalsalte til vækstmedierne, som også tidligere undersøgere tildels havde erkendt, blev særligt fremhævet af ZoBell & Feltham (1934), og derefter gik man gradvis over til at anvende jernsalte, som er mindre giftige end bly- og vismutsaltene.

Foruden Fromme (1892) var dog enkelte andre tidligere slået ind på denne vej. Nikolaus Kovács fra Wien angav i 1925 en teknik baseret på tilsætning af ferrosulfat. Hans metode var specielt udarbejdet med henblik på undersøgelse af anaerobe bakterier, og til dyrkningen anvendte han 20% kalvebouillon-gelatine i høje lag i smalle glas, da det viste sig, at dette sejtflydende medium — han dyrkede ved  $37^{\circ}C$  — gav tilstrækkelig anaerobe forhold. Tilsat 0,05% ferrosulfat markerede mediet  $H_2S$ -dannelse ved en kraftig sort farve, og han opnåede derved i samme kultur at kunne påvise gelatinesmeltning og  $H_2S$ -dannelse. Denne teknik i modificeret form optog Martin Kristensen kort efter i diagnoseafdelingen. Han anvendte 10% gelatine, brugte ferriklorid (0,25%) i stedet for ferrosulfat og gik over til at bruge mediet ved  $22^{\circ}C$  af hensyn til gelatinesmeltningen og anvendte metoden til alle slags bakterier og ikke specielt til anaerobe. Selv beskrev Martin Kristensen et al. først denne modifikation ganske kort i 1935, men Moltke, der skrev disputats om *Proteus vulgaris* i diagnoseafdelingen, anvendte metoden med udmærket resultat og angiver i disputatsen (1927), at Martin Kristensen allerede da brugte den i stor udstrækning ved *Salmonella*-diagnostik.

I de forskellige medier anvendt til  $H_2S$ -påvisning siden århundredskiftet var det de svovlholdige aminosyrer i det tilsatte pepton, der var basis for den dannede  $H_2S$ . Tilley (1923) viste, at forskellige peptoner gav varierende resultater og anbefalede derfor at tilsætte thiosulfat for at opnå konstante resultater. Samtidig foreslog Wilson (1923) tilsætning af sulfit. Den første anbefaling har navnlig været fulgt i USA, hvor det meget anvendte medium triple-sugar iron (TSI) og et moderniseret Kligler's medium (som indeholder jernsalt i stedet for det oprindelige blyacetat) begge indeholder thiosulfat. Pollock &

Knox (1943) viste, at man også kunne anvende tetrathionat, hvilket bl.a. Pichinoty & Bigliardi-Rouvier (1963) har udnyttet. I forbindelse med indførelse af direkte enzymtest forsøgte Clarke (1953) og Olitzki (1954) at anvende de svovlholdige aminosyrer cystin og cystein direkte som substrat. Det viste sig, at under disse betingelser dannede så mange forskellige bakterier H<sub>2</sub>S, at prøvens differentierende værdi praktisk talt gik tabt. Morse & Weaver (1950) anvendte en særlig slags pepton i en direkte enzymtest og fandt også, at for mange stammer var positive, men ved en semikvantitering på grundlag af aflæsningstidspunkt kunne man opnå resultater, som var i overensstemmelse med de gængse prøver. Senest har Padron & Dockstader (1972) anbefalet et medium, der som svovlkilde foruden pepton indeholder sulfit, specielt beregnet til påvisning af *Salmonella*, da det er selektivt og kun giver positive reaktioner med *Salmonella*, *Arizona* og *Edwardsiella*.

Sideløbende med udformning af H<sub>2</sub>S-prøver baseret på anvendelse af forskellige organiske og uorganiske svovlforbindelser har der været udført undersøgelser, som forsøgte at klarlægge de enzymatiske processer, der fandt sted ved brug af den ene eller den anden svovlkilde. Som det vil fremgå af næste afsnit, er der ikke opnået definitive resultater, og man er derfor endnu ikke nået til, at man ved brug af en bestemt H<sub>2</sub>S-prøve med sikkerhed kan angive, hvilke enzymer der er ansvarlige for den positive prøve. Da der sikkert er forskelle, som også ville kunne udnyttes i praktisk diagnostik, er der her et område, hvor yderligere undersøgelser – både biokemiske og bakteriologiske – er meget ønskelige.

## 2. Biokemisk baggrund

Da der ved dannelsen af H<sub>2</sub>S ofte bliver talt om reduktionsprocesser, er det praktisk at have rede på svovlforbindelsernes iltningsstrin. De er anført i følgende skema, hvor svovlforbindelserne er skrevet i jonform:

### *Svovlets iltningsstrin*

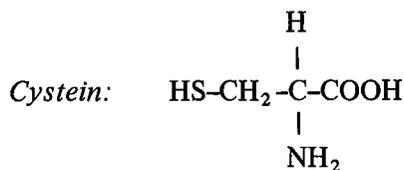
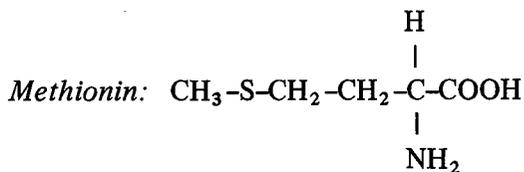
+6	sulfat: SO <sub>4</sub> <sup>--</sup>	
+4	sulfit: SO <sub>3</sub> <sup>--</sup>	
+2,5	tetrathionat: S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>--</sup>	
+2	thiosulfat: S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>--</sup>	
0	svovl: S <sub>8</sub>	
-2	sulfid: S <sup>--</sup>	$\left\{ \begin{array}{l} \text{H}_2\text{S: svovlbrinte} \\ \text{FeS: jernsulfid} \\ \text{PbS: blyulfid} \end{array} \right.$

*Påvisning af svovlbrinte*

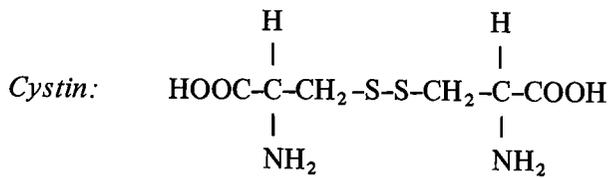
Når der i en kultur dannes sulfid, vil stoffet delvis afgives i luftform som svovlbrinte ( $H_2S$ ), let erkendeligt ved sin lugt, delvis vil det i jonform reagere med andre forhåndenværende joner. Er det fx. metaljoner som  $Pb^{++}$  eller  $Fe^{++}$ , vil der dannes tungtopløselige, mørkfarvede metalsulfider ( $PbS$  eller  $FeS$ ). Dissocieringsgraden af  $H_2S$  er pH-afhængig, og da sur reaktion nedsætter dissocieringen, hvorved der bliver færre sulfidjoner til at reagere med metaljonerne søger man at undgå, at kulturen bliver for sur ved helt at undlade tilsætning af forgærbare kulhydrater eller ved at holde mængden så lav som muligt. Frigjort svovlbrinte vil ved opsugning i fugtigt filtrerpapir atter dissocieres, og de frigjorte sulfidjoner kan så reagere med metaljoner fra den opløsning af metalsalt papiret er fugtet med, og der vil derefter i papiret udfældes brune eller sorte metalsulfider. Ved at anbringe en papirstrimmel fugtet med en metalsaltopløsning oven over substratet i et kulturglas undgår man naturligvis helt, at bakterierne udsættes for metalsaltenes toksiske virkning. Derfor er det en fremgangsmåde, der er velegnet ved undersøgelse af "sarte" eller dårligt voksende bakterier som fx. *Brucella*. Det er en fejlkilde ved denne fremgangsmåde, at blyacetatpapir reagerer med mercaptan, som kan dannes i nogle kulturer.

*Dannelse af  $H_2S$  fra organiske svovlforbindelser*

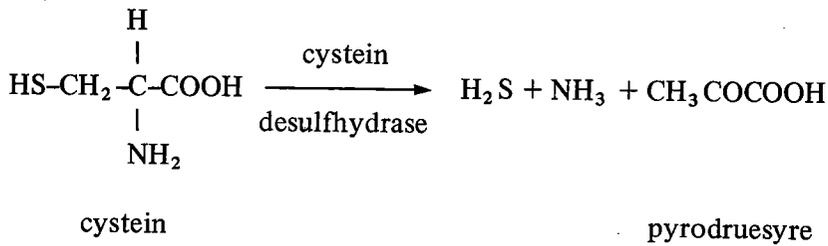
Med organiske svovlforbindelser menes i denne sammenhæng proteiner og mere specielt peptoner, som indeholder de svovlholdige aminosyrer methionin og cystein med følgende formler:



Desuden forekommer cystin, som dannes af 2 molekyler cystein:

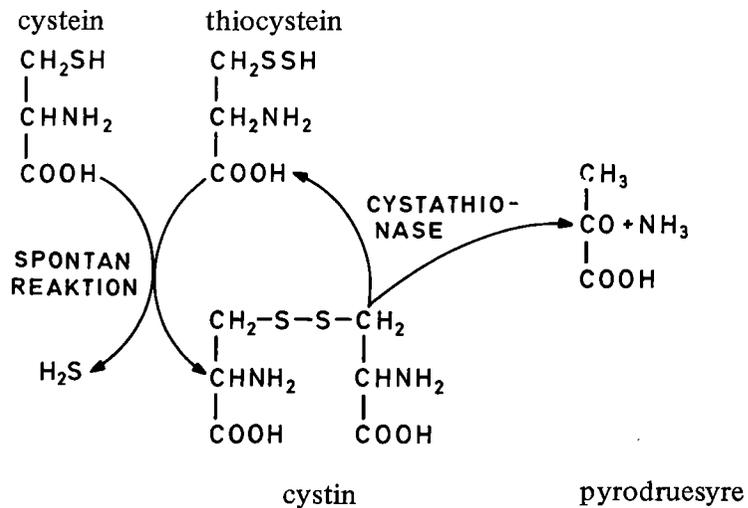


Efter den tidligste opfattelse (Kallio & Porter 1950) frigøres H<sub>2</sub>S fra cystein ved hjælp af enzymet cysteindesulphydrase efter følgende formel:



Cystin kan omdannes på samme måde efter at det er reduceret til cystein.

Efter en senere opfattelse (Flavin 1962; Cavallini et al. 1963) er det muligt, at H<sub>2</sub>S-dannelsen sker ved en cyklisk proces ved hjælp af enzymet cystathionase og med thiocystein som mellemprodukt. Reaktionen er vist i følgende skema.



Cystathionase er påvist i bakterier, men efter de foreliggende undersøgelser kan man ikke afgøre, hvilken rolle enzymet faktisk spiller, eller om der samtidig er andre muligheder.

Gaarslev (Lautrop et al. 1971) antager, at selv om en vis ringe mængde  $H_2S$  dannes direkte ved reduktion af cystein på en eller anden måde, vil en mere massiv  $H_2S$ -dannelse altid skyldes, at der først sker en oxidation af  $H_2S$  til uorganiske, oxiderede svovlforbindelser som fx. thiosulfat eller tetrathionat, og derefter vil der hos de bakterier, som har de nødvendige reductaser, ske en sekundær reduktion af de uorganiske svovlforbindelser til  $H_2S$ . Denne opfattelse stemmer med, at de fleste bakterier kan danne små mængder  $H_2S$  i direkte enzymtest med cystein (Clarke 1953; Olitzki 1954) og med påvisning af, at det er forskellige enzymer som er involveret i  $H_2S$ -dannelse fra organiske svovlforbindelser og fra fx. thiosulfat (Tarr 1933, 1934), og med den kendsgerning at  $H_2S$  under visse betingelser nemt oxideres til thiosulfat (Kaji & McElroy 1959). Efter denne hypotese har altså alle bakterier, som er  $H_2S$ -positive i et ferrikloridgelatinestik, reductase-enzymet som kan danne  $H_2S$  af oxiderede, uorganiske svovlforbindelser, og det er specielt tilstedeværelsen af disse enzymer, som gør dem " $H_2S$ -positive" og ikke det ukendte enzym, som direkte kan danne  $H_2S$  af cystein, selv om det indgår i den samlede proces.

#### *Dannelse af $H_2S$ fra uorganiske svovlforbindelser, dvs. thiosulfat, tetrathionat og sulfit*

$H_2S$ -dannelse fra sulfat er ikke medtaget her, da det som tidligere nævnt er en egenskab, der kun forekommer i en meget specialiseret bakteriegruppe (*Desulfovibrio*), der udfører en såkaldt dissimilatorisk sulfatreduktion, dvs. en energigivende anaerob respiration med sulfat som elektronacceptor. Foruden den dissimilatoriske sulfatreduktion forekommer en assimilatorisk sulfatreduktion, hvorved flertallet af alle bakterier skaffer sig det svovl, som er nødvendigt for cellernes opbygning (Cowie et al. 1950, 1951; Bolton et al. 1953). Enzymatisk er de to reduktionsprocesser forskellige, idet svovlet ved den dissimilatoriske proces ender som frie sulfidjoner, der sekundært omdannes til svovlbrinte og svovl og ved den assimilatoriske proces ender som organisk bundne SH-grupper i aminosyrer.

De processer, der finder sted i en svovlbrinteprøve, når man anvender oxiderede svovlforbindelser (tetrathionat, thiosulfat, sulfit) som udgangsmateriale, består også i en reduktion af svovl fra et højere til et lavere iltningsstrin, men enzymerne er næppe de samme som dem der indgår i en assimilatorisk sulfatreduktion. Forholdene i en  $H_2S$ -prøve er ufysiologiske, fordi svovlkilden er til stede i forholdsvis stor mængde, og en anden vanskelighed ved analysen af de enzymatiske processer er de forskellige svovlforbindelsers store tilbøjelighed til indbyrdes spontan omdannelse.

Processen ved anvendelse af tetrathionat som udgangsmateriale er omtalt af Pollock & Knox (1943) og Pichinoty & Bigliardi-Rouvier (1963). Resultater af en tetrathionatprøve er omtalt af Le Minor (1967) og Le Minor et al. (1970). De to enzymer, der fungerer, er en "tetrathionatreduktase", som omdanner tetrathionat til thiosulfat, og en "thiosulfatreduktase", som omdanner thiosulfat til sulfid. Disse to enzymer induceres kun og fungerer kun i iltfrit miljø. Da processerne medfører frigørelse af frie brintjoner og derfor en forskydning af pH til sur side, kan enzymaktiviteten påvises med en syrebaseindikator (Le Minor 1970).

Processerne ved anvendelse af thiosulfat som udgangsmateriale i en svovlbrintep prøve er omtalt af Artman (1956), Kaji & McElroy (1959) og Pichinoty (1962).

Anvendelse af sulfit som udgangsmateriale er først omtalt af Wilson (1923); senere har Wilson & Blair (1924), Skovgaard (1958, 1964) og Padron & Dockstader (1972) brugt H<sub>2</sub>S-medier suppleret med sulfit. Den biokemiske baggrund for omdannelse af sulfit til sulfid i disse prøver er ikke kendt. Man kender fra den assimilatoriske sulfatreduktion en særlig "sulfitreduktase", et af de mest komplicerede byggede enzymer, som bl.a. er påvist i *E. coli* (Mager 1960; Kemp et al. 1963), men dets funktion er øjensynlig kun at skaffe sulfidjoner til cysteinsyntesen (White et al. 1973).

### 3. Valg af metode

Erfaringen viser, at direkte enzymtests med cystein eller cystin som substrat er så følsomme, at næsten alle bakterier giver en positiv reaktion, og de er derfor uden praktisk værdi til differentiering. Anderledes er det med de metoder, hvor sulfit, thiosulfat eller tetrathionat er substrat; de giver en god differentiering, ligesom den oprindelige vækstmetode, hvor pepton samtidig er næringssubstrat og svovlkilde. Forklaringen herpå er sandsynligvis – som tidligere omtalt – at man i begge tilfælde kun får positive reaktioner med de bakterier, som har enzymer der kan reducere oxiderede, uorganiske svovlforbindelser. Der er øjensynlig forskel på de resultater, man opnår ved anvendelse af de forskellige uorganiske svovlforbindelser, og det antyder, at man med fordel ville kunne anvende metoder, der skelner mellem bakterier, som har sulfit-, thiosulfat- og tetrathionatreduktaser, men foreløbig mangler man de nødvendige sammenlignende undersøgelser. Indtil videre mener vi, at man bør anvende den klassiske prøve med pepton som eneste svovlkilde. Måske burde man dog sætte thiosulfat til mediet for at undgå variationer som følge af vekslende peptonkvalitet.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

a) Stik i ferroklorid-pepton-gelatine medium (Kristensen et al. 1935) modificeret efter Kovács (1925)

##### Substrat

Pepton (Bacto)	2,5%
Kødekstrakt (Difco)	0,75%
NaCl	0,5%
Gelatine	12,0%
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05%
pH indstillet til 7,3–7,4.	

Aftappet i 6 cm høj søjle i smalle (155 x 10/11 mm) reagensglas lukket med paraffineret korkprop.

*Udførelse:* Fra en renkultur på et af standardmedierne tages et rigeligt inoculum på en lige platinnål, som føres helt til bunds midt igennem substratsøjlen i glasset. Efter tilsåningen skal glasset omhyggeligt lukkes med den paraffinerede korkprop, dels for at undgå fordampning af H<sub>2</sub>S, dels for at forhindre at fri ilttilgang medfører re-oxidation af svovlbrinte eller det dannede jernsulfid. Inkubering sker ved 22°C, som ikke er optimalt for H<sub>2</sub>S-dannelsen (her ville ca. 30–34°C være bedst), men nødvendigt af hensyn til gelatinens varmesmeltning.

*Aflæsningen* foretages dagligt i indtil 4 dage. En positiv reaktion viser sig som en sortfarvning af substratet langs stikkanalen; som regel mest intens i bunden af glasset og ofte manglende svarende til de øverste mm af substratsøjlen. Sortfarvningens intensitet varierer fra helt kulsort til en svag grå farve, som ses tydeligst, hvis man holder glasset op mod et stykke hvidt papir.

*Fortolkning:* Som et positivt prøveudfald registreres både kulsorte og grå farver langs stikkanalen. De kulsorte kan registreres som stærkt positive (+++); dem ser man med *Proteus vulgaris* og *P. mirabilis*, *Salmonella* og *Citrobacter freundii*; dog skal man huske at *S. typhi* giver en svagere positiv reaktion end de andre *Salmonella*. De grå kan registreres som svagt positive (+); det vil ofte vise sig at være *Proteus morgani*, *Hafnia alvei* eller *Citrobacter koseri*. Men i mange substratportioner optræder de svagt positive (grå) som helt negative.

En mere eller mindre udtalt brunfarvning i substratsøjlenes øverste 4–5 mm er ikke ualmindelig; denne ændring skyldes ikke svovlbrintedannelse og registreres som negativt udfald.

Hvis der er tale om en stærkt gelatinesmeltende bakterie som fx. *Proteus* eller *Aeromonas*, kan en samtidig positiv H<sub>2</sub>S-reaktion være vanskeligere at konstatere, fordi det dannede ferrosulfid ikke vil være koncentreret omkring stikkanalen, men vil være jævnt fordelt i hele den smeltede substratsøjle, som antager en diffus grålig farve. Ved sammenligning med et tilsæt H<sub>2</sub>S-negativt glas, som man smelter under varmtvandshanen, kan man lettere afgøre, om farven er ændret.

Forskellige portioner af H<sub>2</sub>S-mediet kan vise variationer i graden af sværtning. Normalt afprøves en ny substratportion, før den sendes i laboratorierne, men konstaterer man, at en forventet stærkt positiv reaktion er svagere end sædvanligt, er der grund til at kontakte substratafdelingen.

*b) Halvflydende blyacetatmedium med ascites til anaerobe bakterier*

*Substrat*

Ascites	30%
Blyacetat	0,1%
Agar	0,28%
Filtreret bouillon	

Aftappet i ca. 8 cm høje søjler (10 ml) i alm. reagensglas (155 x 14/15mm) tilproppet med paraffineret vatprop.

*Udførelse:* Tilsås fra standardmedier med rigeligt inoculum ved stik til bunden af glasset. Inkuberes ved 35°C under aerobe eller anaerobe forhold.

*Aflæsning:* Aflæses dagligt indtil 7 dage. Ethvert tegn på grå eller sort farve i mediet tages som udtryk for en positiv reaktion.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ud over de sædvanlige sikkerhedsforanstaltninger ved omgang med patogene bakterier kræves intet særligt. Dog er det værd at huske at indånding af større mængder H<sub>2</sub>S er farligt.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Af det foregående kan man se, at spørgsmålet om hvorvidt en bakterie karakteriseres som H<sub>2</sub>S-positiv eller H<sub>2</sub>S-negativ for en stor del er et spørgsmål om, hvilken metode der er anvendt. Da karakteristikkene i Bergey's Manual ofte intet oplyser om de anvendte metoder, vil en fuldstændig kompilation

af resultaterne angående evne til H<sub>2</sub>S-produktion være af begrænset værdi. Vi har valgt stort set kun at anføre de resultater fra Bergey's Manual, som er i overensstemmelse med egne erfaringer baseret på de to her beskrevne metoder, som i mange år har været anvendt i diagnoseafdelingen.

*Pseudomonas putrefaciens* (som egentlig ikke er en *Pseudomonas* og nylig er overført til slægten *Alteromonas*) er stærkt positiv.

*Xanthomonas*: flere species.

*Brucella*: med vore metoder negativ, men med mere følsomme metoder er nogle biotyper positive, andre negative, og dette bruges i biotypeinddelingen.

*Edwardsiella tarda*: alle stammer.

*Citrobacter*: *C. freundii*, alle stammer stærkt positive; *C. koseri*, alle stammer svagt positive.

*Salmonella*: de fleste serotyper stærkt positive dog er *S. paratyphi* A altid negativ. I serotyperne *S. typhi*, *S. paratyphi* B og *S. cholerae suis* forekommer nogle negative stammer; i enkelte sjældnere serotyper er alle stammer negative.

*Proteus*: *P. vulgaris* og *P. mirabilis* stærkt positive; *P. morganii* svagt positiv.

*Aeromonas*: de fleste subspecies.

*Fusobacterium*: de fleste stammer.

*Veillonella*: alle species.

*Peptococcus*: alle species.

*Peptostreptococcus*: 1 species.

*Clostridium*: ca.  $\frac{1}{3}$  af alle species og nogle stammer i andre species.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Reproducerbarheden i en forud kontrolleret portion af diagnoseafdelingens standardmedium må anses for at være god.

Kun i familien *Enterobacteriaceae* og i genus *Clostridium* er fordelingen mellem H<sub>2</sub>S-positive og H<sub>2</sub>S-negative taxa således, at prøven bliver af stor differentialdiagnostisk værdi. Begge disse grupper indeholder også sulfitreduktase-positive stammer.

Ser man bort fra *Edwardsiella*, som vi hidtil ikke er stødt på, og de H<sub>2</sub>S-positive *Proteus*-arter, som er lette at diagnosticere, er blandt tarmbakterierne *Salmonella* (inklusive *Arizona*) og *Citrobacter freundii* de H<sub>2</sub>S-positive, og på denne reaktion kan der i almindelighed lægges stor vægt, selv om nogle enkelte *Salmonella* serotyper og stammer er H<sub>2</sub>S-negative. Indtil for få år siden regnedes *E. coli* for undtagelsesfrit at være H<sub>2</sub>S-negativ, men stammer, der er blevet H<sub>2</sub>S-positive på grund af et overførbart plasmid, træffes nu med

en hyppighed på 1–2 ‰ blandt *E. coli* isolater (Lautrop et al. 1971).

I fæcesdiagnostik udnytter man *Salmonella* typernes evne til H<sub>2</sub>S-dannelse, idet man ved at inkludere thiosulfat og ferricitrat i pladerne opnår, at alle H<sub>2</sub>S-positive bakterier danner kolonier med et sort centrum på grund af udfældet jernsulfid; herved lettes plade aflæsningen overordentlig meget.

## 8. Referencer

- Artman, M.: The production of hydrogen sulphide from thiosulphate by *Escherichia coli*. J. gen. Microbiol. 14: 315, 1956.
- Beijerinck, M.W.: Sur la formation de l'hydrogene sulfuré dans les canaux, et le genre nouveau *Aërobacter*. Arch. exactes et nat. Serie II, Tome IV: 1, 1901.
- Bolton, E.T., Cowie, D.B. & Sands, M.K.: Sulfur metabolism in *Escherichia coli*. III. The metabolic fate of sulfate sulfur. J. Bact. 63: 309, 1952.
- Cavallini, D., Mondovi, B. & Marco, C. de: The identity of cysteine desulfhydrase with cystathionase and mechanism of cysteine-cystine desulfhydration. In: Snell, E.E., Fasella, P.M., Braunstein, A. & Favelli Rossi, A. (eds.): Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis. Pergamon Press, London 1963 (Proceedings fra Symposium 1962 i Rom), p. 361.
- Clarke, P.H.: Hydrogen sulphide production by bacteria. J. gen. Microbiol. 8: 397, 1953.
- Cowie, D.B., Bolton, E.T. & Sands, M.K.: Sulfur metabolism in *Escherichia coli*. I. Sulfate metabolism of normal and mutant cells. J. Bact. 60: 233, 1950.
- Cowie, D.B., Bolton, E.T. & Sands, M.K.: Sulfur metabolism in *Escherichia coli*. II. Competitive utilization of labeled and nonlabeled sulfur compounds. J. Bact. 62: 63, 1951.
- Flavin, M.: Microbial transsulfuration: the mechanism of an enzymatic disulfide elimination reaction. J. biol. Chem. 237: 768, 1962.
- Fromme, A.: Ueber die Beziehung des metallischen Eisens zu den Bakterien und über den Werth des Eisens zur Wasserreinigung. Centralbl. Bakt. 12: 274, 1892.
- Gayon, U.: Recherches sur les altérations spontanées des oeufs. Thesis, Gauthier-Villars, Paris 1875, p. 23.
- Gayon, U.: Sur les altérations des oeufs, à l'occasion d'une Note de MM A. Béchamp et G. Eustache. C.R. Acad. Sci. (Paris) 85: 1074, 1877.
- Holschewnikoff: Ueber die Bildung von Schwefelwasserstoff durch Bacterien. Fortschr. Med. 7: 201, 1889.
- Hueppe, F.: Ueber die Verwendung von Eiern zu Kulturzwecken. Centralbl. Bakt. 4: 80, 1888.
- Jordan, E.O. & Victorson, R.: Differentiation of the paratyphoid-enteritidis group, II. Lead acetate agar. J. infect. Dis. 21: 554, 1917.
- Kaji, A. & McElroy, W.D.: Mechanism of hydrogen sulfide formation from thiosulfate. J. Bact. 77: 630, 1959.
- Kallio, R.E. & Porter, J.R.: The metabolism of cystine and cysteine by *Proteus vulgaris* and *Proteus morgani*. J. Bact. 60: 607, 1950.
- Kemp, J.D., Atkinson, D.E., Ehret, A. & Lazzarini, R.A.: Evidence for the identity of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific sulfite and nitrite reductases of *Escherichia coli*. J. biol. Chem. 238: 3466, 1963.

- Kligler, I.J.: A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. *Amer. J. publ. Hlth* 7: 1042, 1917.
- Kovács, N.: Einige Neuerungen in der Technik der Anaerobenzüchtung. *Wien. med. Wschr.* 75: 1887, 1925.
- Kristensen, M., Bojlén, K. & Kjær, T.: Systematische Untersuchungen über coliähnliche Bakterien. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 134: 318, 1935.
- Lautrop, H., Ørskov, I. & Gaarslev, K.: Hydrogensulphide producing variants of *Escherichia coli*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 79: 641, 1971.
- Mager, J.: A TPNH-linked sulfite reductase and its relation to hydroxylamine reductase in enterobacteriaceae. *Biochim. biophys. acta* 41: 553, 1960.
- Minor, L. le: Distribution de la tétrathionate-réductase chez divers sérotypes de *Salmonella*. *Ann. Inst. Pasteur* 113: 117, 1967.
- Minor, L. le, Chippaux, M., Pichinoty, F., Coynault, C. & Piéchaud, M.: Méthodes simples permettant de rechercher la tétrathionate-réductase en cultures liquides ou sur colonies isolées. *Ann. Inst. Pasteur* 119: 733, 1970.
- Moltke, O.: Contribution to the characterization and systematic classification of *Bac. proteus vulgaris* (Hauser). *Disputats, København* 1927.
- Morris, M.: Studien über die Production von Schwefelwasserstoff, Indol und Merkaptan bei Bacterien. *Arch. Hyg. (Berl.)* 30: 304, 1897.
- Morse, M.L. & Weaver, R.H.: Rapid microtechnics for identification of cultures. III. Hydrogen sulfide production. *Amer. J. clin. Path.* 20: 481, 1950.
- Olitzki, A.L.: Hydrogen sulphide production by non-multiplying organisms and its inhibition by antibiotics. *J. gen. Microbiol.* 11: 160, 1954.
- Orlowski, A.A.: Beitrag zur Kenntnis der biologischen und pathogenen Eigenschaften des *Bacterium coli commune*. *Centralbl. Bakt. I. Abt.* 22: 134, 1897.
- Padron, A.P. & Dockstader, W.B.: Selective medium for hydrogen sulfide production by salmonellae. *Appl. Microbiol.* 23: 1107, 1972.
- Petri, R.J. & Maassen, A.: Ueber die Bildung von Schwefelwasserstoff durch die krankheits-erregenden Bakterien unter besonderer Berücksichtigung des Schweinerotlaufes. *Centralbl. Bakt.* 11: 289, 1892.
- Petri, R.J. & Maassen, A.: Beiträge zur Biologie der krankheits-erregenden Bakterien insbesondere über die Bildung von Schwefelwasserstoff durch dieselben unter vornehmlicher Berücksichtigung des Schweinerotlaufes. *Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.)* 8: 318, 338, 1893a.
- Petri, R.J. & Maassen, A.: Weitere Beiträge zur Schwefelwasserstoffbildung aërober Bakterien und kurze Angaben über Merkaptanbildung derselben. *Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.)* 8: 490, 1893b.
- Pichinoty, F.: Répression par l'oxygène de la biosynthèse de la thiosulfate-réductase de *Proteus vulgaris*. *Experimentia* 18: 501, 1962.
- Pichinoty, F. & Bigliardi-Rouvier, J.: Recherches sur la tétrathionate-réductase d'une bactérie anaérobie facultative. *Biochem. biophys. acta* 67: 366, 1963.
- Pollock, M.R., Knox, R. & Gell, P.G.H.: Bacterial reduction of tetrathionate. *Nature* 150: 94, 1942.
- Pollock, M.R. & Knox, R.: Bacterial reduction of tetrathionate. *Biochem. J.* 37: 476, 1943.
- Rubner, M.: Ueber den Modus der Schwefelwasserstoffbildung bei Bacterien. *Arch. Hyg.* 16: 53, 1893a.

- Rubner, M.: Die Wanderungen des Schwefels im Stoffwechsel der Bakterien. Arch. Hyg. 16: 78, 1893b.
- Salomonsen, C.J.: Studier over Blodets Forraadnelse. Disputats, G. Torsts Boghandel, København 1877.
- Schrank, J.: Untersuchungen über den im Hühnerei die stinkende Fäulniss hervorrufenden Bacillus. Wiener Med. Jahrbücher 1888, p. 313.
- Skovgaard, N.: Om specifik tælling af clostridier i levnedsmidler. VIII Nordiska veterinärmötet – Sektion E, rapport 2. 1958.
- Skovgaard, N.: Salmonellafund i levnedsmidler. Nord. Vet.-Med. 16: 206, 1964.
- Stagnitta-Balistreri: Die Verbreitung der Schwefelwasserstoffbildung unter den Bacterien. Arch. Hyg. 16: 10, 1893.
- Tarr, H.L.A.: The enzymic formation of hydrogen sulphide by certain heterotrophic bacteria. Biochem. J. 27: 1869, 1933.
- Tarr, H.L.A.: The enzymic formation of hydrogen sulphide by certain heterotrophic bacteria. II. Biochem. J. 28: 192, 1934.
- Tilley, F.W.: The relation between chemical composition of peptones and hydrogen sulphide production by bacteria. J. Bact. 8: 287, 1923.
- White, A., Handler, P. & Smith, E.L.: Principles of Biochemistry, 5. ed. McGraw Hill, London 1973, p. 398.
- Wilson, W.J.: Reduction of sulphites by certain bacteria in media containing a fermentable carbohydrate and metallic salts. J. Hyg. (Lond.) 21: 392, 1923.
- Wilson, W.J. & Blair, E.M.M'v.: The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. J. Path. Bact. 27: 119, 1924.
- ZoBell, C.E. & Feltham, C.B.: A comparison of lead, bismuth, and iron as detectors of hydrogen sulphide produced by bacteria. J. Bact. 28: 169, 1934.

## Kapitel 35

### Ureaseprøver

Med ureaseprøver påvises tilstedeværelse af enzymet urease, som spalter urinstof til ammoniak og kuldioxyd.

#### 1. Historisk indledning

Pasteur's klassiske gæringsundersøgelser omfattede også den fra gammel tid kendte urinstofgæring. I 1862 så han mikroorganismer i ammoniakalsk dekomponeret urin, og i 1864 dyrkede hans elev van Tieghem fra en sådan urin en bakterie, som han videreførte i kulturer i steril urin. Bakterien fremkaldte dekomposition med ammoniakdannelse både af urin og af kunstigt fremstillede urinstofopløsninger.

I 1872 beskrev Ferdinand Cohn en urinstofspaltende *Micrococcus ureae* (muligvis *Staphylococcus saprophyticus* efter nugældende nomenklatur), og andre urinstofspaltere blev beskrevet af von Jaksch (1881) og af Leube & Graser (1885). Indgående undersøgelser over bakteriel urinstofspaltning foretog Miquel (1898) og Beijerinck (1901). Hvornår man mere målbevidst begyndte at anvende urinstofspaltende evne til karakteristik af forskellige bakterier står ikke klart, men Brodmeier (1895) bekræftede en tidligere fremsat påstand om, at *Proteus* hørte til urinstofspalterne, og Thorkild Røvsing viste i sin disputats om blærebetændelse (1889), at de fleste fra urinen isolerede bakterier i hans materiale spaltede urinstof. I et senere arbejde (1897) udtalte Røvsing: ” – jeg tror at Manglen på urinstofdekomponerende Evne er en ligeså constant Karakter for *B. coli* som dens Mangel på Evne til at farves efter den Gramske Methode”. Her er det i hvert fald tydeligt, at evnen til urinstofspaltning erkendes som en diagnostisk værdifuld egenskab.

Fra omkring århundredskiftet og indtil 1940'erne blev undersøgelsen for urease især foretaget som led i identifikationen af *Proteus*. Man anvendte steril urin med neutral pH eller en urinstofopløsning og konstaterede omslag til basisk reaktion ved hjælp af en indikator; som et eksempel kan nævnes Moltkes disputats (1927) fra diagnoseafdelingen om *Proteus vulgaris*.

I 1941 kritiserede White & Hill med rette den hidtil anvendte fremgangsmåde ved at fremhæve, at reaktionsomslaget kunne skyldes andre basiske stoffer end ammoniak, og at ammoniakdannelsen kunne stamme fra andre stoffer end urinstof. De udarbejdede en mere fejlfri metode, som dog var ret besværlig, men kunne med denne metode vise, at en del andre bakterier end *Proteus* dannede urease, selv om der i kvantitativ henseende var stor variation.

Samme år angav Rustigian & Stuart (1941) en ny metode, som ved tilsætning af gærekstrakt skulle sikre, at der altid var rimelige vækstbetingelser for de undersøgte stammer. Mængden af gærekstrakt – 0,01% – var dog så lille, at man kan være i tvivl om, at det tilsigtede resultat blev opnået. De indførte også kontrolundersøgelser i urinstoffri substrater, som skulle sikre mod de af White & Hill påviste fejkilder. Mens deres undersøgelser stadig især stilede mod en sikker identifikation af *Proteus*, anvendte Ferguson & Hook (1943) metoden til at vise, at *Salmonella*-stammer var urease-negative, og anbefalede derfor ureaseprøven til differentiering mellem *Proteus* og *Salmonella* i diagnostik af tarmpatogene bakterier.

I et senere arbejde af Stuart et al. (1945) blev de nærmere betingelser for at bruge ureaseprøven som en pålidelig *Proteus*-test fastlagt, og herunder kom forfatterne ind på, at man ved at reducere mængden af stødpude i mediet dels kunne opnå et hurtigere resultat med *Proteus*, dels kunne udnytte svagere (senere) reaktioner ved diagnostik af andre arter af *Enterobacteriaceae*. Da det er tvivlsomt, hvor meget bakterierne vokser i det anvendte medium, og da forfatterne anbefalede brug af stort inoculum (3 "loops" til 1,5 ml substrat), må prøven opfattes som en hurtig, direkte enzymtest baseret på præformeret enzym, selv om den ikke blev betegnet som sådan. I modificeret form med udeladelse af gærekstrakttilsætning blev prøven indført som en direkte enzymtest i diagnoseafdelingen i slutningen af 40'erne, hvor den siden – fejlagtigt – har gået under betegnelsen modificeret Ferguson & Hook's ureaseprøve.

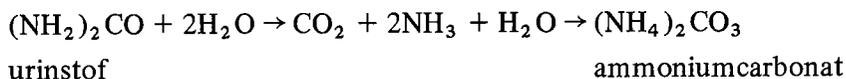
Blake Christensen (1946) mente, at man burde udføre en ureaseprøve under betingelser, hvor bakterierne i deres vækst ikke var afhængige af ammoniak fra urinstofspaltningen som kvælstofkilde, og komponerede derfor et fast medium (skråagar) baseret på et lavt peptonindhold (0,1%). Dermed forøges muligheden for falsk positive reaktioner (White & Hill 1941), men det mente han at kunne modarbejde ved at inkludere 0,1% glukose, som under væksten omdannes til syre. Kontrollforsøg med en række *Enterobacteriaceae*-stammer syntes at vise, at falsk positive reaktioner ikke forekom, og at den hastighed hvormed den alkaliske reaktion forplantede sig til skråglassets klump kunne bruges til at graduere reaktionsstyrken. Christensen anbefalede

sit medium til "screening" ved rutineundersøgelse af fæcesprøver. Mediet har siden fundet stor anvendelse i diagnostikken af *Enterobacteriaceae*, især i USA. Mens man formodentlig kan stole på resultatet, når det drejer sig om undersøgelse af glukoseforgærende bakterier, er det mere end tvivlsomt, om det samme gælder for ikke-forgærende bakterier.

Af nyere arbejder om ureaseprøven foreligger et af Ederer et al. (1971), som anbefaler en hurtigprøve til samtidig undersøgelse for urease og fenylalanindeaminase; et af Vuye & Pijck (1973) hvor forskellige ureaseprøver sammenlignes, og den bedst egnede til bestemte formål udpeges; og et af Murphy & Hawkins (1975) som behandler ureaseprøver ved identifikationen af mycobakterier. Ingen af dem indeholder afgørende fornyelser.

## 2. Biokemisk baggrund

Det neutralt reagerende urinstof hydrolyseres af enzymet urease til ammoniak og kuldioxid. I vandig opløsning dannes derfor ammoniumhydroxyd og kulsyre, der reagerer sammen og danner opløseligt ammoniumcarbonat. Skematisk er processen vist i følgende skema:



Reaktionen medfører en forskydning i pH fra neutral til basisk, og i klinisk bakteriologi er en påvisning af pH forskydningen ved hjælp af en indikator den almindeligst anvendte metode til at påvise urease-aktivitet. Som nævnt i den historiske indledning er det under visse forsøgsbetingelser nødvendigt ved kontrolforsøg at sikre sig, at pH forskydningen ikke skyldes andre processer (White & Hill 1941).

Urease er meget udbredt i planteverdenen, men sjældent hos dyr. Det er også hyppigt blandt bakterier; Seneca et al. (1962) har hævdet, at det forekom i alle bakterier, men Jeffries (1964) viste, at det ikke var rigtigt.

Urease var det første enzym, som blev isoleret i fuldstændig ren form. Summer (1926) fremstillede det af bønner og kunne af en rensed opløsning udkrystallisere det aktive stof, som viste sig at være et protein. Siden da har man erkendt, at alle enzymer er proteiner. Molekylvægten er ca. 480.000. Virkningen er strengt specifik, ingen andre stoffer end urinstof spaltes. Enzymet er konstitutivt, og påvisningen af en såkaldt adaptiv urease i *Pseudomonas aeruginosa* skyldes vist en fortolkningsfejl (DeTurk 1955). Enzymdannelsen er stærkt pH afhængig: ved faldende pH stiger ureaseproduktionen, ved stigende pH falder den. Det betyder, at enzymproduktionen stimuleres i sub-

strater indeholdende glukose og andre forgærbare kulhydrater, forudsat at bakterien danner syre af kulhydraterne (Ishikawa 1928; Richard 1975). I peptonholdige medier, hvor der frigøres ammoniak, sker der omvendt en undertrykkelse af ureasedannelsen. Enzymets aktivitet er til gengæld ret uafhængigt af pH; man udfører som regel prøverne ved en pH mellem 7,0 og 7,5. Enzymet grupperes blandt hydrolaserne, da substratspaltningen sker under vandoptagelse.

Enzymet findes kun intracellulært, og da cellemembranen er en delvis barriere for urinstofs indtrængen i cellen, kan aktiviteten i en bakteriesuspension forøges ved forudgående behandling med toluen, som forøger membranpermeabiliteten.

### 3. Valg af metode

Man har mulighed for at vælge en prøve og en aflæsningstid, som medfører, at kun de kraftigste ureasedannende bakterier som fx. *Proteus* vil blive registreret som positive, men man kan også vælge en mere følsom prøve, hvor desuden alle svagt ureasedannende bakterier vil give positiv reaktion, og ved en semikvantitering af resultaterne udnytte dem efter den forhåndenværende viden om de stærke, moderate og svage reaktioners differentierende værdi i forskellige diagnostiske situationer. Den første mulighed svarer til den ældre brug af ureaseprøven væsentligst som en "Proteus-prøve", men der er idag ingen grund til ikke at vælge den mest følsomme prøve, selv om man ved, at de svage reaktioner oftest er uden værdi i praksis. Men naturligvis forudsætter det, at man ret strengt holder sig til de givne regler for semikvantitering af resultaterne.

I diagnoseafdelingen anvendte man tidligere til ureaseprøven et flydende vækstmedium med samme sammensætning som Christensens urinstofagar (1946) og et kontrolglas uden urinstoftilsætning. Sidst i 1940'erne indførte Martin Kristensen en direkte enzymtest baseret på Stuart et al.'s (1945) såkaldte "rapid test" med små modifikationer, derunder et kontrolglas med substrat uden tilsat urinstof. Denne direkte enzymtest for ureasepåvisning beskrives i det følgende. Hvis man fx. til *Enterobacteriaceae* skulle foretrække et vækstmedium, vil vi anbefale at bruge Christensens urinstofagar, men fremhæve at prøven kun er egnet til kulhydratforgærende bakterier.

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Direkte enzymtest anvendt i diagnoseafdelingen*

a) *Urinstofopløsning* (i substratafdelingens opskrifter betegnet som urea til ureaseprøve)

Urinstof	1,0%
Primært kaliumfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,1%
Sekundært kaliumfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,1%
NaCl	0,5%
Fenolrødt (1:500)	5 ml/liter
pH indstillet til 7,0	

Ca. 0,5 ml aftappet i Widalglass (70 x 10/11 mm) som er mærket urea+

b) *Kontrolopløsning*

Som a) uden urinstof, glasset mærket urea-

#### *Udførelse*

Som inoculum anvendes celler fra en døgngammel renkultur på en bouillon-agarplade eller en anden standardplade. Indholdet af to middelstore øskner – maksimalt fyldt med kultur – overføres til Widalglasset og fordeles jævnt ved forsigtig rotation af platinøskenen i væsken. På samme måde laves en suspension i kontrolglasset, og man sikrer sig ved sammenligning, at farven er ens i de to glas. Før glassene anbringes i 35°C termostat, sættes gummipropper på, dels for at undgå fordampning og optagelse af ammoniakdampe fra termostatluften, dels for at nedsætte risikoen, hvis et stativ tabs eller vælter. Henstand ved 35°C anvendes som standardmetode, men henstand ved stuetemperatur giver praktisk talt samme resultat.

#### *Aflæsning og fortolkning*

Ved pH 7,0 er fenolrødt svagt gulligbrunlig, mens det ved pH over 8,5 viser en klar rosarød farve. Ved aflæsningen sammenlignes farven i de to glas, og hvis den er mere rød i urinstofopløsningen end i kontrolopløsningen, betegnes prøven som positiv.

Aflæsning skal ske 15 minutter, 2 timer og ca. 20 timer efter suspenderingen. Rød farve efter 15 minutter betegnes som stærkt (+++) positiv, efter 2 timer som middelstærk (++) positiv og efter ca. 20 timer som svagt (+)

positiv. Er der ingen rød farve i urinstofglasset efter 20 timer, betegnes prøven som negativ.

Hvis kontrolglasset er lige så rødt som urinstofglasset, er prøven uaf læselig, som regel skyldes dette resultat, at kulturen i sig selv har været stærkt alkalisk, hvilket angiver, at betingelserne for produktion af en evt. tilstedeværende urease har været ugunstige,

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Arbejdet med at fremstille tætte suspensioner af bakterier i små, snævre glas rummer risiko både for aerosoldannelse og for at efterlade bakterier på kanten af glasset. Kraftig afsluttende flambering af glassets kant skal altid udføres.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Genet, der koder for urease-enzymet, findes som regel placeret på kromosomet, men i de senere år er der i sjældne tilfælde fundet ekstrakromosomale DNA elementer (plasmider), som kan føre til ureasedannelse. Da sådanne ekstrakromosomale elementer kan overføres mellem mange mere eller mindre beslægtede bakterier, vil man i sjældne tilfælde træffe stammer hørende til en urease-negativ taxon, som overraskende viser sig at danne urease, fordi den bærer et sådant overført plasmid. Der er fx. fundet enkelte urease-positive stammer af *E. coli* og *Streptococcus faecium* (Cook 1976; Reaney 1976).

### a) Taxa med stammer der som regel giver stærk (+++) positiv reaktion

*Proteus*: alle species undtagen *P. inconstans*, som kun sjældent er positiv

*Yersinia*: alle species undtagen *Y. pestis*

*Actinobacillus*: alle species undtagen *A. actinomycetemcomitans*

*Pasteurella*: *P. ureae* og *P. pneumotropica*

*Bordetella* undtagen *Bord. pertussis*

*Sporosarcina ureae*

*Eubacterium ureolyticum*

### b) Taxa med stammer der som regel giver middelstærk (++) eller svagt (+) positiv reaktion

*Klebsiella*: de fleste stammer

*Enterobacter*: nogle stammer

*Haemophilus*: de fleste biotyper af *H. influenzae* og *H. parainfluenzae* samt *H. pleuropneumoniae*

*Brucella*: nogle stammer

*Moraxella phenylpyruvica*: de fleste stammer  
*Acinetobacter*: nogle stammer  
*Streptococcus salivarius*: de fleste stammer  
*Bacillus*: nogle stammer i flere species  
*Clostridium*: en enkelt species: *Cl. sordelli*  
*Corynebacterium*: en del species  
*Nocardia*: mange species  
*Bacterionema*: ca. halvdelen af stammerne  
*Mycobacterium*: mange species

### 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

De kraftige ureasereaktioner (+++ reaktioner) er nyttige ved differentiering mellem arterne inden for slægterne *Proteus* (inklusive *Providencia*), *Yersinia*, *Actinobacillus*, *Pasteurella* og *Bordetella*.

De moderat kraftige reaktioner (++) kan bruges som et positivt bidrag til diagnosen af stammer inden for de arter, hvor de vides at forekomme, men de er sjældent så konstant til stede i en given art, at manglende forekomst af urease kan tillægges afgørende betydning.

De svage reaktioner (+) har i øjeblikket som regel ingen praktisk diagnostisk værdi, men bør udnyttes ved systematisk undersøgelse for at skaffe et erfaringsmateriale med henblik på evt. fremtidig udnyttelse.

### 8. Referencer

- Beijerinck, M.W.: Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus. Centralbl. Bakt. 2. Abt. 7: 33, 1901.
- Brodmeier, A.: Ueber die Beziehung des *Proteus vulgaris* Hsr. zur ammoniakalischen Harnstoffzersetzung. Centralbl. Bakt. I Abt. 18: 380, 1895.
- Cohn, F.: Untersuchungen über Bacterien. In: Cohn, F. (ed.): Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. I, Heft 2, p. 158, J.U. Kern's Verlag, Breslau 1872.
- Cook, A.R.: The elimination of urease activity in *Streptococcus faecium* as evidence for plasmid-coded urease. J. gen. Microbiol. 92: 49, 1976.
- Christensen, W.B.: Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bact. 52: 461, 1946.
- DeTurk, W.E.: The adaptive formation of urease by washed suspensions of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 70: 187, 1955.
- Ederer, G.M., Chu, J.H. & Blazeviz, D.J.: Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production. Appl. Microbiol. 21: 545, 1971.
- Ferguson, W.W. & Hook, A.E.: Urease activity of *Proteus* and *Salmonella* organisms. J. Lab. clin. Med. 28: 1715, 1943.

- Ishikawa, M.: Influence of carbohydrates on bacterial decomposition of urea. *J. infect. Dis.* **43**: 67, 1928.
- Jaksch, R.v.: Studien über den Harnstoffpilz. *Z. physiol. Chemie* **5**: 395, 1881.
- Jeffries, C.D.: Intracellular microbial urease. *Nature (Lond.)* **202**: 930, 1964.
- Leube, W. & Graser, E.: Ueber die harnstoffzersetzenden Pilze im Urin. *Virchows Arch. path. Anat.* **100**: 555, 1885.
- Miquel, P.: Etude sur la fermentation ammoniacale et les ferments de l'urée. Georges Carré et C. Naud, Paris, 1898.
- Moltke, O.: Contribution to the characterization and systematic classification of *Bac. proteus vulgaris* (Hauser). Disputats, København 1927.
- Murphy, D.B. & Hawkins, J.E.: Use of urease test disks in the identification of mycobacteria. *J. clin. Microbiol.* **1**: 465, 1975.
- Reaney, D.: Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bact. Rev.* **40**: 552, 1976.
- Richard, C.: Intéret des cultures sur les milieux contenant des sucres fermentescibles pour la mise en évidence de l'uréase de *Klebsiella*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **126 B**: 201, 1975.
- Roberts, D.H., Little, T.W.A. & Forbes, D.: An unusual outbreak of bovine mastitis caused by a streptococcus. *Brit. vet. J.* **125**: 128, 1969.
- Rovsing, T.: Om Blærebetændelsernes Ætiologi, Pathogenese og Behandling. Disputats, P. Hauberg & Comp., København 1889.
- Rovsing, T.: Kliniske og experimentelle Studier over Urinorganernes infektiøse Sygdomme. Det Schubothenske Forlag, København 1897, p. 232.
- Rustigian, R. & Stuart, C.A.: Decomposition of urea by *Proteus*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* **47**: 108, 1941.
- Seneca, H., Lattimer, J.K. & Peer, P.: Bacterial urease in pathogenic bacteria. Comparison of urea-splitting and non-urea-splitting bacteria. *Arch. Path.* **74**: 489, 1962.
- Stuart, C.A. Stratum, E. van & Rustigian, R.: Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms. *J. Bact.* **49**: 437, 1945.
- Summer, J.B.: Urease. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology*, 3. ed., vol. 2, p. 379. Acad. Press, New York 1963.
- Tieghem, M. van: Sur la fermentation ammoniacale. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **58**: 210, 1864.
- White, E.C. & Hill, J.H.: Bacterial urease. I. A critique of methods heretofore used for demonstrating bacterial urease and presentation of a valid and more sensitive test. II. A study of the ureolytic action of bacteria of significance in genito-urinary infection. *J. Urol. (Baltimore)* **45**: 744, 1941.
- Vuye, A. & Pijck, J.: Urease activity of Enterobacteriaceae: which medium to choose? *Appl. Microbiol.* **26**: 850, 1973.



# **Undersøgelse af fedtomsætning**



## Kapitel 36

### Lipase- og fosfolipaseprøver

Prøver der påviser bakteriers evne til at spalte naturligt forekommende fedtstoffer og bestemte syntetiske stoffer indeholdende esterbindinger.

#### 1. Historisk indledning

Interessen for fedtspaltende enzymer hos bakterier udsprang dels af ønsket om at få kendskab til de processer, der foregår ved de naturlige fedtstoffers fysiologiske nedbrydning i tarmkanalen, og ved deres dekomposition under opbevaring – et praktisk problem med økonomiske konsekvenser – dels af behovet for metoder til at karakterisere de mange nye bakterier, som blev opdaget i 1880'erne og 90'erne.

#### A. Lipaser

Det første arbejde, der omtaler bakterier og fedtspaltning, er sandsynligvis Escherich's monografi "Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung" fra 1886, som især beskriver *Bacterium coli commune*, nu *Escherichia coli*. Escherich var som børnelæge interesseret i spædbørns ernæring og foretog nogle få kvantitative undersøgelser af restmængden af kasein, sukker og fedt i komælk 14 dage efter at mælken var blevet inokuleret med forskellige tarmbakterier. Tallene antydede en fedtspaltning, men var for få til, at man kunne lægge vægt på resultaterne.

Den første bredere undersøgelse af et udvalg af kendte bakterier for deres evne til at spalte fedtstoffer skyldes von Sommaruga fra Wien (1894). Han dyrkede bakterierne i skråglas med kød-pepton tilsat gelatine eller agar, hvori fedtstoffet – rensede olivenolie eller oksefedt – var emulgeret. Frigjorte fede syrer – påvist ved titrering – blev taget som udtryk for fedtspaltning.

Emulgering af fedtstoffer i næringsmediet vedblev i mange år at være den mest anvendte fremgangsmåde ved undersøgelse for lipaser, og er det tildels stadig. I tidens løb er forsøgt mange variationer, både med hensyn til fedtstoffets art og den anvendte emulgeringsprocedure, men hovedproblemet har

dog været at finde en egnet måde til at markere, at spaltning har fundet sted. Inden der fortsættes med dette problem skal først omtales enkelte forsøg på at komme helt uden om emulgeringen. Eijkman (1901) smeltede fast fedtstof (oksetalg) og hældte det i bunden af en petriskål, hvor det stivnede, og ovenpå hældte han næringsmediet med bakterierne tilblandet. Spaltning kunne påvises ved ændringer i fedtlagets udseende og konsistens. Denne metode har også senere været anvendt, især i Holland, men aflæsningen synes at være vanskelig. Bulder (1955), der også er fra Holland, gik en anden vej for at undgå emulgeringen. Med en spray dækkede han næringssubstratets overflade med et ganske tyndt lag af olivenoliedråber umiddelbart efter tilsætningen. Aflæsningen foregik under mikroskopet, og en fedtspaltning viste sig ved at de gennemsigtige, regelmæssigt runde fedtdråber blev uigennemsigtige, granulerede og uregelmæssige i formen. Ved direkte sammenligning med Eijkman's metode fandt Bulder, at begge metoder førte til næsten samme resultat, men at hans egen var den hurtigste.

Som anført brugte von Sommaruga en titrering af frigjort syremængde for at konstatere fedtstoffernes spaltning, og det har også andre forsøgt (fx. Sayer et al. 1908), men metoden er ikke tilfredsstillende, da de fede syrer som syrer betragtet er for svage (Turner 1929).

Særlige metoder til at markere, at spaltning havde fundet sted, blev indført i bakteriologien omkring 1930. Turner (1927, 1929) var den første, der brugte tilsætning af nilblåt. Dette farvestof var allerede i 1908 af Smith blevet brugt som histokemisk farvestof på grund af dets evne til at farve neutralfedt rødt og fede syrer blåt. Boeminghaus (1920) viste ganske vist, at dette ikke gælder generelt, da det tilsyneladende kun var oleinsyre og måske andre umættede fedtsyrer, der reagerede på denne måde, men da de fleste naturlige fedtstoffer indeholder oleinsyre som bestanddel, betød det ikke stort for metodens anvendelighed. Turner angav, at fedtspaltende kolonier var tydeligt markeret ved at være omgivet af en dybblå zone, og metoden har siden været meget benyttet. Han anførte som en ulempe, at stoffet i den anvendte koncentration virkede væksthæmmende på nogle grampositive bakterier, men Knaysi (1941) gjorde opmærksom på, at dette kunne undgås ved at anvende den frie base i stedet for et salt, idet basen kun er opløselig i fedtstof, men ikke i vandfasen, hvor bakterierne findes.

I 1933 foreslog Berry at påvise fedtspaltning ved at flyde en pladekultur med en mættet opløsning af kobbersulfat. Stoffet havde været anvendt af Carnot & Mauban (1918) til påvisning af fedtsæber i en undersøgelse af tarmkanalens fedtspaltende enzymer fra bugspytkirtlen. Enkeltkolonier eller strøg, som havde spaltet fedtet, var omgivet af tydelige, blågrønne zoner af kobbersalte. Metoden blev siden anvendt af bl.a. Abd-El-Malek & Gibson (1948) og Willis (1960).

Ved brug af en række rene triglycerider som substrat opdagede Turner (1929), at spaltningen kunne påvises ved, at der fremkom opklaringer omkring lipolytiske kolonier i det turbide medium. Det må antages, at opklaringerne skyldtes de enkelte fede syrers større eller mindre opløselighed i mediet, da opklaringernes størrelse varierede med kædelængden af de fede syrer. Specielt med tributyrin konstaterede han en tendens til hæmning af væksten. Anderson (1934) har dog senere anbefalet netop en agarplade med tributyrin, som han ganske vist kalder stærkt selektiv. Oterholm & Ordal (1966) omgik hæmningen ved at udforme en direkte enzymtest. Også Collins & Hammer (1934a, b) anvendte triglycerider og satte nilblåt til substraterne, men konstaterede, at opklaringerne i nogle tilfælde var en bedre indikator end farvestoffet.

Som et sidste fænomen, der afslører tilstedeværelsen af afspaltede fede syrer, kan nævnes det særlige perlemorsagtige, iriserende lag af kalksæber, som ved anvendelse af æggeblommesubstrater dækker kolonierne og evt. en mindre zone udenfor (se senere).

Ved de hidtil omtalte metoder har enzymsubstratet enten været naturligt forekommende fedstoffer eller syntetiske triglycerider. Senere har man også brugt syntetisk fremstillede estere med fede syrer, hvor glycerol er erstattet af andre molekyler, fx.  $\alpha$ -naftol og  $\beta$ -nitrofenol eller polyoxyetylensorbitol. Det kommercielle navn for sidstnævnte gruppe af forbindelser er "Tween" plus et nummer, som angiver hvilke fede syrer, der er anvendt (se side 328). Tween-substraterne blev først anvendt i histologien til at lokalisere esteraseaktivitet i vævene (Gomori 1945), men senere også i bakteriologien for at påvise "lipolyse" (Märks 1952; Sierra 1957). Strengt taget er betegnelsen "lipolyse" misvisende, for Tween-substraterne er ikke fedtstoffer, men estere, og det man påviser er altså egentlig esteraseaktivitet. Sierra viste imidlertid, at en række clostridiearter havde forskellig aktivitet over for fire forskellige Tween-substrater, og det må betyde, at enzymspecificiteten ikke alene er knyttet til esterbindingen som sådan, men også afhænger af den fede syre, der indgår i bindingen. Tween-substraterne kan altså, selv om de ikke i kemisk forstand er fedtstoffer, bruges til påvisning af og differentiering mellem forskellige bakterielle lipaser.

Tween-substraternes store fordel er deres vandopløselighed. Pladesubstrater med tilsat Tween er derfor klare og gennemsigtige, og fraspaltningen af fede syrer markeres ved fremkomsten af en uigennemsigtig halo omkring aktive kolonier på grund af udfældede kalksæber. De har på Seruminstituttet og andre steder særlig været anvendt ved undersøgelse af stafylokokker og pseudomonader (se fx. Jessen et al. 1959 og Jessen 1965).

### B. Fosfolipaser

En særlig slags fedtspaltende enzymer er fosfolipaser og sphingomyelinaser. De angriber ikke de hidtil nævnte fedtstoffer og estere, men to særlige grupper af fedtstoffer: fosfoglycerider og sphingolipider.

Fosfolipase blev opdaget, da tyskeren Seiffert og australieren Nagler i 1939 uafhængigt af hinanden viste, at når man satte *Cl. perfringens*-toksin til visse humane sera, fremkom der en kraftig opacitet. Nagler viste, at efter centrifugering af et sådant glas samlede der sig foroven et fedtholdigt lag, og han viste desuden, at reaktionen udeblev, hvis man tilsatte specifikt antitoksin. R.G. Macfarlane et al. (1941) og M.G. Macfarlane & Knight (1941) viste derefter, at det var  $\alpha$ -toksinet fra *Cl. perfringens*, som udløste reaktionen, at man fik samme reaktion med en æggeblommepræparation som med serum, og at  $\alpha$ -toksinet spaltede lecithin i æggeblommen til foskokolin og en diglycerid. Da denne lecithinasespaltning afveg fra tidligere kendte spaltninger fremkaldt af lecithinase A og B, kaldte de enzymet lecithinase C, der altså er identisk med *Cl. perfringens*  $\alpha$ -toksin.

Hayward (1941, 1943) indså straks muligheden for at udnytte disse resultater til en hurtig identifikationsprøve for *Cl. perfringens*. Først foreslog hun at anvende et flydende vækstmedium tilsat 10–20% humant serum, men gik senere over til at anbefale et plademedium, hvor Nagler-reaktionen, som den kaldes, fremtrådte som store uigennemsigtige zoner omkring kolonier af *Cl. perfringens*. McClung & Toabe (1947) anvendte æggeblommeemulsion i pladerne i stedet for serum. For at forøge prøvens specificitet foreslog Hayward at flyde den ene pladehalvdel med specifikt antiserum før tilsætningen, så hæmning af udfældningerne på denne pladehalvdel virker som en kontrol for den anden halvdel. Denne såkaldte Nagler-plade anvendes nu overalt ved påvisning af *Cl. perfringens*.

Senere undersøgelser (oversigt hos Avigad 1977) har vist, at fosfolipase C også produceres af visse andre clostridie-arter og af nogle stammer af følgende slægter: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus* og *Proteus*. En speciel sphingomyelinase C er påvist hos *Staphylococcus aureus*; enzymet er identisk med bakteriens  $\beta$ -hæmolysin (Avigad 1977).

Willis (1960) og Willis & Gowland (1960) analyserede nærmere reaktionerne på Nagler-plader og kom til det resultat, at foruden de store præcipitater, der danner halo omkring kolonierne og som skyldes fosfolipase C, kan man finde mere begrænsede præcipitater, der sjældent når uden for kolonien, men som til gengæld ofte er ledsaget af et perlemorsagtigt iriserende lag hen over kolonierne og evt. lidt ud på substratet. De konkluderede, at disse begrænsede præcipitater skyldes almindelige lipaser, bl.a. fordi de farves af kobbersulfat. Den af Gillespie & Alder (1952) påviste "egg-yolk-reaction" hos visse

stafylokokker er af denne type og skyldes altså en esterase. Jessen et al. (1959) fandt, at positive reaktioner i egg-yolk testen og Tween 80 testen stort set fremkaldtes af de samme stammer, men Alder et al. (1972) er senere kommet til det resultat, at der er forskel mellem de to reaktioner, og formoder, at det skyldes at to forskellige enzymer er involveret.

Af nyere metoder til påvisning af lipase kan nævnes Oterholm & Ordal's (1966). Det er en prøve baseret på præformeret enzym i tætte suspensioner, som anbringes i huller i en tributyrin-agarplade, og hvor de positive reaktioner viser sig som en opklaring i agaren omkring hullet. De anser metoden for at være mere følsom end alle tidligere.

Chrisope et al. (1976) og Fox et al. (1976) har til påvisning af fosfolipaser angivet en lecithin-agarplade, som de anser for at have flere fordele end den klassiske Nagler-plade. Det anvendte lecithin er et kommercielt produkt fremstillet af sojabønner.

Der findes fra de sidste 10 år en righoldig biokemisk litteratur om fosfolipaser, hvilket bl.a. skyldes disse års intensive beskæftigelse med cellemembraner, fordi højtremsede enzymer er nødvendige redskaber ved disse undersøgelser. En referenceliste med 844 numre findes i Avigad's oversigtsartikel om mikrobielle fosfolipaser fra 1977.

## 2. Biokemisk baggrund

### A. Lipaser

Det naturlige substrat for disse enzymer er dyriske fedtstoffer og plantefedtstoffer. I laboratoriet bruges desuden syntetiske forbindelser som triglycerid-estere og Tween-substrater. Den fælles egenskab ved de naturlige og syntetiske substrater er en esterbinding mellem en alkohol og fede syrer, og enzymerne kan under eet betegnes som hydrolytiske esteraser, da deres virkning er en spaltning af esterbindingen under vandoptagelse, men da der findes mange andre esteraser, er det praktisk at bruge betegnelsen lipaser.

I de naturlige fedtstoffer og de syntetiske triglycerider er de fede syrer bundet til den trivalente alkohol glycerol. I de syntetiske triglycerider, fx. tributyrin og triolein, der også kaldes *simple triglycerider*, er der til alle tre alkoholgrupper i glycerol bundet samme fede syre. I såkaldte *blandede triglycerider* er der to eller tre forskellige fede syrer bundet til hvert glycerolmolekyle. *Naturlige fedtstoffer* består af blandinger af blandede triglycerider, hvortil kommer små mængder af mange andre stoffer som tilblandinger. *De fede syrer*, der indgår i blandede triglycerider, har som regel en kædelængde på 10-18 kulstofatomer og er uforgrenede. Der er både mættede og umættede fede syrer, hyppigst stearin- og palmitinsyre.

Simple triglycerider fremstilles syntetisk med både de lavere og højere led i rækken af fede syrer. Tributyrin, som er et meget anvendt substrat, er det lettest spaltelige af triglyceriderne; da den fraspaltede fede syre, smørsyre, er opløselig i vand, markerer en spaltning sig ved opklaring i det turbide medium. Man må regne med, at det i højere koncentrationer kan være toksisk, og at spontan spaltning synes at forekomme.

Til fremstilling af Tween-substrater anvendes alkoholen polyoxyetylen-sorbitol, som kobles til forskellige af de højere fede syrer; Tween 80 er således polyoxyetylen-sorbitan-monooleat, Tween 85 den tilsvarende trioleat. Til Tween 20 anvendes laurinsyre, til Tween 40 palmitinsyre og til Tween 60 stearinsyre.

En karakteristisk egenskab ved alle disse stoffer, undtagen Tween-substraterne, er deres uopløselighed i vand. Også de fleste fede syrer, der frigøres ved spaltning af fedtstoffer, er vanduopløselige, hvorimod nogle af deres salte ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) er opløselige.

De gængse metoder til måling af enzymaktivitet forudsætter opløsninger med veldefinerede mængder af både enzym og substrat i en vandfase, og de kan derfor egentlig ikke anvendes på fedtemulsioner. De erfaringer, man har gjort, tyder på, at lipasernes aktivitet udfolder sig i interfasen mellem en fedtdråbeoverflade og den omgivende vandfase, og at jo større denne interfases areal er, des større aktivitet finder man. Heraf fremgår, at emulsionens finhed og stabilitet bliver vigtige faktorer. Til emulgeringen anvendes som regel ultralydbehandling, og som stabilisatorer kan bl.a. anvendes tragant og polyvinylalkohol (Hugo & Beveridge 1962; Mourey & Kilbertus 1976).

Kun ganske få lipaser er forsøgt renfremstillet, og man ved endnu ikke, om der findes en række forskellige lipaser med hver sit specifikke substrat, eller om der er tale om et enkelt eller nogle få enzymer med bred specificitet, selv om man fra bakteriologiske forsøg ved, at forskellige stammer har forskellig virkning over for forskellige substrater.

Bortset fra at man med de simple triglycerider har kunnet vise, at med stigende kædelængde bliver hydrolysen vanskeligere (Collins & Hammer 1934a; Shah & Wilson 1965), kan man ikke sige noget generelt om de forskellige substraters større eller mindre tendens til at blive spaltede. En række naturlige fedtstoffer viste i en bestemt undersøgelse ikke større indbyrdes forskel med hensyn til spaltelighed (Collins & Hammer 1934a).

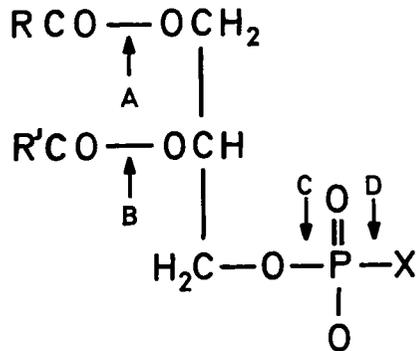
De få undersøgelser, der findes, tyder på, at pH omkring neutralpunktet svarer til lipasernes aktivitetsoptimum. Med hensyn til enzyminduktion antyder Sierra (1957) dette som en mulighed og nævner andre, der er af samme opfattelse, men spørgsmålet må betragtes som uafklaret.

### B. Fosfolipaser

Det naturlige substrat for fosfolipaser er en særlig gruppe fedtstoffer – fosfoglycerider eller fosfatider – som næsten udelukkende findes i cellemembraner hos planter, dyr og bakterier. I større mængde forekommer de i æggeblomme, lever- og hjernevæv; kommercielt fremstilles de af sojabønner og jordnødder.

Der er mange forskellige fosfatider, men deres grundstruktur er fælles med et centralt glycerolmolekyle, hvortil i esterbinding er knyttet to forskellige molekyler fed syre (R og R') og et molekyle fosforsyre (P); til dette er yderligere bundet med et molekyle (X), der ligesom de fede syrer er forskelligt i forskellige fosfoglycerider. Hvis det fx. er ætanolamin eller kolin, har man fosfoglyceriderne kefalin og lecithin.

Skematisk har et fosfoglycerid følgende formel, hvor A-D angiver de bindinger, der spaltes af fosfolipaser:



Nomenklaturen for fosfolipaserne har vekslet i tidens løb; således har fosfolipase C en tid været kaldt fosfolipase D, og betegnelsen for de enzymer, der fraspalter de fede syrer, er stadig noget forvirrende. Fraspaltningen af de fede syrer sker ved hjælp af fosfolipase A og B; først fjernes den ene fede syre ved hjælp af fosfolipase A, kaldet A<sub>1</sub> hvis det sker ved binding A og A<sub>2</sub> hvis det sker ved binding B. Den anden fede syre fjernes af fosfolipase B, uanset om den findes ved binding A eller B. Denne sidstnævnte spaltning ved hjælp af fosfolipase B tilskrives dog undertiden lysofosfolipase L<sub>1</sub> eller L<sub>2</sub>, idet lysofosfatid er betegnelsen for molekylet efter at een fed syre er fraspaltet. Enzymerne L<sub>1</sub> og L<sub>2</sub> spalter henholdsvis bindingerne A og B.

Forståelse af dette har størst betydning i biokemien, for i praktisk bakteriologi har fosfolipaserne A og B ikke umiddelbar interesse, fordi de er cellebundne enzymer, som øjensynlig kun har funktioner lokalt i cellemembranens stofskifte. Da også fosfolipase D med en enkelt undtagelse (*Coryne-*

*bacterium ovis*) kun er fundet cellebundet, samler interessen sig om den ekstracellulære fosfolipase C, der produceres af en række bakterier.

Fosfolipase C fra *Cl. perfringens* er et protein med en molekylvægt på omkring 50.000. Hvis der ikke er  $Zn^{++}$  i mediet, dannes det i inaktiv form. Aktiviteten er optimal ved pH 7,0–7,5 og kræver tilstedeværelse af små mængder  $Ca^{++}$  eller  $Mn^{++}$  joner. Den er størst over for lecithin, men også andre fosfoglycerider og sphingomyeliner (se senere) kan spaltes. Substratets dispersionsgrad har stor betydning, muligvis skal det findes i form af ladede miceller.

Fosfolipase C fra forskellige bakterier er ikke identiske, men har nogle fællestræk, bl.a. aktiveringen ved tilsætning af divalente katjoner. Deres substratspecificitet over for individuelle fosfoglycerider varierer en del, men ofte kun kvantitativt.

Her må tilføjes, at den særlige gruppe fedtstoffer, sphingolipider, hvortil sphingomyelinerne hører, har visse bygningstræk fælles med fosfoglyceriderne, og at de kan spaltes af fosfolipase C fra *Cl. perfringens*. Bakterien danner desuden et særskilt enzym, sphingomyelinase C, som ikke virker på fosfoglyceriderne. Også *Staphylococcus aureus* danner foruden fosfolipaserne en specifik sphingomyelinase C (identisk med  $\beta$ -toksinet). Betegnelsen sphingomyelinase C angiver, at disse enzymer spalter den binding i sphingomyelinmolekylet, som svarer til fosfolipase C's angrebepunkt i fosfoglyceridmolekylet.

Mens de ovenfor omtalte biokemiske data er resultatet af arbejde med mere eller mindre rene enzympræparationer og renfremstillede fosfoglycerider, skyldes de bakteriologiske erfaringer fortrinsvis undersøgelser baseret på kulturer eller kultursupernatanter og substrater indeholdende serum og æggeblomme eller sjældnere kommercielle lecithinpræparater. De fleste undersøgelser har drejet sig om clostridier og stafylokokker. Ud over det i den historiske indledning omtalte fortjener følgende arbejder at nævnes: Willis & Gowland (1962) forsøgte at analysere mekanismen ved Nagler-reaktionen udført med æggeblomme. De kom til det resultat, at de udfældninger, der ses i en plade, består af tre bestanddele: 1) fede syrer frigjort fra lecithin som følge af fosfolipase C virkningen, 2) neutralfedt udfældet fra æggeblomme-emulsion som følge af nedbrydning af lecithinet, der normalt stabiliserer emulsionen, og 3) vandopløselige proteiner, som i æggeblomme er bundet til fedtstoffer og udfældes sammen med dem, når emulsionen "krakker". Owens (1974) brugte i sin analyse af reaktionerne i æggeblommemedierne tyndtlagskromatografi til at identificere spaltningsprodukterne og kunne med 6 forskellige bakteriearter vise, at flere forskellige forløb forekom, involverende fra 1 til 3 enzymer. Som noget helt nyt viste han, at med *Staph. aureus* og *Serratia* indledes processen af en acyltransferase, som overfører et mole-

kyle fed syre fra lecithin til kolesterol, dvs. der kræves et specifikt acceptormolekyle. I øvrigt skal hans resultater ikke gennemgås i detaljer, da de endnu ikke kan udnyttes praktisk, men hans generelle konklusion skal anføres: æggeblommesubstrater er egnede til påvisning af fosfolipase C, men for at undgå fortolkningsvanskeligheder bør man påvise lipaser i andre medier specielt beregnede til dette formål.

### 3. Valg af metode

Mens Nagler-pladen til påvisning af *Cl. perfringens* har været brugt af diagnoseafdelingen i mange år, har man ikke rutinemæssigt anvendt lipaseundersøgelser. Kun ved Jessens systematiske *Pseudomonas*-undersøgelser i begyndelsen af 1960'erne anvendtes plader med Tween 80 og flydende æggeblommemedium. Der var enighed om, at aflæsningen af begge prøver ofte var vanskelig og for afhængig af et subjektivt skøn.

Da vi ikke har fornøden erfaring til at give konkret anbefaling med hensyn til en egnet lipaseprøve, vil vi nøjes med på grundlag af litteraturen at komme med følgende bemærkninger. Der må ofres særlig opmærksomhed på emulgeringen af det specifikke substrat ved anvendelse af fx. elektrisk mikser og/eller ultralyd-desintegrator. Forsøg på at finde en egnet stabilisator ville nok også kunne betale sig (se Zajic & Panchal 1976). Princippet fra de direkte enzymtests har kun været benyttet af få (Oterholm & Ordal 1972), men fortjener uden tvivl større opmærksomhed, enten i form af tilsætning af tætte suspensioner til huller i et fast medium eller til flydende substrat. Bl.a. vil man på denne måde kunne undgå den toksiske virkning af visse substrater (fx. tributyrin) og indikatorer (fx. nilblåt). Triolein og olivenolie, som indeholder 70% triolein, burde være særlig velegnede i forbindelse med nilblåt som indikator, dels på grund af den umættede oleinsyres kraftige blå farve (Boeminghaus 1920; Collins & Hammer 1934a, b), dels fordi oleinsyren holder sig flydende ved stuetemperatur modsat de fleste andre fede syrer med lange kæder. Ved inkorporering af nilblåt i fast substrat bør sikkert Knaysi's (1941) anbefaling følges.

Følgende to fremgangsmåder kunne tænkes værd at prøve: 1) et fast medium tilsat triglycerider eller neutralfedt og nilblåt og en bakteriesuspension sat til huller i agaren, 2) et flydende medium med fx. triglycerider eller Tween, specielt Tween 80 eller 85 tilsat en tæt bakteriesuspension og efter få timer en indikator som nilblåt eller kobbersulfat.

Med hensyn til påvisning af fosfolipase C står valget mellem flydende eller fast medium og mellem brug af serum eller æggeblomme som specifikt substrat. Fast substrat har den fordel, at den ene pladehalvdel kan fungere som

kontrol for den anden, hvis den behandles med specifikt antiserum, hvilket er både praktisk og økonomisk. Angivelig giver æggeblomme et mere følsomt substrat end serum, men netop den forøgede følsomhed medfører, at man får udfældninger også med *Cl. oedematiens*, hvad der komplicerer aflæsningen. Det kan derfor anbefales til *Cl. perfringens* diagnostik at bruge en serumplade som beskrevet af Hayward (1943), men da de forskellige humane sera varierer med hensyn til egnethed, bør hver anvendt portion kontrolleres i forvejen. Hvis man vil anvende æggeblommemedium, vil det være hensigtsmæssigt at bruge to plader og anvende perfringens-antitoxin på den ene og oedematiens-antitoxin på den anden (Willis 1977).

#### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Nagler-reaktion på serumplade*

*Substrat* (se Hayward 1943)

Oksebouillon

Humant serum 16%

Filde's hæmoglobinopløsning 5%

Stivnet med agar, ophældt i petriskåle. Den fornødne mængde fri  $\text{Ca}^{++}$  findes i serum, og man kan ikke bruge plasma.

Filde's hæmoglobinopløsning fremstilles på følgende måde:

300 ml steril 0,9% saltvand tilsat

12 ml. ren konc. saltsyre

100 ml defibrineret fåreblod

2 g pepsin (1:3000)

sættes i vandbad ved  $56^{\circ}\text{C}$  i 6 timer. Der neutraliseres med 5N NaOH til pH 7,0-7,2. 1 ml kloroform tilsættes og der rystes.

*Reagens:* Serum indeholdende *Cl. perfringens* type A antitoxin (Wellcome).

*Udførelse:* Pladen præpareres ved at 0,1 ml serum spredes omhyggeligt, så den ene pladehalvdel bliver fuldstændig dækket af serum (der bør være ca. 4 enheder antitoxin pr. ml substrat). Denne halvdel mærkes særskilt. Når serum er opsuget, tilsås pladen med strøg, der går vinkelret på skillelinien mellem den serumholdige og den serumfri pladehalvdel. Inoculum kan være sårsekret eller andet prøvemateriale, en flydende blandingskultur eller kolo-

nier fra en primær plade. Inkuberingen sker under anaerobe forhold efter laboratoriets sædvanlige fremgangsmåde.

*Aflæsning:* Pladerne kan aflæses efter 20–24 timer. Man ser efter, om der findes ringformede uklarheder omkring nogle af enkeltkolonierne på den gennemsigtige plade som tegn på en udfældning i substratet, og gør sig klart, om udfældningerne findes på begge halvdele af pladen eller kun på den halvdel, der ikke er behandlet med antiserum.

*Fortolkning:* Udfældningszoner omkring kolonier på den ubehandlede pladehalvdel betyder ikke med sikkerhed, at *Cl. perfringens* er til stede, da enkelte andre clostridie-arter også kan fremkalde uklarheder. Hvis derimod samtidig den pladehalvdel, som er behandlet med antiserum, er uden uklarhed, er sandsynligheden for, at det drejer sig om *Cl. perfringens* meget stor. At diagnosen dog stadig ikke er 100% sikker, skyldes, at præcipitat fremkaldt af toksin fra *Cl. bifermentans* og *Cl. sordellii* også neutraliseres af perfringens-antitoxin. Sammenlignet med hyppigheden af *Cl. perfringens* er de to nævnte arter dog sjældne, og desuden er de opaciteter, de fremkalder, som regel så svage, at man kan få mistanke om, at de ikke skyldes *Cl. perfringens*.

## 5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

## 6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

### A. Lipaser

I Bergey's Manual, 8. udg., mangler oplysning om lipaseaktivitet fuldstændigt for mange taxa, og i andre tilfælde mangler oplysning om, hvilken metode eller hvilket substrat der er anvendt. De oplysninger der findes i originallitteraturen er tilvejebragt ved hjælp af forskellige metoder og med mange forskellige fedtsubstrater, og ofte er der kun tale om undersøgelse af få stammer af samme art, så også her er det svært at samle alment gyldige data. Konklusionen bliver, at det ikke er muligt at lave en diagnostisk nyttig liste.

Vi har valgt at lave en liste over de genera, inden for hvilke en eller anden forfatter, inklusive Bergey's Manual, angiver lipase-positive stammer, uanset den anvendte metode. Genera, der ikke er undersøgt eller undersøgt med negativt resultat, er ikke medtaget. I tilfælde, hvor det vides, at mange stammer er undersøgt, er der sat en stjerne foran genusnavnet. Nærmere oplysning må derefter søges i Bergey's Manual eller originallitteraturen.

- \* *Pseudomonas*
- \* *Serratia*
- \* *Enterobacter*
- Erwinia*
- Vibrio*
- Aeromonas*
- Lucibacterium*
- Chromobacterium*
- Fusobacterium*
- Branhamella*
- Acinetobacter*
- \* *Micrococcus*
- \* *Staphylococcus*
- Streptococcus*
- Bacillus*
- \* *Clostridium*
- Listeria*
- Eubacterium*
- Mycobacterium*
- Nocardia*

#### *B. Fosfolipase C*

Listen er baseret på arbejder af McClung & Toabe (1947), Willis (1960) og Avigad (1977). Gruppe a) omfatter arter, hvor produktion af fosfolipase C er definitivt fastslået, og gruppe b) omfatter arter, hvor der er god grund til at antage, at enzymet er fosfolipase C. Antallet af undersøgte stammer er stort for clostridiernes vedkommende, og næsten alle stammer af de anførte arter er positive. For de øvrige arter er antallet af undersøgte stammer ukendt, og det vides ikke, hvor regelmæssigt enzymet forekommer inden for de enkelte arter.

#### *Gruppe a*

*Clostridium*: *Cl. perfringens* type A-F, *Cl. oedematiens* type A, B, D, *Cl. sordellii* og *Cl. bifermentans*.

*Bacillus cereus* med varianterne *mycoides* og *anthracis*.

*Pseudomonas*: *P. fluorescens*, *P. schuylkilliensis* (regnes i dag til *P. fluorescens*), *P. chlororaphis* og *P. aureofaciens*.

*Acinetobacter calcoaceticus*.

*Gruppe b**Bacillus thuringiensis*: nogle serotyper*Listeria monocytogenes**Proteus spp.**Vibrio spp.**Staphylococcus aureus*

En substratspecifik sphingomyelinase C, forskellig fra fosfolipase C, er fundet hos:

*Clostridium perfringens* og *Staphylococcus*.

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

*Lipaseprøver*: Med den nuværende viden er prøverne på de fleste områder uden praktisk diagnostisk betydning. En begrænset differentialdiagnostisk værdi har de ved artsdiagnoser i slægterne *Bacillus* og *Pseudomonas* og sandsynligvis også inden for slægterne *Mycobacterium* og *Nocardia*. De anvendes en del ved stafylokokundersøgelser og har her vist sig at være af større interesse i forbindelse med epidemiologiske studier end i taxonomien.

*Prøve for fosfolipase C*: Til hurtig diagnose af *Cl. perfringens* er prøven værdifuld i forbindelse med brug af specifikt antitoksisk serum. *Cl. oedematiens*, som vi sjældent isolerer, kan påvises efter samme princip.

## 8. Referencer

- Abd-El-Malek, Y. & Gibson, T.: Studies in the bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci of milk. *J. Dairy Res.* 15: 249, 1948.
- Alder, V.G., Gillespie, W.A., Mitchell, R.G. & Rosendal, K.: The lipolytic activity of *Micrococcaceae* from human and animal sources. *J. med. Microbiol.* 6: 147, 1972.
- Anderson, J.A.: An agar plate method for the detection and enumeration of lipolytic microorganisms. *J. Bact.* 27: 69, 1934.
- Avigad, G.: Microbial Phospholipases. In: Bernheimer, A.W. (ed.): *Perspectives in Toxicology*. John Wiley & Sons, N.Y. 1977, p. 99.
- Berry, J.A.: Detection of microbial lipase by copper soap formation. *J. Bact.* 25: 433, 1933.
- Boeminghaus, H.: Über den Wert der Nilblaumethode für die Darstellung der Fettsubstanzen und den Einfluss einer längeren Formalinfixierung auf den Ausfall der Färbung. *Beitr. path. Anat. Allg. Path.* 67: 533, 1920.
- Bulder, C.J.E.A.: Some observations on the lipolytic activity of microorganisms and a new method for its detection. *Antonie v. Leeuwenhoek* 21: 433, 1955.
- Carnot, P. & Mauban, H.: Réaction colorée de la stéapsine sur plaques de gélose-graisse-émulsionnée par production de savon de cuivre. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 81: 98, 1918.

- Chrisope, G.L., Fox, C.W. & Marshall, R.T.: Lecithin agar for detection of microbial phospholipases. *Appl. environm. Microbiol.* 31: 784, 1976.
- Collins, M.A. & Hammer, B.W.: The action of certain bacteria on some simple tri-glycerides and natural fats, as shown by Nile-blue sulphate. *J. Bact.* 27: 473, 1934a.
- Collins, M.A. & Hammer, B.W.: Types of lipolysis brought about by bacteria, as shown by Nile-blue sulphate. *J. Bact.* 27: 487, 1934b.
- Eijkman, C.: Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl. Bakt.* 1. Abt. Orig. 29: 841, 1901.
- Escherich, T.: Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. F. Enke, Stuttgart 1886, p. 113, 170.
- Fox, C.W., Chrisope, G.L. & Marshall, R.T.: Incidence and identification of phospholipase C-producing bacteria in fresh and spoiled homogenized milk. *J. Dairy Sci.* 59: 1857, 1976.
- Gillespie, W.A. & Alder, V.G.: Production of opacity in egg-yolk media by coagulase-positive staphylococci. *J. Path. Bact.* 64: 187, 1952.
- Gomori, G.: The microtechnical demonstration of sites of lipase activity. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* 58: 362, 1945.
- Hayward, N.J.: Rapid identification of *Cl. welchii* by the Nagler reaction. *Brit. med. J.* 1: 811, 1941.
- Hayward, N.J.: The rapid identification of *Cl. welchii* by Nagler tests in plate cultures. *J. Path. Bact.* 55: 285, 1943.
- Hugo, W.B. & Beveridge, E.G.: A quantitative and qualitative study of the lipolytic activity of single strains of seven bacterial species. *J. appl. Bact.* 25: 72, 1962.
- Jessen, O., Faber, V., Rosendal, K. & Riewerts Eriksen, K.: Some properties of *Staphylococcus aureus* possibly related to pathogenicity. Part 1: A study of 446 strains from different types of human infection. *Acta path. microbiol. scand.* 47: 316, 1959.
- Jessen, O.: *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads. A taxonomic study. *Disputats, Munksgaard, København* 1965.
- Knaysi, G.: On the use of basic dyes for the demonstration of the hydrolysis of fat. *J. Bact.* 42: 587, 1941.
- Macfarlane, M.G. & Knight, B.C.J.G.: The biochemistry of bacterial toxins. I. The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem. J.* 35: 884, 1941.
- Macfarlane, R.G., Oakley, C.L. & Anderson, C.G.: Haemolysis and the production of opalescence in serum and lecitho-vitellin by the  $\alpha$  toxin of *Clostridium welchii*. *J. Path. Bact.* 52: 99, 1941.
- Marks, J.: Recognition of pathogenic staphylococci: with notes on non-specific staphylococcal haemolysin. *J. Path. Bact.* 64: 175, 1952.
- McClung, L.S. & Toabe, R.: The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium sporogenes* and certain species of the gangrene and *botulium* groups. *J. Bact.* 53: 139, 1947.
- Mourey, A. & Kilbertus, G.: Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J. appl. Bact.* 40: 47, 1976.
- Nagler, F.P.O.: Observations on a reaction between the lethal toxin of *Cl. welchii* (type A) and human serum. *Brit. J. exp. Path.* 20: 473, 1939.
- Oterholm, A. & Ordal, Z.J.: Improved method for detection of microbial lipolysis. *J. Dairy Sci.* 49: 1281, 1966.

- Owens, J.J.: The egg yolk reaction produced by several species of bacteria. *J. appl. Bact.* 37: 137, 1974.
- Sayer, W.S., Rahn, O. & Farrand, B.: Keeping qualities of butter. 1. General studies. *Michigan Agr. exp. St. Tech. Bull.* 1, 1908.
- Seiffert, G.: Eine Reaction menschlicher Sera mit Perfringenstoxin. *Z. Immun.-Forsch.* 96: 515, 1939.
- Shah, D.B. & Wilson, J.B.: Egg yolk factor of *Staphylococcus aureus*. II. Characterization of the lipase activity. *J. Bact.* 89: 949, 1965.
- Sierra, G.: A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie v. Leeuwenhoek* 23: 15, 1957.
- Smith, J.L.: On the simultaneous staining of neutral fat and fatty acid by oxazine dyes. *J. Path. Bact.* 12: 1, 1908.
- Sommaruga, E. von: Ueber Stoffwechselproducte von Mikroorganismen. III. Mitteilung. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 18: 441, 1894.
- Turner, R.H.: A differential plating medium for lipase-producing bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* 25: 318, 1927.
- Turner, R.H.: The action of bacteria on fat. 1. Relative merits of various differential plating mediums for lipase-producing organisms. *J. infect. Dis.* 44: 126, 1929.
- Willis, A.T.: The lipolytic activity of some clostridia. *J. Path. Bact.* 80: 379, 1960.
- Willis, A.T. & Gowland, G.: Egg-yolk reactions of *Pseudomonas* species. *Nature (Lond.)* 187: 432, 1960.
- Willis, A.T.: *Anaerobic Bacteriology. Clinical and Laboratory Practice.* Butterworths, London 1977.
- Zajic, J.E. & Panchal, C.J.: Bio-emulsifiers. *Critical Rev. in Microbiol.* 5: 39, 1976.



# **Undersøgelse af nukleinsyreomsætning**



## *Kapitel 37*

### **DNase- og RNaseprøver**

Prøver der påviser bakteriers evne til at danne enzymet deoxyribonuklease, som kan spalte polynukleotidet DNA til oligonukleotider.

#### **1. Historisk indledning**

I 1868 isolerede Miescher fra laksesperma nukleinsyre, et dengang fuldstændigt ukendt organisk molekyle (se Miescher 1897). Albert Kossel (1879, 1894) viste, at det indeholdt 4 forskellige organiske baser, en sukkerart og fosforsyre. Det fik han Nobel-prisen for i 1910, og 52 år senere fik Watson, Crick & Wilkins Nobel-prisen for at have opklaret, hvordan disse komponenter er bygget sammen til den berømte dobbeltspiral, som udgør nukleinsyremolekylet (DNA) (Watson & Crick 1953; Wilkins et al. 1953). De 4 baser, adenin, guanin, thymin og cytosin, blev i daglig jargon blandt tyske fysiologiske kemikere før århundredskriftet betegnet som "Xanthinkörper", idet xanthin er mellemprodukt ved nedbrydning af adenin og guanin til urinsyre, og man havde i talrige undersøgelser (fx. Schutzenberger 1874 og Salkowski 1890) over den spontane nedbrydning af plante- og dyrevæv vist, at sådanne "Xanthinkörper" var almindelige blandt nedbrydningsprodukterne. Det tydede på, at der i vævet fandtes særlige enzymer med evne til spaltning af nukleinsyre, men analysen kompliceredes af den samtidige forekomst af proteaser, som man dengang kun vidste lidt om (Araki 1903). Den første adskillelse mellem nuklease- og proteaseaktivitet findes i arbejder fra 1903 af Iwanoff fra det botaniske institut i Leipzig og af Plenge som arbejdede i det fysiologiske institut i Heidelberg hos Kossel. Begge undersøgte mikroorganismers evne til at smelte en nukleinsyregel. Iwanoff undersøgte svampe og Plenge 25 forskellige arter af bakterier, hvoraf nogle smeltede gelen og andre ikke. Plenge antydede, at hans resultater kunne blive af interesse ved inddelingen af bakterierne, og Iwanoff foreslog navnet nuklease for det nukleinsyrespaltende enzym.

I 1928 viste Griffith, at avirulente, ikke-kapselbærende pneumokokker af én bestemt type kunne transformeres til virulente kapselbærende pneumo-

kokker af en anden type. Hvorledes dette kunne gå til, var et spørgsmål, der først flere år senere blev besvaret af Avery og hans medarbejdere fra Rockefeller instituttet i New York. Avery havde i mange år arbejdet med pneumokokker og bl.a. undersøgt den kemiske struktur af nogle kapselantigener. I 1944 isolerede han sammen med MacLeod og McCarty den substans, der var ansvarlig for transformation af pneumokoktyper, og viste, at det drejede sig om deoxyribonukleinsyre (DNA) (Avery et al. 1944). Det viste sig meget vanskeligt at udvinde bare små mængder af DNA fra pneumokokkulturer, og senere fremsatte McCarty & Avery (1946) den antagelse, at pneumokokker ved lysering afgiver DNase, som nedbryder det samtidig frigjorte DNA. McCarty's fortsatte undersøgelser over deoxyribonuklease resulterede i en publikation 2 år senere, hvori han påviste, at 36 stammer af gruppe A hæmolytiske streptokokker under væksten afgav DNase og RNase til den omgivende kulturvæske (McCarty 1948). Et arbejde med de samme resultater blev samme år offentliggjort af Tillet et al. (1948).

Dette blev indledningen til en række bakteriologiske arbejder, der påviste ekstracellulær DNase og/eller RNase hos mange bakterier såvel inden for *Enterobacteriaceae*, clostridier og andre grampositive stave som inden for slægten *Micrococcaceae*.

I de første år efter offentliggørelsen af McCarty's og Tillet et al.'s arbejder var det specielt streptokokkers nukleasedannende evne, der blev undersøgt. Det blev vist, at alle gruppe A samt  $\frac{1}{4}$  af gruppe B streptokokker producerede både DNase og RNase. De fleste stammer fra andre streptokokgrupper dannede ikke nuklease, men undtagelsesvis fandtes enkelte stammer, som producerede DNase (Brown 1950). I 1949 viste McCarty, at streptokok-DNase virkede antigenet ligesom streptokinase og streptolysin, og dette blev senere bekræftet af Wannamaker (1958).

Under arbejdet med at finde DNaser fra forskellige bakterier lykkedes det i 1956 Cunningham et al. at påvise en DNase hos *Staphylococcus aureus*. Den var ret usædvanlig, idet den krævede  $\text{Ca}^{++}$  joner som aktivator i modsætning til de tidligere kendte DNaser, der krævede  $\text{Mg}^{++}$  joner, men det mest bemærkelsesværdige var, at den tålte kogning i 15 minutter uden aktivitetstab. Senere arbejder har vist, at også *S. albus* danner DNase, men at det kun er *S. aureus*, der danner termostabil DNase (Weckman & Catlin 1957; Lachica et al. 1971a, b). Flere forfattere har fundet god overensstemmelse mellem koagulasedannelse og produktion af termostabil DNase og anbefalet at supplere koagulaseprøven med en prøve for termostabil DNase, hvorved koagulase-negative *S. aureus* kan skelnes fra *S. albus* (DiSalvo 1958; Lachica et al. 1969; Dornbusch et al. 1976).

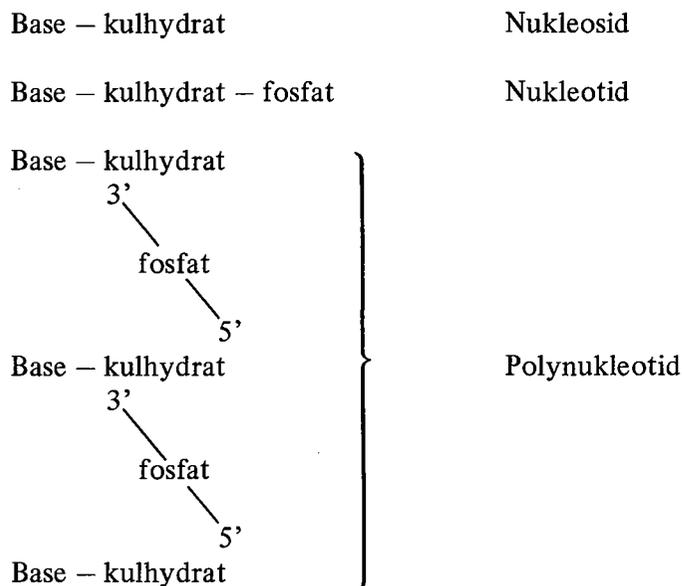
Også inden for enterobakterierne har evnen til at danne DNase vist sig at have en vis taxonomisk betydning. Jeffries et al. (1957) fandt under udarbej-

delsen af den første hurtige plademetode, at *Serratia* danner en ekstracellulær DNase af samme art som streptokoknukleaserne. Senere store undersøgelser af gramnegative stave har bekræftet dette, men har samtidig vist, at nogle stammer af *Alcaligenes*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio*, *Aeromonas* og *Pseudomonas aeruginosa* ligeledes danner DNase (Streitfeld et al. 1962; Rothberg & Swartz 1965; Martin & Ewing 1967; Blazevic 1969). Martin & Ewing og Blazevic fandt desuden, at *Enterobacter liquefaciens* danner DNase. Dette i forbindelse med andre iagttagelser har medført, at disse stammer nu henregnes til *Serratia*.

Også grampositive stave er blevet undersøgt. I 1951 blev det vist, at forskellige clostridier producerer DNase (Oakley & Warrack 1951; Warrack et al. 1951) og dette er senere blevet bekræftet (Princewill & Oakley 1972). De russiske forskere Messinova et al. undersøgte i 1963 over hundrede forskellige corynebakterier og fandt, at alle toksindannende *Corynebacterium diphtheriae* producerede DNase, hvorimod ingen af de ikke-toksindannende var i stand dertil. Forfatterne foreslog derfor at anvende DNase-prøven til at bestemme en difteribakteries virulens eller rettere evne til toksindannelse. Det er desuden vist, at *Bacillus subtilis* danner RNase (Lanyi & Lederberg 1966), og at leptospirer producerer DNase (Liven 1975).

## 2. Biokemisk baggrund

Et nukleinsyremolekyle har form som en dobbeltspiral snoet af to lange kæder, der er opbygget af ensartede elementer kaldet nukleotider; det er med andre ord en polynukleotid. Hver nukleotid består af en kvælstofholdig base, en ringformet pentose og en fosfatgruppe. Den del af molekylet, der omfatter basen og pentosen, kaldes en nukleosid. Nukleotiderne holdes sammen i kæder af fosfatgrupperne, som danner esterbindinger med pentoserne på den måde, at der går en binding til kulstofatom nr. 3 i den ene pentose og en anden binding til kulstofatom nr. 5 i den næste pentose i rækken. Der er altså tale om en diesterbinding, hvoraf navnet diesterase for nukleaser er afledt. De to kæder, som udgør spiralen, er indbyrdes bundet sammen ved at baserne i de enkelte nukleotider vender ind mod spiralens centrale akse, hvor de parvis forenes med baserne fra den modstående kæde gennem brintbindinger. Der indgår ialt fire forskellige baser i et nukleinsyremolekyle, som regel adenin og guanin, som er purinbaser, og thymin og cytosin, som er pyrimidinbaser, men i nogle tilfælde findes uracil i stedet for thymin. Pladsforholdene i molekylets indre medfører, at et basepar altid består af en purinbase fra den ene kæde og en pyrimidinbase fra den anden kæde, idet purinbaser rumligt fylder mere end pyrimidinbaser, og desuden at adenin altid parres med thymin og guanin altid med cytosin. De to kæder er således ikke identiske, men udgør



Skema over navnene på de underkomponenter nukleinsyrerne kan opdeles i. To steder er markeret diesterbindinger mellem kulhydratmolekylerne i polynukleotidet.

et komplementært par, dvs. at en bestemt rækkefølge af baserne i den ene kæde modsvarer af en bestemt – anden – rækkefølge i den modstående kæde, for at de kan parres sammen på rette måde.

Denne særlige opbygning af nukleinsyremolekylet forklarer, hvordan det er i stand til at fungere som bærer af de arvelige egenskaber. Den ganske bestemte rækkefølge, hvori de fire forskellige baser forekommer i en bestemt bakteriecelles nukleinsyremolekyle, udgør et biokemisk tegnsprog, som nøjagtigt fastlægger alt, hvad der kan og skal foregå i den pågældende celle. En colibakteries nukleinsyremolekyle indeholder ca. 3 millioner basepar i en for colibakterier karakteristisk rækkefølge og kan sammenlignes med en meget lang telegrafstrimmel med morsetegn, der rummer alle de "oplysninger", hele den "plan", der netop gør cellen til en colibakterie. Når en bakterie skal dele sig, begynder dobbeltspiralens to kæder at skilles fra hinanden, og med hver af enkeltkæderne som model eller skabelon dannes ved hjælp af særlige enzymer to nye komplementære kæder, som hver forener sig med en af de gamle enkeltkæder, så man ender med to dobbeltspiraler, en til hver af døtrecellerne. De to nydannede dobbeltspiraler er begge identiske med den oprindelige, da de består af een kæde fra den oprindelige dobbeltspiral og en hertil svarende nydannet komplementær kæde. Døtrecellerne må derfor nødvendigvis blive tro kopier

af modercellen, dvs. de arver alle modercellens egenskaber.

Det har vist sig, at der er to slags nukleinsyremolekyler; i den ene er pentosen desoxyribose og molekylet kaldes desoxyribonukleinsyre eller DNA, i det andet er pentosen ribose og molekylet kaldes ribonukleinsyre eller RNA. I bakterier findes både DNA og RNA. DNA er det ovenfor beskrevne store molekyle, som udgør cellens arvemasse eller dens kromosom, mens RNA er mindre molekyler, som medvirker til at omsætte DNA molekylets biokemiske tegnsprog til faktiske biokemiske processer i cellen.

Nukleaser er fællesbetegnelse for enzymer, der er i stand til at depolymerisere nukleinsyremolekyler, så enten enkelte nukleotider frigøres fra enden af en kæde (exonukleaser) eller en kæde overskæres et eller flere steder, så der frigøres større eller mindre kædestykker = oligonukleotider (endonukleaser). En anden betegnelse for disse enzymer er diesteraser, og der skelnes mellem diesteraser, som spaltes 3-bindingen eller 5-bindingen mellem fosfat og pentose. Endelig kan der skelnes mellem enzymer, som alene spaltes DNA = DNaser eller alene spaltes RNA = RNaser, men der findes også uspecifikke nukleaser, som spaltes både DNA og RNA.

Disse enzymer findes i og kan udvindes af forskellige dyr og planter, og desuden findes de i bakterier. Deres normale funktion er dels at gøre nukleinsyrens bestanddele tilgængelige for andre organismer som led i naturens almindelige omsætningsprocesser, dels har de særlige funktioner i forbindelse med den enkelte celledes interne nukleinsyrestofskifte, måske især ved reparationsprocesser, hvis der opstår fejl ved DNA-kædernes replikation.

De forskellige typer af nukleaser har spillet en vigtig rolle ved arbejdet med at analysere baserækkefølgen i DNA og RNA.

I det følgende skal omtales nogle af de bedst kendte bakterielle nukleaser: *S. aureus*-nukleasen, de 4 nukleaser som streptokokker danner og *Serratia*-nukleasen.

Særlig karakteristisk for nukleasen dannet af *S. aureus* er, at enzymet tåler kogning i 15 minutter. Det er en uspecifik fosfodiesterase, der angriber både DNA og RNA. Det spaltes polynukleotidkæden ved 5'-bindingen og danner derved oligonukleotider med det terminale fosfat fasthæftet ved 3'-positionen. Det angriber fortrinsvis nukleotidkæden ved baserne adenin eller uracil (thymine) (Cunningham 1959). Det er et protein, der består af en enkelt polypeptidkæde, som indeholder 149 aminosyrer. Molekylvægten er ca. 16000. pH-optimum ligger mellem 9 og 10, og temperaturoptimum ved 35°C (Abramson 1972). Enzymet aktiveres af Ca<sup>++</sup>-joner i koncentrationen 0,01 M (Frank et al. 1975).

Erickson & Deibel (1973) har vist, at produktionen af stafylokoknuklease ikke kan foregå under anaerobe forhold, samt at god iltning har en stimule-

rende effekt. Glukose i vækstmediet virker hæmmende, sandsynligvis på grund af syredannelse og derved sænkning af pH til under det optimale.

Streptokokker danner 4 forskellige nukleaser: A og C, der kun kan nedbryde DNA, og B og D, der spalter både DNA og RNA. I modsætning til stafylokok-nukleasen angriber de polynukleotidkæden ved 3'-bindingen, hvilket resulterer i oligonukleotid med terminalt fosfat knyttet til 5'-positionen. Molekylvægten er ca. 25000 til 30000. pH-optimum er for nuklease A og B 8-9, for C 5-6 og for D 6-9 (Gray 1972). Tillet et al. (1948) har vist, at opvarmning ødelægger nukleasen, og at  $Mg^{++}$  joner stimulerer dannelsen. Det er senere vist, at tilstedeværelsen af både  $Mg^{++}$  og  $Ca^{++}$  joner har den største aktiverende virkning, men at mange andre divalente katjoner udøver nogen effekt på enzymaktiviteten (Gray 1972).

Nestle & Roberts (1969a, b) har undersøgt nukleasen fra *Serratia marcescens* og fundet, at det er en uspecifik fosfodiesterase, der kan spalte både enkelt- og dobbeltstrenget DNA og RNA. Produkterne er fortrinsvis di-, tri- og tetranukleotider med terminalt fosfat ved 5'-positionen. pH-optimum ligger mellem 7 og 10, og temperaturoptimum er 30°C. Enzymet kræver  $Mg^{++}$  joner eller  $Mn^{++}$  joner for at virke. Enzymproduktionen stiger under celle-væksten og når et toppunkt lige efter at den stationære fase er indtrådt. Ved opvarmning til 44°C og derover reduceres enzymaktiviteten, således at al aktivitet er væk efter 40 minutters forløb.

Der findes mange metoder til påvisning af nukleaseaktivitet. En metode, der hyppigt anvendes af biokemikere, er at måle ændringen i en DNA-opløsnings lysabsorption ved 260 nm. Denne metode er baseret på, at opløsninger af nukleinsyrer på grund af de parrede purin- og pyrimidinbaser absorberer det ultraviolette lys med absorptionsmaximum ved 260 nm.

De fleste biokemiske metoder er for besværlige i det daglige mikrobiologiske arbejde, så det var et fremskridt, da Jeffries et al. i 1957 beskrev en agar-metode, som kunne bruges i ethvert bakteriologisk laboratorium. Den bygger på, at uspaltet DNA præcipiteres af syre, mens oligonukleotiderne, der fremkommer efter spaltningen, er opløselige i syre. Den kultur, der skal undersøges, stryges ud i en stribe midt på en agarplade, som indeholder DNA. Efter inkubering 1-2 døgn flydes pladen med 1 N HCl, og en positiv reaktion viser sig ved en klar zone omkring kolonierne, mens resten af pladen er uklar.

I 1969 beskrev Schreier en modifikation af denne metode, idet hun satte toluidinblåt til agaren. Dette var allerede tidligere forsøgt af Streitfeld et al. i 1962 ved undersøgelse af DNase-produktion hos pseudomonader. Uspaltet DNA farves blåt med toluidinblåt, hvorimod det spaltede DNA farves meta-kromatisk og giver en lyserød farve. Fordelen ved denne metode er, at inkubationstiden kan forlænges efter behov, og at man kan subkultivere fra pladen

efter at reaktionen er aflæst. En ulempe er, at toluidinblåt hæmmer grampositive bakterier, således at streptokokker og stafylokokker har svært ved at vokse på pladen.

Dette problem blev løst af Lachica og medarbejdere (1971a, b, 1972) ved indførelse af en direkte enzymtest, hvor udstansede huller i toluidinblåt-agaren blev fyldt med kulturen, der skulle undersøges. Denne prøve kan aflæses allerede efter 2–4 timer og har den store fordel, at kulturen kan opvarmes, inden den fyldes i hullet, dvs. at man kan teste for varmemestabil DNase.

En anden metode, med inkorporering af et farvestof i mediet, blev angivet af Smith et al. i 1969. De anvendte metylgrønt på grundlag af Kurnick's observationer (1950), der går ud på, at metylgrønt forbinder sig med uspaltet DNA og danner et grønt kompleks; ved spaltning af DNA afgives metylgrønt igen og bliver farveløst ved den anvendte pH. Dette medium hæmmer ikke grampositive bakterier.

Wolf et al. (1969) har benyttet det farveløse 5-bromo-4-kloro-3-indolyl-thymin-3'-fosfat som substrat i stedet for DNA. Ved spaltning frigøres en uopløselig blågrøn indigoforbindelse.

Fluorescensmetoder med acridin-orangeargar er angivet af Lanyi & Lederberg (1966) og Lachica & Deibel (1969).

En hurtig og direkte metode baseret på viskositetsændring af DNA, når det påvirkes af DNase, er i 1976 beskrevet af Greenwood & Pickett.

### 3. Valg af metode

Jeffries' metode har i flere år været anvendt på Serumintituttet. Det er en praktisk og nem metode, men har den væsentlige ulempe, at man ikke kan skelne mellem varmelabile og varmemestabile DNaser. Til dette formål bør man anvende Lachica's direkte enzymmetode, hvor kulturene kan opvarmes, inden de anbringes i hullerne.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### A. Jeffries' plademethode

##### *Substrat*

Oksebouillonagar	100 ml
4% DNA-opløsning	5 ml
20 ml ophædles i 9 cm petriskåle, hvis låg er mærket DNA.	

*Reagens:* 1N HCl.

*Udførelse:* Pladen tilsås med en enkelt stribe af den pågældende bakterie. Flere bakterier kan undersøges på samme plade. Pladen inkuberes 1–2 døgn ved 35°C, overhældes derefter med 1N HCl og aflæses efter 15–20 minutter.

*Aflæsning og fortolkning:* En positiv prøve viser sig ved, at agaren vedbliver at være klar i en zone omkring kolonierne, mens resten af pladen bliver uklar. Det kan være nødvendigt at skrabe kolonierne væk ved svag DNase-produktion for at kunne se den klare zone.

#### *B. Lachica's direkte enzymmetode*

*Substrat* (Lachica et al. 1971b, 1972)

Trisbuffer (0,05M, pH 9,0)	100 ml
DNA (Difco)	0,03 g
CaCl <sub>2</sub> (0,01M)	0,1 ml
NaCl	1 g
Toluidinblåt (0,1M)	0,3 ml
Agar (Difco granuleret)	1 g

3,0 ml af det smeltede substrat anbringes på flade plastikplader, der måler 2,5 x 7,5 cm, hvilket giver et 1,6 mm tykt lag. Når agaren er stivnet, udstanses huller på 2 mm i diameter. Der er plads til 10 huller på hver plade.

*Udførelse:* Hullerne fyldes med 3 µl kultur fra varmebehandlede (15 minutters kogning) og ikke-varmebehandlede, udvoksede serumbouillon. Pladen inkuberes 2–4 timer ved 35°C.

*Aflæsning og fortolkning:* Udvikling af en lyserød farve omkring et hul betyder produktion af DNase. Størrelsen af den lyserøde zone giver et tilnærmet kvantitativt indtryk af DNase-dannelsen.

#### **5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Ingen særlige.

#### **6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion**

Ved udarbejdelse af listen er hentet oplysninger ikke blot fra Bergey's Manual, men også fra speciallitteraturen.

*Pseudomonas*: de fleste *P. aeruginosa*

*Alcaligenes*: enkelte stammer

*Serratia*: næsten alle stammer

*Proteus*: nogle *P. vulgaris*

*Erwinia uredovora*

*Vibrio*: de fleste stammer (baseret på et enkelt arbejde)

*Aeromonas*: de fleste *A. hydrophila*

*Branhamella catarrhalis*

*Staphylococcus*: de fleste *S. aureus* danner varmemestabil nuklease; nogle stammer af *S. epidermidis* danner varmelabil nuklease.

*Streptococcus*: alle gruppe A streptokokker samt nogle stammer fra andre grupper.

*Bacillus*: *B. subtilis* danner RNase.

*Clostridium*: *Cl. perfringens*, *Cl. septicum* og *Cl. chauvoei*.

*Corynebacterium*: alle toksindannende *C. diphtheriae* (baseret på eet arbejde).

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven har fundet størst anvendelse inden for diagnostikken af stafylokokker. Mange forfattere har fundet god korrelation mellem koagulase- og DNase-produktion, og man har benyttet testen til at identificere patogene stafylokokker specielt til at finde de *S. aureus*, som ved mutation er blevet koagulase-negative. Da mange *S. albus* danner nuklease, der er varmelabil, har prøven kun værdi, hvis man samtidig undersøger enzymets varmemestabilitet.

Her ud over kan DNase-prøven være en hjælp ved diagnosticeringen af atypiske *Serratia*-stammer, hvor en positiv DNase-test kan understøtte diagnosen.

Om prøven kan anvendes til at bestemme difteribakteriers evne til toksindannelse, kan ikke siges med sikkerhed, idet kun et enkelt russisk arbejde foreligger. En bekræftelse ville betyde en værdifuld praktisk forenkling af undersøgelsen for difteribakteriers evne til toksindannelse.

## 8. Referencer

- Abramson, C.: Staphylococcal enzymes. In: Cohen, J.O. (ed.): The Staphylococci. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1972, p. 187.
- Araki, T.: Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure. Z. physiol. Chem. 38: 84, 1903.
- Avery, T.O., MacLeod, C.M. & McCarty, M.: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, J. exp. Med. 79: 137, 1944.

- Blazevic, D.J.: Identification of *Serratia* in the diagnostic microbiology laboratory. *Amer. J. clin. Path.* 51: 277, 1969.
- Brown, A.L.: A survey of nuclease production by streptococci. *J. Bact.* 60: 673, 1950.
- Cunningham, L., Catlin, B.W. & Privat de Garilhe, M.: A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. *J. Amer. chem. Soc.* 78: 4642, 1956.
- Cunningham, L.: Micrococcal nuclease and some products of its action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 81: 788, 1959.
- DiSalvo, J.W.: Desoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Techn. Bull.* 9: 191, 1958.
- Dornbusch, K., Nord, C.-E., Olsson, B. & Wadström, T.: Some properties of coagulase-negative deoxyribonuclease-producing strains of staphylococci from human infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 162: 143, 1976.
- Erickson, A. & Deibel, R.H.: Production and heat stability of staphylococcal nuclease. *Appl. Microbiol.* 25: 332, 1973.
- Frank, J.J., Hawk, I.A. & Levy, C.C.: Polyamine activation of staphylococcal nuclease. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 390: 117, 1975.
- Gray, E.D.: Nucleases of group A streptococci. In: Wannamaker, L.W. & Matsen, J.M. (eds): *Streptococci and Streptococcal Diseases. Recognition, Understanding, and Management.* Acad. Press, New York, 1972, p. 143.
- Greenwood, J.R. & Pickett, M.J.: Deoxyribonuclease: Detection with a three-hour test. *J. clin. Microbiol.* 4: 453, 1976.
- Griffith, F.: The significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (Lond.)* 27: 113, 1928.
- Iwanoff, L.: Über die fermentative Zersetzung der Thymonucleinsäure durch Schimmelpilze. *Z. physiol. Chem.* 39: 31, 1903.
- Jeffries, C.D., Holtman, D.F. & Guse, D.G.: Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bact.* 73: 590, 1957.
- Kossel, A.: Ueber das Nuclein der Hefe. *Z. physiol. Chem.* 4: 290, 1879.
- Kossel, A.: Weitere Beiträge zur Kenntniss der Nucleinsäure. *Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt.* 1894, p. 194. *Verh. physiol. Ges. Berlin.*
- Kurnich, N.B.: The determination of desoxyribonuclease activity by methyl green; application to serum. *Arch. Biochem.* 29: 41, 1950.
- Lachica, R.V.F. & Deibel, R.H.: Detection of nuclease activity in semisolid and broth cultures. *Appl. Microbiol.* 18: 174, 1969.
- Lachica, R.V.F., Weiss, K.F. & Deibel, R.H.: Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 18: 126, 1969.
- Lachica, R.V.F., Hoeprich, P.D. & Genigeorgis, C.: Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.* 21: 823, 1971a.
- Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D.: Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* 21: 585, 1971b.
- Lachica, R.V.F., Hoeprich, P.D. & Franti, C.E.: Convenient assay for staphylococcal nuclease by the metachromatic well-agar-diffusion technique. *Appl. Microbiol.* 24: 920, 1972.
- Lanyi, J.K. & Lederberg, J.: Fluorescent method for the detection of excreted ribonuclease around bacterial colonies. *J. Bact.* 92: 1469, 1966.
- Liven, E.: Deoxyribonuclease production by leptospire. *Acta vet. scand.* 16: 477, 1975.

- McCarty, M.: The occurrence of nucleases in culture filtrates of group A hemolytic streptococci. *J. exp. Med.* 88: 181, 1948.
- McCarty, M.: The inhibition of streptococcal desoxyribonuclease by rabbit and human antisera. *J. exp. Med.* 90: 543, 1949.
- McCarty, M. & Avery, O.T.: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. III. An improved method for the isolation of the transforming substance and its application to pneumococcus Types II, III, and IV. *J. exp. Med.* 83: 97, 1946.
- Martin, W.J. & Ewing, W.H.: The desoxyribonuclease test as applied to certain gram-negative bacteria. *Canad. J. Microbiol.* 13: 616, 1967.
- Messinova, O.V., Yusupova, D.V. & Shamsutdinov, N.S.: Desoxyribonuclease activity of *Corynebacterium* and its relation to virulence. *Fed. Proc.* 22: T1033, 1963.
- Miescher, F.: Die histochemische und physiologische Arbeiten. Leipzig 1897.
- Nestle, M. & Roberts, W.K.: An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J. biol. Chem.* 244: 5213, 1969a.
- Nestle, M. & Roberts, W.K.: An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. II. Specificity of the enzyme. *J. biol. Chem.* 244: 5219, 1969b.
- Oakley, C.L. & Warrack, G.H.: The ACRA test as a means of estimating hyaluronidase, desoxyribonuclease and their antibodies. *J. Path. Bact.* 63: 45, 1951.
- Plenge, H.: Über die a-nucleinsaures Natron lösende Wirkung einiger Microorganismen. *Z. physiol. Chem.* 39: 190, 1903.
- Princewill, T.J.T. & Oakley, C.L.: The desoxyribonucleases and hyaluronidases of *Clostridium septicum* and *Cl. chauvoei*. I. An agar plate method for testing for desoxyribonuclease. *Med. Lab. Technol.* 29: 243, 1972.
- Rothberg, N.W. & Sartz, M.N.: Extracellular desoxyribonucleases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Bact.* 90: 294, 1965.
- Salkowski, E.: Ueber Autodigestion der Organe. *Z. klin. Med.* 17: 77, Suppl. 1890.
- Schreier, J.B.: Modification of desoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. *Amer. J. clin. Path.* 51: 711, 1969.
- Schutzenberger, P.: Faits pour servir a l'histoire de la levûre de bière. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 78: 493, 1874.
- Smith, P.B., Hancock, G.A. & Rhoden, D.L.: Improved medium for detecting desoxyribonuclease-producing bacteria. *Appl. Microbiol.* 18: 991, 1969.
- Streitfeld, M.M., Hoffmann, E.M. & Janklow, H.M.: Evaluation of extracellular desoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. *J. Bact.* 84: 77, 1962.
- Tillett, W.S., Sherry, S. & Christensen, L.R.: Streptococcal desoxyribonuclease: Significance in lysis of purulent exudates and production by strains of hemolytic streptococci. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* 68: 184, 1948.
- Wanamaker, L.W.: The differentiation of three distinct desoxyribonucleases of group A streptococci. *J. exp. Med.* 107: 797, 1958.
- Warrack, G.H., Bidwell, E. & Oakley, C.L.: The beta-toxin (desoxyribonuclease) of *Cl. septicum*. *J. Path. Bact.* 63: 293, 1951.
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C.: A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature (Lond.)* 171: 737, 1953.
- Weckman, B.G. & Catlin, B.W.: Desoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J. Bact.* 73: 747, 1957.

- Wilkins, M.H.F., Stokes, A.R. & Wilson, H.R.: Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature (Lond.)* 171: 738, 1953.
- Wolf, P.L., Horwitz, J., Mandeville, R., Vazquez, J. & von der Muehl, E.: A new and unique method for detecting bacterial deoxyribonuclease in the clinical laboratory. *Amer. J. clin. Path.* 51: 663, 1969.

# **Undersøgelser ved brug af antibiotika**



## *Kapitel 38*

# **Alment om antibiotika og måling ved hjælp af agardiffusionsmetoden**

Kapitlerne i dette afsnit er udarbejdet i nært samarbejde med overlæge Jørgen Bang, antibiotikaafdelingen

### **1. Historisk indledning**

De første antimikrobielle kemoterapeutika, der kendes, er naturprodukter fra planter (i dette kapitel bruges udtrykket antibiotika om alle antimikrobielle kemoterapeutika). Sådanne produkter har været anvendt på empirisk grundlag i århundreder, indtil isolering og renfremstilling af de aktive stoffer påbegyndtes i 1817–20 med renfremstillingen af emetin fra ipecacuanharod og kinin fra cinchona-bark (Pelletier & Caventou fra Paris). Ipecacuanharod anvendtes af de indfødte i Brasilien til behandling af amøbedysenteri før Columbus opdagede Amerika, og cinchonabark havde være brugt til behandling af malaria i lange tider.

Med erkendelsen i sidste fjerdedel af forrige århundrede (Pasteur, Koch og deres elever) af, at mange sygdomme skyldtes mikroorganismer, var grunden lagt for en rationel anvendelse af desinfektionsmidler til sygdomsforebyggelse og -bekæmpelse. Desinfektionsmidler var på det tidspunkt den tekniske betegnelse for alle slags antimikrobielle stoffer. De grundlæggende metoder til bedømmelse af desinfektionsmidlers hæmmende eller dræbende effekt på mikroorganismer *in vitro* og *in vivo* udvikledes af Koch i 1881, og i årene derefter undersøgte von Behring en mængde forskellige desinfektionsmidlers effekt *in vitro* og *in vivo* ved at indsprøjte disse midler på inficerede forsøgsdyr. Disse terapeutiske forsøg faldt dog skuffende ud, da de anvendte midler enten var for giftige eller kun havde ringe eller ingen kurativ virkning (von Behring 1890).

En ny rationel æra indledtes, da kemoterapiens fader, Ehrlich (Guttman & Ehrlich 1891) med god effekt anvendte et farvestof, metylenblåt, til behandling af to patienter med malaria. Baggrunden var, at dette stof var parasitotropt, idet det kunne farve malariaparasitter *in vitro*, og at Ehrlich fra sit arbejde med metylenblåt vidste, at det ikke var toksisk og at det farvede blodlegeme-inklusioner *in vivo*. Fra Ehrlich og medarbejdere udgik der kort efter århundredskiftet en række arbejder om syntetiske kemoterapeutika fremstillet ud fra farvestoffer og arsenforbindelser (de gik ud fra det af englænderen Thomas og hans medarbejder Breinl (Thomas 1905) indførte ret

toksiske arsenik-derivat, atoxyl, som var virksomt over for trypanosomer). I 1910 og i årene derefter kronedes Ehrlich og medarbejderes arbejde med held ved udviklingen af stofferne salvarsan og neosalvarsan, som var virksomme over for bl.a. syfilis og trypanosomiasis.

Det næste store fremskridt på kemoterapiens område kom i 1930'erne. Omkring 1932 syntetiserede tyskerne Mietzsch og Klarer prontosil blandt flere andre azo-forbindelser, og i 1935 viste deres landsmand Domagk, at dette stof, som ingen bakteriehæmmende effekt havde in vitro, kunne helbrede eller forebygge eksperimentel streptokokinfektion hos mus og kaniner. Tréfouël et al. (1935) på Institut Pasteur i Paris påviste, at prontosils aktivitet in vivo skyldtes sulfanilamid, som fraspaltes fra prontosil i organismen. Hermed var sulfonamiderne introduceret i infektionsbekæmpelsen som de første stoffer med aktivitet over for en række af de mest frygtede pyogene mikroorganismer. Domagk's indsats belønnedes med Nobel-prisen i 1939.

I 1929 havde Fleming påvist et nyt antibiotikum, penicillin, som produceredes af en skimmelsvamp og havde antibakteriel aktivitet over for en lang række, fortrinsvis grampositive bakterier. En metode til fremstilling af penicillin i større mængde samt stoffets terapeutiske effekt på eksperimentelle dyreinfektioner og på infektionssygdomme hos mennesker blev beskrevet af en gruppe forskere fra Oxford (Chain et al. 1940; Abraham et al. 1941), og i 1945 fik Fleming, Florey og Chain Nobel-prisen for deres indsats. Streptomycin og en lang række andre antibiotika blev isoleret ved systematiske undersøgelser af jordbunds bakterier i Waksman's laboratorium ligeledes i 1940'erne, og Waksman fik i 1952 Nobel-prisen for opdagelsen af streptomycinet i 1944. Kloramfenikol opdagedes i 1947 af forskere ved Parke, Davis & Co. Laboratorierne, hvoriblandt J. Ehrlich, P.R. Burkholder og D. Gottlieb, og klortetracyclin i 1948 af forskere (bl.a. Duggar) ved Lederle Laboratorierne (cit. fra Lechevalier & Solotorovsky 1974). Siden er yderligere en lang række effektive antibiotika blevet opdaget eller syntetiseret.

Allerede kort tid efter introduktionen af antibiotika viste det sig i klinikken, at der kunne opstå resistente mutanter af ellers følsomme arter (se fx. Maclean et al. 1939; Abraham & Chain 1940; Gallardo 1944), og senere erfaringer har til fulde bekræftet den kliniske betydning af resistensudvikling over for de til rådighed stående antibiotika. Der opstod derfor ret snart et krav om hurtig bestemmelse af en isoleret mikroorganismes følsomhed for et givet antibiotikum (se fx. Maclean et al. 1939) og om bestemmelse af antibiotikum-koncentrationen (aktivitet) dels som led i produktionskontrollen dels i serum og andre legemsvæsker og væv under kemoterapi, med henblik på farmakokinetiske studier (se fx. Marshall et al. 1937). Tidligt havde man erkendt, at der var god overensstemmelse mellem en bakteriestammes følsomhed over for

et antibiotikum in vitro målt som den minimale inhibitoriske koncentration (MIC), blod- og vævskoncentrationen af stoffet og den terapeutiske effekt (se fx. Marshall et al. 1937; Felke 1939; Reymann & Schmith 1942). Med indførelse af mere toksiske stoffer som fx. aminoglykosiderne til klinisk brug steg behovet yderligere for måling af antibiotikumkoncentrationen i serum med henblik på at opnå effektive, men ikke toksiske koncentrationer af det givne antibiotikum under kemoterapi (såkaldt styret kemoterapi), især hos patienter med nedsat udskillelse af stofferne fx. på grund af nyreinsufficiens.

De metoder, man anvendte til bestemmelse af en mikroorganismes følsomhed over for et givet antibiotikum, var oprindeligt udviklet til brug for bedømmelse af desinfektionsmidlers effekt (Koch 1881; von Behring 1890) og til undersøgelse af serums bakteriehæmmende og -dræbende effekt (Nutall 1888; Buchner 1889). Man rådede på det tidspunkt over to hovedmetoder: (1) Tilsætning af desinfektionsmidlet til en tilsæt flydende kultur og påvisning af væksthæmning under efterfølgende inkubation og påvisning af drab ved hjælp af subkulturer. (2) Terapiforsøg med desinfektionsmidler ved eksperimentelle dyreinfektioner. Disse metoder benyttedes til bedømmelse af kemoterapeutikas effekt på trypanosomer (Laveran & Mesnil 1902; Ehrlich & Shiga 1904) og videreudvikledes under Ehrlich og medarbejderes systematiske arbejde med kemoterapeutika og kemoterapi, hvor metoderne også anvendtes til bedømmelse af effekten på bakterier (se fx. Bechhold & Ehrlich 1906; Ehrlich & Gonder 1913, 1914; Gotschlich 1913). Endnu en metode, som kendes fra resistensbestemmelse og koncentrationsbestemmelse af antibiotika, nemlig agar-cup-diffusionsmetoden, blev først anvendt til undersøgelse af lysozym i vævsvæsker og sekreter (Fleming 1922) og af desinfektionsmidler (Reddish 1929; Ruehle & Breever 1931; Rose & Miller 1939a).

I sit første arbejde om penicillin anvendte Fleming (1929) flere metoder til at måle penicillinaktiviteten over for forskellige mikroorganismer: (1) En agardiffusionsmetode hvor han udskar en grøft i agaren og fyldte den med smeltet agar indeholdende det aktive stof. Ved at udså bakterier vinkelret på grøften kunne han efter inkubering iagttage en væksthæmningszone og efter yderligere inkubering en lyse af den nærmestliggende vækst.. Han brugte hæmningszonens størrelse som udtryk for mikroorganismens følsomhed over for penicillin. (2) Ved hjælp af en række bouillonkulturer med stigende koncentration af penicillin kunne han mere præcist udtitrere penicillinets hæmmende (bakteriostatiske) effekt. (3) Ved at subkultivere fra glassene i sådanne rækker af bouillonkulturer på bestemte tidspunkter kunne han tælle overlevende bakterier og få et udtryk for den bakteriedræbende (baktericide) effekt. Senere fremhævede Fleming (1938) dog, at på grund af legemets egne forsvarsmekanismer er det tilstrækkeligt at måle den bakteriostatiske effekt ved

bedømmelse af kemoterapeutiske midler. Fortyndinger i bouillon eller agar til bestemmelse af bakteriers følsomhed over for sulfonamid introduceredes i Danmark af Sindbjerg-Hansen (1940) og Schmith & Reymann (1940).

Colebrook et al. (1936b) og senere Fleming (1938) lavede semikvantitative bestemmelser af sulfonamid i blod ved hjælp af Wright's (1923) "slide cell" teknik (mikrodyrkningsteknik i små kamre mellem to objektglas), som oprindeligt var udviklet til at bestemme serum og leukocytters bakteriehæmmende aktivitet, men som Fleming allerede i 1924 havde anvendt til undersøgelse af antiseptika.

Fuller fra London (1937) og uafhængigt heraf Marshall et al. i USA (1937) udviklede en kemisk metode til bestemmelse af sulfonamid i blod og urin byggende på en kolorimetrisk påvisning af et rødt farvestof, der fremkommer ved en diazoreaktion med sulfonamid. En modifikation heraf (Bratton & Marshall, 1939) bruges stadig i antibiotika-afdelingen til måling af sulfonamider i fx. serum. I Danmark angav Lundsteen et al. (1938) en mikrometode, der byggede på Marshall's teknik, til måling af sulfonamid.

Mange af disse metoder til resistensbestemmelse og koncentrationsmåling var dog temmelig besværlige at arbejde med i praksis, så det var et yderligere fremskridt, da Abraham et al. i 1941 i deres klassiske arbejde over penicillin beskrev en forbedret agardiffusionsmetode, den såkaldte Oxford cup-metode, til måling af penicillin i serum og andre væsker. De benyttede glascylindre sat oven på agaren som depot for væskerne, og foruden den ukendte prøve anvendtes en standardrække. I princippet og med kun små ændringer er det den metode, der i dag anvendes til resistensbestemmelser og koncentrationsmålinger. Metoden er nærmere beskrevet af et medlem af Oxford-gruppen (Heatley 1944) med angivelse af prædiffusionsprincippet og beskrivelse af en hurtigere modifikation, som tilskrives Pope. Pope anvendte en hurtigtvoksende *B. subtilis*, der tillod bestemmelse af penicillinkoncentrationen på 4-5 timer. I stedet for at bruge en cup anbragt oven på agaren introduceredes snart en række andre former for depoter: hul i agaren (se Fleming 1942), filtrerpapirdiscs (Dawdy et al. cit. af Foster & Woodruff 1943a; Vincent et al. 1944), en dråbe anbragt oven på agaren (Hagerman 1942; Thomas et al 1944) og tabletter indeholdende antibiotika (Hoyt & Levine 1947).

I Skandinavien blev agar-hulmetoden først beskrevet i 1945 af K.A. Jensen (Jensen et al. 1945), som selv under krigen havde isoleret en penicillin-producerende skimmelsvamp og iværksat en penicillinproduktion i samarbejde med Løvens Kemiske Fabrik. Metoden var udarbejdet uden kendskab til Flemings artikel om agar-hulmetoden fra 1942 og vandt udbredelse også i Sverige (Sievers 1948). En række disputatsarbejder om penicillin, bl.a. omhandlende

koncentrationsmålinger og resistensbestemmelser og lignende udgik i årene herefter fra K.A. Jensens institut (Vesterdal 1947; Dragsted 1949; Brodersen 1949; Espersen 1951; Staun 1959; Eriksen 1965; Dons 1966).

Foruden agardiffusionsmetoden anvendtes bouillonfortyndingsmetoden (Rammelkamp 1942) til måling af penicillinaktiviteten og turbidimetri (Foster 1942) til måling af penicillins hæmmende effekt under bakterievækst i bouillon samt en række kemiske metoder (Murtaugh & Levy 1945; Alcino 1946; Herriott 1946; Scudi 1946; Scudi & Jelinak 1946) til påvisning af penicillin. Men i overensstemmelse med Fleming's (1942) og Foster & Woodruff's (1943a, 1944) kritiske metodegennemgang og standardiseringsarbejder blev agardiffusionsmetoden den klinisk mest anvendte.

Den teoretiske baggrund for zonedannelsen ved diffusionsmetoderne udvikledes i England (Cooper & Woodman 1946) og uafhængigt heraf i Danmark (Vesterdal 1947a, b) og er siden yderligere blevet belyst af en række forskere (Michison & Spicer 1949; Erlandson 1951; Cooper & Linton 1952; Cooper & Gillespie 1952; Humphrey & Lightbown 1952; Bang 1955, 1970a, b; Linton 1958, 1961; Cooper et al. 1958; Cooper 1963).

Et vigtigt bidrag til at øge resistensbestemmelsens kliniske anvendelighed er ydet af Ericsson og medarbejdere. De indførte i 1954 den semikvantitative resistensbestemmelse, hvor zonestørrelsen for en række stammer korreleres med deres MIC-værdier over for samme antibiotikum bestemt ved pladefortyndingsmetoden, og grundlaget for den kliniske tolkning fastlagdes ved sammenligning med de serum- og vævskoncentrationer, der forventedes opnået med det pågældende antibiotikum ved normal terapeutisk dosis (se Ericssons disputats 1960).

Som det fremgår, udvikledes metoderne til koncentrationsbestemmelse (= aktivitetsbestemmelse) og resistensbestemmelse ved hjælp af agardiffusion næsten sideløbende i 1940'erne, da de byggede på samme principper. Mens resistensbestemmelsen allerede fra sidste halvdel af 1940'erne fik praktisk betydning i klinikken, så blev koncentrationsbestemmelserne først og fremmest brugt til at bestemme antibiotikas farmakokinetik i grundlæggende arbejder og til aktivitetsbestemmelse af antibiotika under og efter produktionen. Den praktiske betydning af koncentrationsbestemmelse i klinikken kom først 10-15 år senere, specielt med indførelsen af de nye aminoglykosider som fx. gentamycin.

## 2. Fysisk og biologisk baggrund for hæmningszonens dannelse ved agardiffusionsmetoden til resistensbestemmelse og koncentrationsmåling

### A. Diffusionsteori

At et opløst stof diffunderer skyldes, at de enkelte molekyler er underkastet Brownske bevægelser.

Vi forudsætter, at bevægelserne af de enkelte molekyler sker frit, uafhængigt af hinanden, i alle 3 dimensioner. Er der mange molekyler placeret indenfor et lille begrænset område, men med fri bevægelsesmulighed, vil resultanten af moleky尔bevægelserne være en udbredning fra steder med mange molekyler til steder med få eller ingen molekyler. Der vil herved etableres en *koncentrationsgradient* betinget af forskelle i koncentrationen mellem forskellige steder i agaren. Situationen findes f.eks., når en disc med antibiotikum anbringes på en agaroverflade og molekylerne begynder at trænge ud i agaren. Betragter vi to nabo-områder i agaren, det ene med mange, det andet med få molekyler, vil der per tidsenhed bevæge sig flere molekyler fra stedet med de mange til stedet med de få molekyler, end der i samme tidsrum vil bevæge sig i modsat retning. Sempelthen fordi der er flere det ene sted end det andet. Denne øgede afgang af molekyler i forhold til tilgangen benævnes ofte *diffusionstrykket*, og dette er større jo større forskel der er på koncentrationen af molekyler i de to nabo-områder.

Som følge af molekylarbevægelserne er al diffusion i princippet 3-dimensional. Når vi alligevel taler om både 1-, 2- og 3-dimensional diffusion, skyldes det, at vi kan fastlægge de eksperimentelle forhold, hvorunder diffusionen foregår således, at koncentrationsforskellen – eller koncentrationsgradienten – er ophævet i én eller to retninger. Nabopunkter har under disse forhold samme koncentration og udveklser blot molekyler.

Dette er f.eks. tilfældet ved *agar-cup metoden*, hvor et hul i hele pladens tykkelse fyldes helt med antibiotikumopløsning. Diffusionen kan her beskrives som 2-dimensional, idet der ikke er koncentrationsgrader i retningen overflade-bund (op-ned).

Ved diffusion fra overfladen ned i en *agarsøjle* (reagensglas med agar overlejret med antibiotikumopløsning) ophæves koncentrationsgraderne indenfor agarsøjle's tværsnit-flade, dvs. i to retninger, og diffusionen kan beskrives som 1-dimensional.

Antibiotikum-molekylernes tidsmæssige fordeling i substratet beskrives af diffusionsligningen (Fick's 2. lov):

$$\frac{dC}{dt} = -D \cdot \frac{d^2C}{dx^2}$$

For 3-dimensional diffusion ser formlen således ud:

$$\frac{dC}{dt} = -D \left( \frac{d^2C}{dx^2} + \frac{d^2C}{dy^2} + \frac{d^2C}{dz^2} \right) \quad \text{ligning (1)}$$

Hvis der er tale om 2-dimensional eller 1-dimensional diffusion, reduceres udtrykket i parentesens tilsvarende. C er molekyltætheden i afstanden x, y, z i de tre dimensioner fra diffusionscentret, og D er diffusionskonstanten (se side 370). Ligningen udtrykker altså,

at diffusionshastigheden ( $\frac{dC}{dt}$ ) er proportional med koncentrationsgradienten og med stoffets diffusionskonstant. Fick's lov er en differentiaalligning og må til praktisk anvendelse integreres, og den form, den får, afhænger af de betingelser, hvorunder diffusionen finder sted (Thomsen 1967).

Der er angivet mange løsninger af Fick's ligning (1), og den af Vesterdal (1947a, b) anvendte kan udledes således iflg. Bang (upublicerede beregninger):

Ser vi først på det enkleste – den 1-dimensionale diffusion – hvor vi forudsætter molekylerne anbragt i punktet 0 til tiden 0, og alene med mulighed for at bevæge sig til begge sider i liniens retning, så vil vi til tiden T have en fordeling langs denne, der vil vise en høj koncentration omkring udgangspunktet faldende til begge sider – nøje svarende til den klokkeformede Gausske fordeling eller den normale fordeling (fig. 1). Med stigende tid vil kurven flade mere og mere af. Denne effekt vil fremskyndes, hvis molekylerne bevæger sig hurtigt.

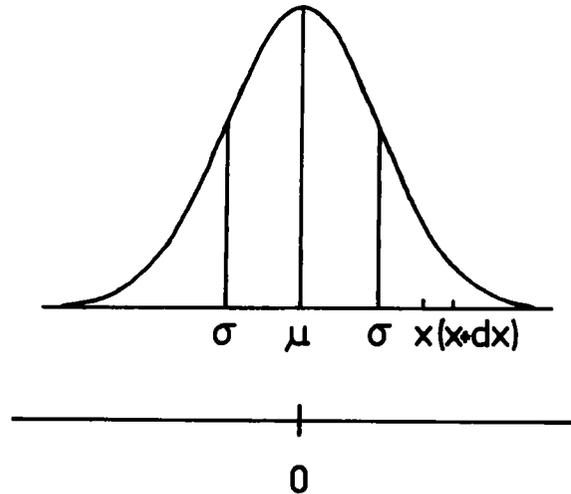


Fig. 1. 1-dimensional diffusion ud fra punktet 0 på den nederste linie. Koncentrationen af molekylerne til tiden T efter diffusionens start er angivet ved den klokkeformede kurve ovenover linien, med koncentrationen af det diffunderende stof afsat ud ad ordinaten og afstanden fra startpunktet afsat ud ad abscissen (Gauss' normalfordelingskurve med middelværdien  $\mu$  og spredningen  $\sigma$ , se iøvrigt teksten).

Formlen for kurven i fig. 1 er:

$$F(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

hvor  $\mu$  er middelværdien og  $\sigma$  spredningen.

En øget affladning betyder en øget spredning – dvs. kurvens 2 vendepunkter  $\sigma$  rykker længere og længere væk fra midten. Bestemmende for forløbet af denne affladning er tiden  $T$  og diffusionskonstanten  $D$ , og det kan vises, at spredningen er bestemt ved  $\sigma = \sqrt{2DT}$ .

Vi tænker os som nævnt molekyleerne anbragt til tiden 0 i punktet 0, og vil da have  $\mu = 0$  (koordinaten er jo 0 for punktet 0). Vi betragter derefter sandsynligheden for, at et molekyle efter tiden  $T$  befinder sig i et lille afsnit,  $dx$ , på  $x$ -aksen (fig. 2) i afstanden mellem  $x$  og  $x+dx$  fra 0 punktet. Denne sandsynlighed kan udtrykkes ved

$$\begin{aligned} F(x)dx &= \frac{1}{\sqrt{2DT} \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{x}{\sqrt{2DT}} \right)^2} \cdot dx \\ &= \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4DT}} \cdot dx \end{aligned} \quad \text{ligning (2)}$$

Bevæger molekyleerne sig *alene* i én retning vinkelret på den i fig. 1 tegnede, er den tilsvarende sandsynlighed for, at ét molekyle vil befinde sig i afstanden mellem  $y$  og  $y+dy$  på  $y$ -aksen (fig. 2) givet ved

$$F(y)dy = \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{y^2}{4DT}} \cdot dy \quad \text{ligning (3)}$$

Bevæger de sig *både* i retningerne  $x$  og  $y$  (altså i planet).

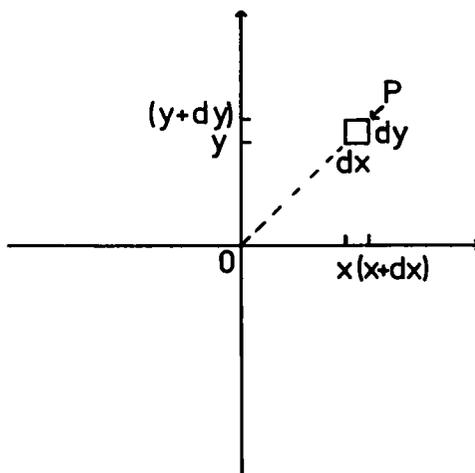


Fig. 2. 2-dimensional diffusion ud fra punktet 0 (se teksten).

er sandsynligheden for, at ét molekyle til tiden  $T$  befinder sig i det lille areal ( $dx \cdot dy$ ) givet ved en multiplikation af de to sandsynligheder (ligning 2) og (ligning 3) for at nå ud i henholdsvis  $dx$  og  $dy$  (fig. 2):

$$\begin{aligned} F(x)dx F(y)dy &= \left( \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4DT}} \right) \left( \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{y^2}{4DT}} \right) dx dy \\ &= \frac{1}{4\pi DT} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2}{4DT}} \cdot dx dy \end{aligned} \quad \text{ligning (4)}$$

Er der *tillige* tale om diffusion i retningen  $z$  vinkelret på planet (3-dimensionalt), ser vi på lignende måde at chancen for at ét molekyle til tiden  $T$  befinder sig i et lille volumen,  $dx \cdot dy \cdot dz$ , er

$$F(x)dx F(y)dy F(z)dz = \frac{1}{(\sqrt{4\pi DT})^3} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2+z^2}{4DT}} \cdot dx dy dz \quad \text{ligning (5)}$$

De hidtidige formler har udtrykt sandsynligheden for, at ét molekyle anbragt i 0 punktet til tiden 0 efter tiden  $T$  befinder sig henholdsvis i et lille område,  $dx$  omkring punktet  $x$ , eller  $dx \cdot dy$  omkring punktet  $(x, y)$  eller  $dx \cdot dy \cdot dz$  omkring punktet  $(x, y, z)$ .

Anbringer vi *mange* molekyler, f.eks.  $N = kC_0$  i udgangspunktet, vil formlerne udtrykke det *forventede* antal molekyler,  $N'$ , i de respektive områder, fx. vil ligning (4) under betingelserne for den 2-dimensionale diffusion få formlen:

$$N' = \frac{k \cdot C_0}{4\pi DT} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2}{4DT}} \cdot dx dy$$

hvilket betyder at vi kan forvente  $N'$  molekyler i det lille område  $dx \cdot dy$  omkring  $P$ , hvilket også kan skrives således:

$$C_p = \frac{N'}{dx dy} = \frac{k \cdot C_0}{4\pi DT} \cdot e^{-\frac{R^2}{4DT}} \quad \text{ligning (6)}$$

hvor  $C_p$  betegner koncentrationen i  $P$ ,  $k$  betegner arealet af hullet med radius  $r$ , hvori molekylerne fyldes ( $k = \pi r^2$ ) og  $x^2 + y^2 = R^2$ , hvor  $R$  er afstanden fra begyndelsespunktet

(0,0) ud til punktet P med koordinaterne x,y (den stiplede linie i fig. 2).

Ligning (6) kan da omformes til:

$$\frac{C_p}{C_0} = \frac{r^2}{4DT} \cdot e^{-\frac{R^2}{4DT}} \quad \text{ligning (7)}$$

Dette er udtrykket for diffusionsformlen ved den 2-dimensionale diffusion – og den kan anvendes på agar-cup metoden. Det skal dog nævnes, at vi hele tiden har forudsat, at molekylerne fra starten var anbragt i et *punkt* – det er ikke praktisk muligt – vi anbringer en bestemt mængde af en kendt koncentration ( $k \cdot C_0 = \pi r^2 C_0$ ) hvilket er et udtryk for antallet af molekyler, men vi har samtidig *ikke* korrigeret for hullets udstrækning.

(En sådan korrektion kan iøvrigt foretages ved at forøge T med en størrelse  $t_0 = \frac{r^2}{8D} =$  ca. 1 time – afhængig af stof (D) og agar-cup (r) – forklaringen på denne korrektion er at man kan betragte anbringelsen i en agar-cup som svarende til fordelingen efter ca. 1 times diffusion fra et punkt. Ligning (13) side 371 vil efter en sådan korrektion få formen:  $T = t_0 + L + P + n'G$ .)

Ligning (7) er udtrykket for *den rene diffusion* hvor  $C_p$  er koncentrationen i punktet P, beliggende i afstanden R fra diffusionscentrum, og T tiden fra diffusionens start til  $C_p$  er nået ud i afstanden R. Udfra ligning (7) kan vi anskueliggøre hvorledes et antibiotikum diffunderer ud i agaren fra et depot:

Anbringes et depot af antibiotikum på en agaroverflade eller i et hul i agaren, vil der ske en diffusion af antibiotikum ud i den tilgrænsende agar. Straks efter diffusionens begyndelse vil der være en høj koncentration af antibiotikum i agaren nærmest ved depotet og en meget lav koncentration lidt længere ude i agaren og slet intet antibiotikum herudenfor (stejl koncentrationsgradient). Noget senere vil antibiotikum være diffunderet længere ud i agaren, og koncentrationsgradienten vil være mindre stejl, idet koncentrationen nærmest depotet begynder at falde. Til slut, når depotet er udtømt, vil antibiotikum være fordelt med en ligelig koncentration i hele agaren.

I fig. 3A er angivet *koncentrationsgradienterne* fra depotet ud i agaren på forskellige tidspunkter efter diffusionens start ( $T_1$  lige efter starten,  $T_3$  efter flere timers diffusion). Det ses, at koncentrationsgradienten bliver fladere og fladere med tiden. I fig. 3B er *koncentrationsændringerne* i agaren i forskellige afstande fra depotet ( $R_1$  tæt ved,  $R_8$  langt væk fra depotet) angivet som funktion af tiden efter diffusionens start. Det ses også her, at afstanden mellem punkter med en given koncentrationsforskel øges med diffusionstiden.

Når vi skal se på hæmningszonens dannelse, er forholdene imidlertid komplicerede af, at der foruden rent fysiske diffusionsprocesser foregår en samtidig vækst af bakterierne, som er en biologisk proces med betydelig større variabilitet end de fysiske faktorer, der bestemmer diffusionen. Det er *samspillet* mellem diffusion og vækst, der bestemmer hæmningszonens dannelse, idet væksten ophører, når bakterierne udsættes for en væksthæmmende koncentration (ikke nødvendigvis dræbende) af det diffunderende antibiotikum.

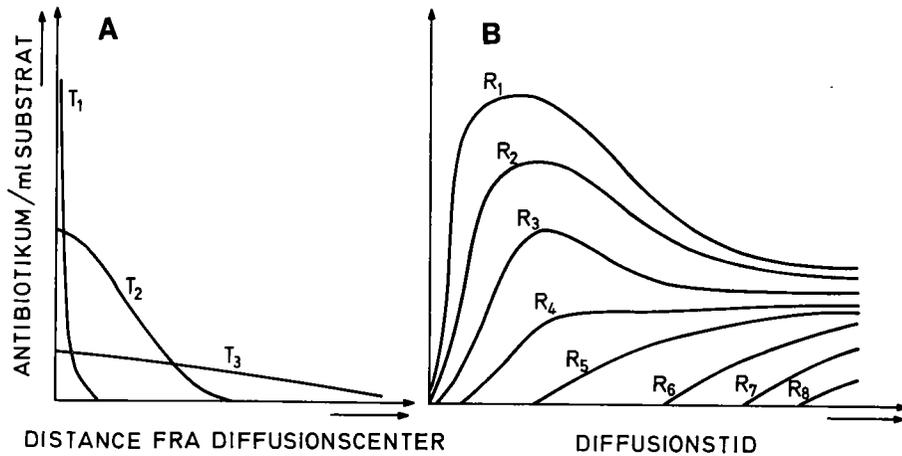


Fig. 3. A: Grafisk fremstilling af relationen mellem koncentrationen af antibiotikum/ml substrat og afstanden fra diffusionscenteret til forskellige tidspunkter – arbitrært angivet som  $T_1$ ,  $T_2$  og  $T_3$  (Gengivet efter Thomsen (1967)). B: Grafisk fremstilling af relationen mellem koncentrationen i substratets enkelte punkter og diffusionstiden. Kurverne angiver koncentrationens variation i arbitrært valgte punkter  $R_1$ ,  $R_2$  . . . . . ;  $R_1$  tænkes nærmest og de følgende punkter med tiltagende afstand fra depotet (gengivet efter Thomsen (1967)).

Vi må derfor først slå fast, at der eksisterer en vis *kritisk antibiotikumkoncentration* ( $C_c = MIC$ ), som lige netop hæmmer bakterievæksten. Dernæst gælder det, at zonegrænsens markering afhænger af et vist antal bakterier (bakterietæthed) på agaroverfladen (synlig vækst) = *det kritiske bakterietal*. Endelig gælder det, at det tager en vis tid, før der er dannet det kritiske bakterietal på agaroverfladen ud fra det udsåede inoculum (= *den kritiske tid*). Det vil sige, at zonedannelsen foruden af *diffusionen* er afhængig af det udsåede *inoculum's størrelse, lag-fasens længde, generationstiden* af stammen og dennes *MIC*.

Skal ligning (7) anvendes på hæmningszonen, må vi derfor først tolke de forskellige størrelser, der indgår i ligningen, idet vi nu foruden diffusionsprocessen også har at gøre med vækstprocessen.  $R$  vil indgå som mål for hæmningszonens radius,  $C_p$  er mål for den koncentration, der er ansvarlig for bakteriestammens hæmning i zoneranden ( $C_p = C_c$ ). I tidsfaktoren  $T$  indgår den tid, det tager det udsåede inoculum at vokse frem og markere zonedannelsen gennem dannelsen af en given vækstgrad (synlig vækst). Ligning (7) ser derefter således ud:

$$\frac{C_c}{C_0} = \frac{r^2}{4DT} \cdot e^{-\frac{R^2}{4DT}} \quad \text{ligning (8)}$$

Denne ligning er udarbejdet for en 2-dimensional diffusion, men er i praksis anvendelig på forholdene ved 3-dimensional diffusion under de her omtalte diffusionsbetingelser (se Thomsen 1967).

I ligning (8) er:

$C_0$  = koncentrationen i depotet ved diffusionens start

$C_c$  = den kritiske koncentration (= MIC)

$T$  = den kritiske tid

$R$  = afstanden fra centrum til stedet hvor  $C_c$  befinder sig til tiden  $T$  (hæmningszonen radius)

$r$  = depotets radius

$D$  = diffusionskonstanten

$e$  = den naturlige logaritmes grundtal = 2,718;  $\log e = 0,4343$

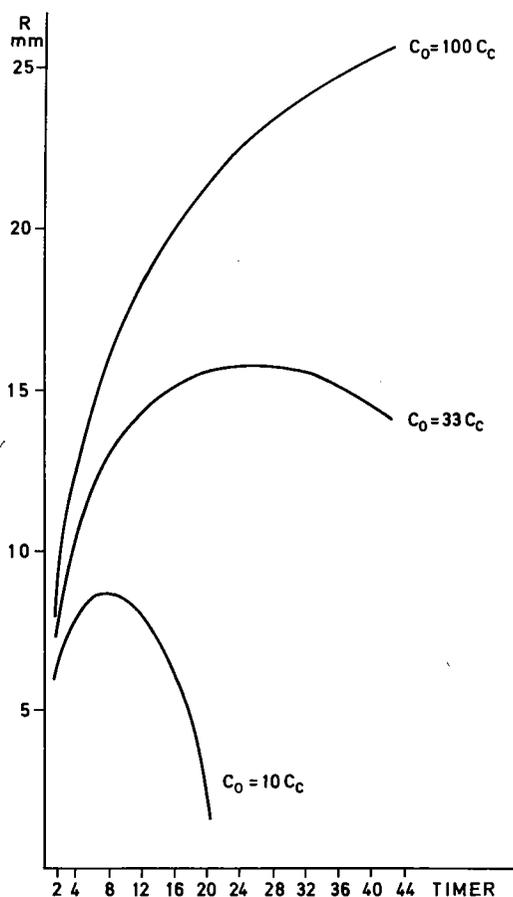


Fig. 4. Grafisk fremstilling af positionen (dvs. afstanden ( $R$ ) fra diffusionscentrum), af en given antibiotikumkoncentration ( $C_c = \text{MIC}$ ) i agaren til forskellige tider efter diffusionens start. Øverste kurve afbilder forholdene hvis antibiotikumkoncentrationen i depotet er  $100 \cdot \text{MIC}$  ( $C_0 = 100 \cdot C_c$ ). Midterste kurve svarer til en antibiotikumkoncentration i depotet på  $33 \cdot \text{MIC}$ , og nederste kurve svarer til en antibiotikumkoncentration på  $10 \cdot \text{MIC}$  (gengivet efter Bang, upublicerede resultater).

I fig. 4 er ligning (8) anvendt til at beregne den afstand hvori en given antibiotikumkoncentration ( $C_c = \text{MIC}$ ) befinder sig i agaren til forskellige tider efter diffusionens start. Hvis koncentrationen i depotet ( $C_o$ ) er  $100 \cdot C_c$  ( $C_c = \text{MIC}$ ), så vil MIC som en koncentrationsfront fortsat diffundere perifert ud i agaren i forsøgsperioden på knap 2 døgn, og de tidspunkter hvor MIC når forskellige punkter i agaren er angivet ved den øverste kurve på figuren. Hvis koncentrationen i depotet er  $33 \cdot \text{MIC}$ , så vil koncentrationsfronten efter ca. 1 døgn diffusion perifert ud i agaren "vende", idet koncentrationen falder perifert, så fronten nu bevæger sig centralt. Dette er angivet ved den midterste kurve. Dette er endnu mere udtalt hvis koncentrationen i depotet kun er  $10 \cdot \text{MIC}$ , idet MIC fronten efter ca. 8 timer "vender" og bevæger sig centralt. Dette er angivet ved den nederste kurve på figuren. Disse forhold har indflydelse på hæmningszonens skarphed. MIC-frontens "vending" betyder at MIC ligger praktisk taget stille (konstant) i en given afstand over en vis tid. Falder denne periode tidsmæssigt sammen med hæmningszonens markering (synlig vækst), bliver zonen skarpest. Også i denne figur ses det, at afstanden mellem punkter med en given koncentrationsforskel øges med diffusionstiden, og fig. 4 anskueliggør således også prædiffusionsprincippet fordelt, som det senere skal omtales nærmere (sml. med fig. 1 i kap. 39).

*Ligning (8) anvendt til resistensbestemmelse (regressionskurven)*

Såfremt depotets koncentration ( $C_o$ ) og radius ( $r$ ), den kritiske tid ( $T$ ) og diffusionskonstanten ( $D$ ) er faste størrelser i en forsøgsopstilling, vil måling af zonestørrelsen ( $R$ ) medføre, at den kritiske koncentration ( $C_c = \text{MIC}$ ) kan bestemmes ud fra ligning (8). Ved anvendelse af logaritmer bliver ligning (8) til:

$$\ln C_c - \ln C_o + \ln \left( \frac{4DT}{r^2} \right) = - \frac{R^2}{4DT}$$

eller:

$$\log C_c - \log C_o + \log \left( \frac{4DT}{r^2} \right) = - \frac{R^2}{4DT} \cdot 0,4343 \quad \text{ligning (9)}$$

( $\log e = 0,4343$ )

eller:

$$R^2 = - \frac{4DT}{0,4343} \cdot \log C_c + \frac{4DT}{0,4343} \left( \log C_o - \log \left( \frac{4DT}{r^2} \right) \right) \quad \text{ligning (10)}$$

dvs. i et semilogaritmisk koordinatsystem med abscissen =  $\log C_c$  (=  $\log \text{MIC}$ ) og ordinaten = kvadratet på hæmningszonens radius vil ligning (10) beskrive en ret linie ( $R^2 = \alpha \cdot \log$

(MIC) +  $\beta$ ) med hældningskoefficienten  $\alpha = -\frac{4DT}{0,4343}$ . Denne rette linie kaldes *regressionskurven*, og den fastlægges eksperimentelt for en række stammer ved bestemmelse af sam-hørende MIC-værdier og hæmningszoner (se kap. 39 side 379) og bruges derefter til at be- stemme en ukendt bakteriestammes følsomhed (MIC) over for et givet antibiotikum ved hjælp af eksperimentel zonestørrelsesbestemmelse efterfulgt af aflæsning på regressions- kurven. Det forudsættes, at den ukendte stamme undersøges under såvidt muligt de samme betingelser som dem, hvorunder regressionskurven er fastlagt. I stedet for MIC kan man an- vende IC<sub>50</sub>, som er den koncentration som hæmmer væksten 50%.

*Ligning (8) anvendt til koncentrationsbestemmelse (standardkurven)*

Såfremt den kritiske koncentration ( $C_c = \text{MIC}$ ), den kritiske tid ( $T$ ) og diffusionskonstanten ( $D$ ) er faste størrelser i en forsøgsopstilling, vil måling af zonestørrelserne ( $R$ ) for en række kendte og enkelte ukendte koncentrationer af et antibiotikum ( $C_0$ ) i depoter (med radius =  $r$ ) på samme plade muliggøre at de ukendte koncentrationer kan bestemmes ud fra lig- ning (8), idet man omformer den deraf afledte ligning (9) til følgende:

$$R^2 = \frac{4DT}{0,4343} \cdot \log C_0 - \frac{4DT}{0,4343} \left( \log C_c + \log \frac{4DT}{r^2} \right) \quad \text{ligning (11)}$$

dvs. i et semilogaritmisk koordinatsystem med  $\log C_0$  som abscisse og kvadratet på hæm- ningszonens radius som ordinat vil ligning (11) beskrive en ret linie  $R^2 = \alpha \cdot \log(\text{depo- tets antibiotikumkoncentration}) - \beta$  med hældningskoefficienten  $\alpha = \frac{4DT}{0,4343}$ . Denne rette linie kaldes *standardkurven*, og den bestemmes eksperimentelt for en kendt stamme med en række kendte  $C_0$ -værdier (dvs. en kendt fortyndingsrække). Hæmningszonerne for de ukendte opløsninger (fx. serum) aflæses og omsættes via standardkurven til koncentra- tionsværdier for prøverne (se kap. 40).

*B. Samspillet mellem diffusion og bakterievækst ved hæmningszonens dannelse*

Fig. 5 og 6 viser Bangs (1970a) opfattelse af hæmningszonens dannelse.

I fig. 5 er positionen af den kritiske koncentration ( $C_c = \text{MIC}$ ) af et antibiotikum over for en given bakteriestamme beregnet efter forskellig diffusionstid iflg. Vesterdal (1947a, b) (ligning (8)). Det ses, at  $C_c$  bevæger sig stadig langsommere perifert med tiden. På fig. 6A ses en almindelig eksponentiel vækstkurve, og på fig. 6B er tidsaksen transformeret til en af- standsakse, og det er beregnet hvor mange bakterie-generationer, der kan nå at fremkomme i de pågældende afstande ( $R_1$  til  $R_6$ ) fra diffusionscentrum, inden den kritiske koncentra- tion har nået det pågældende sted, og bakteriedelingen ophører. Da  $C_c$  bevæger sig stadigt langsommere perifert, fås et meget brat stigende antal bakterier i et bestemt, meget snævert område. Det vil sige, at der vil være en meget kort afstand mellem det sted på agaren, hvor inoculum-cellerne kun har delt sig få gange (makroskopisk usynlig vækst) før hæmningen indtræder, og til det sted hvor de har delt sig uhæmmet mange gange (makroskopisk synlig vækst), og dette forhold forklarer hæmningszonens skarpe afgrænsning, man kan tale om en slags potenseret eksponentiel vækst, når den afbildes grafisk som i fig. 6B.

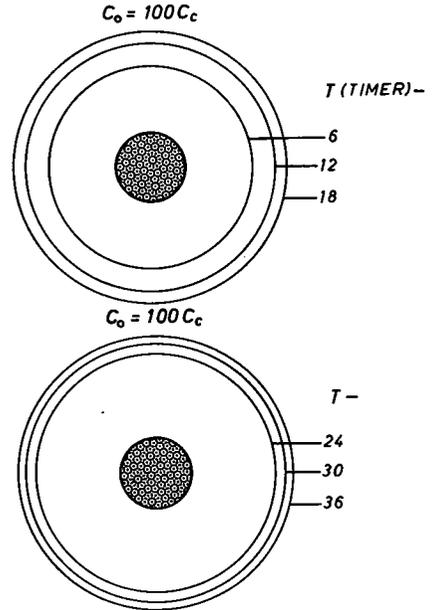
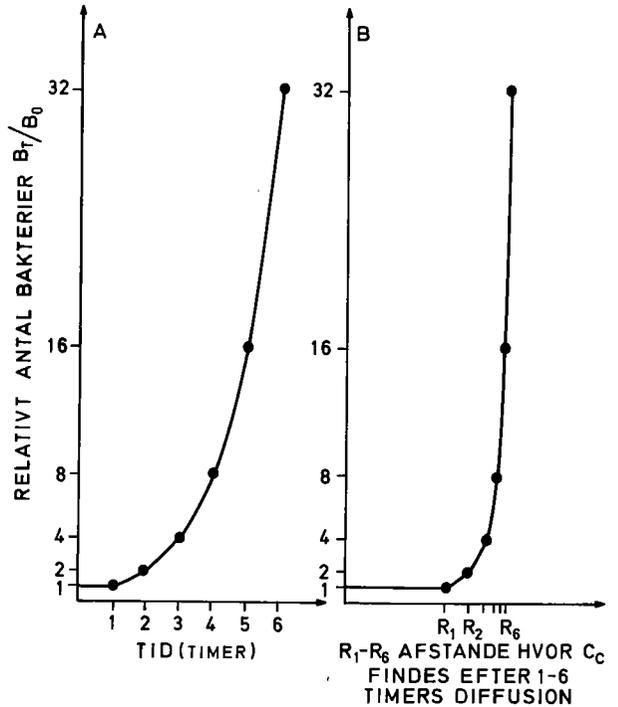


Fig. 5. Grafisk fremstilling af positionen af den kritiske koncentration ( $C_c = MIC$ ) i agaren på forskellige tidspunkter ( $T =$  timer) efter diffusionens start. Antibiotikumkoncentrationen i depotet er  $100 \cdot MIC$  ( $C_o = 100 \cdot C_c$ ) (gengivet efter Bang (1970a)).

Fig 6. A: Eksponentiel vækstkurve. Abscisse = tiden, ordinat = antal bakterie-generationer,  $(\frac{B_T}{B_0})$ , hvor  $B_0$  er bakterietallet til tiden 0, og  $B_T$  er bakterietallet til tiden T.  $\frac{B_T}{B_0}$  angiver således, hvor mange gange  $B_0$  er forøget i tiden T (= antal bakteriegenerationer) (gengivet efter Bang, 1970a). B: Ordinaten som på fig. A. Abscissen er transformeret til en afstandsakse, idet det er beregnet hvor langt ude i agaren den kritiske koncentration ( $C_c = MIC$ ) vil finde sig efter 1-6 timers diffusion (gengivet efter Bang (1970a)).



Cooper et al. (1958) forklarer zonedannelsen ud fra den antagelse, at det kritiske bakterietal er i stand til at adsorbere den tildiffunderende antibiotikumængde, hvorved de perifert herfor liggende bakterier beskyttes mod antibiotikumeffekten. Denne adsorptionsantagelse er ikke nødvendig ifølge Bangs beregninger (1970a) (fig. 5 & 6), og desuden er betingelsen for denne adsorption ikke opfyldt i overfladeinokulerede plader. For yderligere diskussion af disse problemer henvises til originallitteraturen.

Vesterdal (1947a) har ved forsøg med *S. aureus* og penicillin vist, at hæmningszonerne, som bliver synlige efter 4 timers inkubation, omgives af en bræmme af partiel hæmning, synlig vækst, og denne partielle hæmning bliver mere tydelig efter 6-8 timers inkubation. Ved store hæmningszoner er væksten i den partielt hæmmede zone klar og gennemsigtig, hvilket skyldes en lysering af bakterierne forårsaget af den fortsatte diffusion med stigende koncentration af antibiotikum ved hæmningszonernes grænse (se fig. 3 & 4). Dette gør, at hæmningszonen vokser lidt og først bliver stationær efter ca. 12 timers inkubation. Ved små hæmningszoner er bræmmen af partiel vækst uklar og skyldes resistente varianter. Zonegrænsens skarphe d er også betinget af forholdet  $\frac{MIC}{C_0}$  på tidspunktet hvor zonen markeres (fig. 4).

*Faktorer af betydning for hæmningszonens dannelse (ligning (8))*

*Diffusionskonstanten (D)* angiver det antal molekyler, der diffunderer gennem en arealenhed i et givet tidsrum, når koncentrationsfaldet er 1 mol pr. længdeenhed. D angives normalt i mm<sup>2</sup>/sek. I en opløsning af sfæriske molekyler med radius r og viskositeten  $\eta$ , kan D bestemmes ved hjælp af den Sutherland-Einstein'ske ligning:

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta Nr}$$

hvor R = gaskonstanten, T = den absolutte temperatur, og N = Avogadro's tal. Det vil sige at D er proportional med den absolutte temperatur og omvendt proportional med molekylestørrelsen og opløsningens viskositet. Det vil igen sige, at for et givet antibiotikum under givne forsøgsbetingelser kan D betragtes som konstant, medens antibiotika med høje molekylvægte alt andet lige vil diffundere langsommere end antibiotika med lave molekylvægte.

*Den kritiske tid (T)* er tidsrummet fra diffusionens start til det tidspunkt, hvor væksten er så langt fremme, at zonegrænsen markeres. Under forhold hvor diffusion og vækst starter samtidig kan den kritiske tid altså udtrykkes i relation til bakterievæksten som lag-fasen + tiden til det nødvendige antal bakteriedelinger:

$$T = L + n'G = L + G \cdot \log_2 \frac{N'}{N_0} \quad \text{ligning (12)}$$

hvor  $T$  = den kritiske tid,  $L$  = lag-fasens varighed,  $G$  = generationstiden, og  $n'$  = antal bakte-riedelinger før væksthæmningen indtræder ( $= \log_2 \frac{N'}{N_0}$ , hvor  $N_0$  = inoculum og  $N'$  er det kritiske antal bakterier).

I almindeligt rutinearbejde tages inoculum fra en udvokset kultur (som befinder sig i den stationære fase eller i deklinationsfasen). Der vil derfor altid være en lag-fase, som er arts- og stammeafhængig. Den vil forlænges, hvis inoculum er lille og er i øvrigt afhængig af substrat, dyrkningstemperatur og andre fysiske miljøfaktorer samt tilstedeværelsen af toksiske stoffer.

Generationstiden i den logaritmiske vækstfase er ligeledes afhængig af substratet og temperaturen og af arts- og stammeegenskaber. Hvis man antager, at en kultur efter inokulation gennemgår ca. 8 delinger, før det kritiske bakterietal er nået, bruger en hurtigtvoksende *E. coli* under optimale forhold ca. 160 min. hertil. Anvender man et større inoculum, vil et mindre antal delinger selvfølgelig kræves, før det kritiske antal bakterier nås, hvorfor den kritiske tid forkortes tilsvarende. Indføres en prædiffusionsperiode før tilsåning af substratet, forlænges den kritiske tid tilsvarende, så ligning (12) kan skrives:

$$T = P + L + n'G \quad \text{ligning (13)}$$

hvor  $P$  er prædiffusionstiden. Hvis  $P$  er stor, vil variationer i lag-fase, delingstid og inoculums størrelse få relativt mindre indflydelse på  $T$ .

#### *Depotets form og udstrækning samt mængden af antibiotikum i depotet*

I ligning (8) indgår depotets antibiotikumindhold kun ved radius  $r$  og koncentrationen  $C_0$  hvor  $r^2 C_0$  i realiteten er en beregning af det antal molekyler, der ved diffusionens start er anbragt i *et punkt* i centrum. Ligning (8) har *ingen* korrektion for anvendelsen af *et hul* med radius  $r$  i stedet for et punkt (se side 364). Ud fra ligning (10) ses, at denne størrelse kun har betydning for hvor regressionskurven krydser ordinataksen, men ikke for dens hældning, som bestemmes af  $D$  og  $T$ , dvs. ved ændringer i depotets antibiotikumindhold sker der kun en parallel forskydning af regressionskurven. Heraf følger at med stigende antibiotikumindhold øges zonernes størrelse med det resultat, at stadigt mere resistente stammer også viser hæmningszoner.

Hvilken depotform ("ditch", "cup", cylinder, "disc" eller tablet) og hvilket antibiotikumindhold, der bør foretrækkes, afgøres først og fremmest af praktiske hensyn. Den principielle forskel, at ditch og cup betinger en todimensional diffusion i modsætning til den tredimensionale diffusion fra de øvrige depotformer, har ingen større praktisk betydning. Disc'ene og tabletterne har den fordel, at de kan færdigfremstilles industrielt, og i tørrede discs og især i tabletter er antibiotikum meget holdbart. Andre depoter må friskfremstilles i tilslutning til hver bestemmelse. Tabletter og tørrede discs opsuger den nødvendige væskemængde fra agaren, hvorved antibiotikum opløses og bliver diffusibelt, og meget høje koncentrationer af antibiotikum opnås i starten lige omkring depotet sammenlignet med de

koncentrationer, der opnås omkring en agar-cup (Murayama 1959). Kun en mindre del af den samlede mængde i tabletter og discs er straks diffusibelt, og først efterhånden som mere væske opsuges, opløses det resterende indhold. I tabletterne er det dog kun en mindre mængde af indholdet, som bliver diffusibelt under almindelige forhold (Murayama 1959). Der bør derfor skelnes mellem *indhold* og *diffusibel mængde* i disc og tablet, idet disse to størrelser ikke altid falder sammen. Der skal således ca. 2,5 gange så meget antibiotikum i en tablet som i en disc for at opnå sammen zonestørrelse uden prædiffusion. Foretages bestemmelsen efter 20 timers prædiffusion, giver tabletterne de største zoner, hvilket er udtryk for, at en større del af den resterende mængde nu er opløst og diffunderet ud (Thomsen 1967). Discs med så forskellig diameter som fra 5 mm (Ericsson et al. 1954) op til 20 mm (Jensen & Kiær 1948) har været benyttet med udmærket resultat. Hvis samme antibiotikum-mængde indeholdes i en stor og en lille disc, vil det gælde, at den store giver de største zoner med de meget følsomme stammer, mens den lille disc sammenlignet med den store giver relativt større zoner med de mindre følsomme stammer. Dette skyldes, at den store disc suger mere væske, koncentrationen bliver derfor lavere, men discens størrelse bevirker at depotet fra starten har en større udstrækning. Er stammen meget følsom vil zonen derfor blive stor, men er stammen mindre følsom, vil MIC ikke eller kun mere kortvarigt opnås omkring depotet. Omvendt forholder det sig med den lille disc der suger tilsvarende mindre væske, men derved har højere koncentration i depotet (Thomsen 1967).

### 3. Almene dyrkningsbetingelser ved diffusionsforsøg

#### *Substratet*

Substratets sammensætning og tykkelse spiller en rolle for zonestørrelsen, og denne afhængighed kan give sig udtryk på forskellig måde:

- (1) Ændring af bakteriernes vækst
- (2) Ændring af antibiotikas aktivitet
- (3) Ændring af antibiotikas diffusion

Sammensætningen af substratet skal afpasses, således at de stammer der skal undersøges vokser godt, og desuden bør substratet ikke indeholde stoffer, der hæmmer antibiotikas aktivitet. Der findes ikke noget specielt "rigtigt" medium til rutineformål, og det man vælger må baseres på overvejelser med hensyn til relativ egnethed, reproducerbarhed og pris. Almindeligvis bruges et isotonisk medium som kødvandsbouillonagar, hvortil er sat 5-10% defibrineret hesteblood og eventuelt andre stoffer. Som eksempler kan anføres Mueller-Hinton agar (Ericsson & Sherris 1971) og Serumintitutts resistens-substrat (se kap. 39 side 390). God reproducerbarhed er af afgørende betydning.

### *Glukose og pH*

Glukosetilsætning bruges som uspecifikt væksttilskud. Under glukosens omsætning dannes syrer, der nedsætter substratets pH, hvilket kan ændre den antibiotiske aktivitet, således at fx. erytromycin- og aminoglykosidzonerne bliver mindre og tetracyklin- og meticillinzonerne større (Ericsson & Sherris 1971). Mængder på 0,5–1% glukose har dog ingen indflydelse på zonestørrelsen. Almindeligvis anbefales, at pH i substratet er omtrent som legemets: 7,3–7,4, hvorved stoffet jo skal virke i de fleste tilfælde (Thomsen 1967).

### *Blod*

Tilsætning af blod til substratet har flere formål. En del bakterier kræver serum for at kunne vokse. Desuden tillægger man almindeligvis blodet en vis afgiftende funktion, specielt over for væksthæmmende stoffer i agar, og endelig vil angiveligt sulfonamidantagonister neutraliseres af lyseret hesteblood på grund af dets indhold af thymidin fosforylase (Ferone et al. 1975). Citratblod er uegnet i forbindelse med nogle antibiotika (fx. tetracyklin), da divalente kationer i substratet bindes, hvorved zonerne bliver større. I reglen anvendes 5–10% defibrineret hesteblood (Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971).

### *Agar*

Substratet bør være så fast, at inokulatet kan spredes og disc'ene ligge fast, og det opnås ved tilsætning af 1–2% agar, hyppigst 1,2%. Agarindholdet kan varieres fra 0,5% til omkring 4% uden væsentlige ændringer i vækstforholdene, men ved stigende agarkoncentration bliver diffusionen langsommere, og nogle antibiotika med en molekylvægt på over 500 viser aftagende zonestørrelse (Ericsson et al. 1954; Ericsson & Svartz-Malmberg 1959; Thomsen 1967). Agartypen har også indflydelse på resultaterne, idet fx. aminoglykosider, tetracyklin og polymyxin giver mindre zoner med almindelig agar end med særligt rensed agar (fx. Ionagar), hvilket skyldes dels at disse antibiotika i højere grad synes at bindes til almindelig agar, dels at der er færre divalente kationer i rensed agar. Problemet har specielt betydning ved resistensbestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa* over for aminoglykosider (Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971).

### *Pepton*

Peptoner sættes til de fleste gængse bakteriologiske substrater af hensyn til væksten, men ved resistensbestemmelse ødelægger de ofte målingen af sulfonamidfølsomheden. Grunden er, at mange peptoner indeholder sulfonamidantagonister, som forårsager at zonestørrelsen bliver mindre eller ophæves. Også streptomycin- og klortetracyklinzonerne bliver mindre ved tilstedevæ-

relse af pepton. Af disse grunde bliver der ikke anvendt sædvanlig kødpepton i substratet ved resistensbestemmelse og koncentrationsmålinger (Erlandson 1951; Thomsen 1967), men NZ-amin.

#### *Uorganiske stoffer*

Divalente katjoner (fx.  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ) kan nedsætte zonestørrelsen for tetracyklin ved at bindes til dette stof, men denne effekt modvirkes delvis af fosfat. Divalente katjoner, især  $\text{Mg}^{++}$  og  $\text{Ca}^{++}$ , øger også bakterierne, især *P. aeruginosa*'s, resistens over for polymyxin og navnlig aminoglykosider med øget MIC og nedsat zonestørrelse til følge. 20–35 mg  $\text{Mg}^{++}$  og 50–100 mg  $\text{Ca}^{++}$ /l anbefales til Mueller-Hinton agar (WHO 1976). Ved så høje elektrolytkoncentrationer vil dog resistensbestemmelsen for mecillinam ikke give reproducerbare hæmningszoner.

#### *Lagtykkelsen*

Går hullet som ved agar-cup teknikken igennem hele substratlaget, og fyldes det til randen med antibiotikumopløsningen, spiller lagtykkelsen ingen rolle. Hvis diffusionen foregår fra et overfladedepot som fx. en disc eller en tablet, får lagtykkelsen af substratet betydning. De Beer & Sheerwood (1945) fandt et lineært forhold mellem hæmningszonens diameter og logaritmen til lagtykkelsen, hvilket betyder at den af lagtykkelsen betingede variation i zonestørrelse (øget tykkelse = mindre zoner) er størst ved tynde plader og reelt betydningsløs ved en lagtykkelse på over 6–7 mm (Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971). I almindelighed bruges en lagtykkelse på 6 mm.

#### *Dyrkningstemperaturen*

Dyrkningstemperaturen er af betydning for zonerne størrelse ved at påvirke dels bakterierne vækst, dels, men i ringe grad, diffusionen. Generelt gælder, at jo længere fra en bakteriestammes temperaturoptimum den aktuelle temperatur er, des langsommere vil stammen vokse og desto større vil zonen blive. Når en plade sættes ind i en termostat, vil den nå inkubationstemperaturen ( $37^{\circ}\text{C}$ ) i løbet af ca. 1 time, ret uafhængigt af om den tages fra køleskab eller stuetemperatur. Stilles 5 plader i stabel, vil den midterste først nå termostattemperaturen efter 4 timer, og hvis stablen er omgivet af andre stabler, kan der gå op til 5 timer. Forsinket opvarmning betyder langsommere vækst og dermed større hæmningszoner (Cooper & Linton 1952), mens diffusionen er væsentlig mindre afhængig af sådanne temperaturforskelle (det skyldes at diffusionskonstanten er proportional med den absolutte temperatur).

*Specielle krav til substratet*

Nogle bakterier kræver særlige vækstfaktorer (fx. thymidin, NAD, se kap. 39 side 390), som må sættes til standardsubstratet, fx. ved at sprede en opløsning af vækstfaktoren på agaroverfladen. Ved undersøgelse af *S. aureus* for meticillinresistens finder man, at stammerne er heteroresistente, dvs. at kun en lille del af kolonierne viser øget resistens over for meticillin. De resistente gror ofte som små kolonivarianter med defekt cellevæg på isotone medier, mens der udvikles større kolonier på hypertone medier indeholdende fx. 5% NaCl. Disse resistente varianter afsløres imidlertid lettest ved inkubering ved 30°C, som derfor anbefales til dette formål (Ericsson & Sherris 1971).

*Dyrkningsatmosfære*

10% CO<sub>2</sub> i dyrkningsatmosfæren kan influere på zonestørrelsen, dels ved at ændre visse bakteriearters væksthastighed, dels ved at ændre pH i substratets overflade. Zonestørrelsen bliver således mindre med aminoglykosider og erytromycin og større med tetracyclin, meticillin og novobiocin i CO<sub>2</sub>-atmosfære (Ericsson & Sherris 1971). CO<sub>2</sub> bør derfor undgås, hvis det ikke er nødvendigt for væksten. Anaerob inkubation foretages oftest i en atmosfære, som også indeholder CO<sub>2</sub>. Aminoglykosidernes aktivitet falder stærkt under anaerobe forhold, hvorfor fakultativt aerobe bakterier aldrig bør resistensbestemmes under anaerobe forhold over for aminoglykosider. Zonedannelsen under anaerobe forhold adskiller sig i øvrigt ikke principielt fra zonedannelsen under aerobe forhold, og agardiffusionsmetoderne kan udmærket anvendes til resistensbestemmelse under anaerobe forhold (Sapico et al. 1972; Dornbusch et al. 1975a, b; Kwok et al. 1975).

**Referencer:** se referencelisten efter kapitel 40.

## Kapitel 39

### Resistensbestemmelse

#### Standardisering af agardiffusionsmetoden specielt med henblik på anvendelse af prædiffusionen

Det er tidligere beskrevet, at bortset fra MIC, diffusionskonstanten og depotkoncentrationen er de øvrige faktorer, som influerer på zonestørrelsen afhængige af den kritiske tid  $T$ . Denne er sammensat af lag-fasen  $L$ , delingstiden  $G$ , det kritiske bakterietal  $N'$  og bakterietallet i inokulatet  $N_0$  som angivet i ligning (12), og de variationer i hæmningszonerne, der skyldes samspillet mellem diffusion og vækst, kan derfor henføres til lag-fase, delingstid og inokulat, da det kritiske bakterietal regnes for konstant (Cooper et al. 1958).

$$\text{Ligning (12)} : T = L + G \cdot \log_2 \frac{N'}{N_0}$$

En standardisering af  $T$ , som er af betydning for at opnå sammenlignelige resultater fra prøve til prøve, er vanskelig, men kan tænkes foretaget på flere måder: 1) Samtlige led på ligning (12)'s højre side holdes konstant; 2) der korrigeres for variationer i de enkelte led eller der foretages en samlet korrektion; 3) et eller flere led på ligningens højre side øges i størrelse, således at variationer i de enkelte andre led får mindre betydning for den samlede størrelse; 4) der indføres en prædiffusionsperiode  $P$ , som gøres stor, hvorved hele ligningens højre side øges med en konstant, som er stor i forhold til de øvrige led.

*ad 1):* I modsætning til, hvad der er muligt ved måling af antibiotikumkoncentrationer, kan en fuldstændig standardisering af de enkelte led ikke gennemføres i resistensbestemmelserne, fordi både stamme og inoculumstørrelse varierer fra forsøg til forsøg. Inoculum kan standardiseres i en vis udstrækning, såfremt bestemmelserne udføres på subkultur (sekundært), mens dette er nærmest umuligt, hvis bestemmelserne udføres direkte på prøvemateriale (primært). Forskellen i delingstiden mellem forskellige arter lader sig heller ikke eliminere.

*ad 2):* Muligheden for at korrigere for variationer i lag-fasens længde, væksthastighed og inoculumstørrelse, ved at bestemme standardkurvens (liniens)

hædningskoefficient foreligger, da dette kan gøres eksperimentelt ved at bestemme to af liniens punkter, dvs. gennemføre resistensbestemmelsen ved to forskellige depotstyrker (se ligning (11) kap. 38). Herved bliver det muligt at fastlægge standardkurven (som det jo også gøres ved antibiotikumkoncentrationsmålinger) og korrigere for hædningsvariationer, når en referencekurve for en stamme med kendt følsomhed er bestemt på forhånd. Dette er imidlertid besværligt og vanskeliggøres yderligere ved, at der dagligt skal skaffes en referencekurve for hvert antibiotikum til de nødvendige korrektioner.

*ad 3*): En anden fremgangsmåde består i at lag-fasen forlænges med et vist antal timer ved at anbringe pladerne i køleskab eller ved stuetemperatur straks efter at man har tilsæet og startet diffusionen (Ericsson et al. 1954). I køleskab opnås fuldstændig vækststandsning, mens nogle stammer kan vokse ved stuetemperatur. Resultatet er, at diffusionen stort set forløber uændret, omend lidt langsommere, mens væksten standser, hvorved lagfasen forlænges med antallet af timer i køleskabet. Metodens væsentligste ulempe er, at bestemmelsen forsinkes med hele perioden ved lav temperatur. Afkortes denne til fx. 3 timer, mistes fordelene ved fremgangsmåden i nogen grad, idet diffusionsgradienten først kan betragtes som relativt "stabil" noget senere (Thomsen 1967)(fig. 3, kap. 38 og fig. 1 i dette kap.). En mere teoretisk indvending er, at antibiotikas effekt på forskellig måde er afhængig af bakteriernes metaboliske status (se nærmere hos Thomsen 1967).

*ad 4*): Hvis inokuleringen først foretages efter en prædiffusionsperiode kan ligning (12) skrives således:

$$T = P + L + G \cdot \log_2 \frac{N'}{N_0}$$

dvs. at den kritiske tid øges med  $P$  = prædiffusionsperioden, og er denne stor vil variationer i de andre faktorer blive af relativt ringe betydning og  $T$  derfor i praksis bestemmes af  $P$ . En prædiffusionsperiode på 20 timer ved stuetemperatur har vist sig velegnet og praktisk, da diffusionsgradienten er stabiliseret og pladerne kan fremstilles dagen før. Ved anvendelse af en prædiffusionsperiode af denne længde er usikkerhedsmomenterne forårsaget af samspillet mellem diffusion og vækst derfor reduceret og faktisk i stor udstrækning elimineret (Thomsen 1967). Yderligere vil en længere prædiffusionsperiode medføre, at resistente stammer får mindre zoner, mens følsomme stammer får større zoner (Thomsen 1967; Bang 1970a, b) (se også fig. 1).

Med hensyn til yderligere diskussion af prædiffusionens fordele henvises til Thomsen (1967).

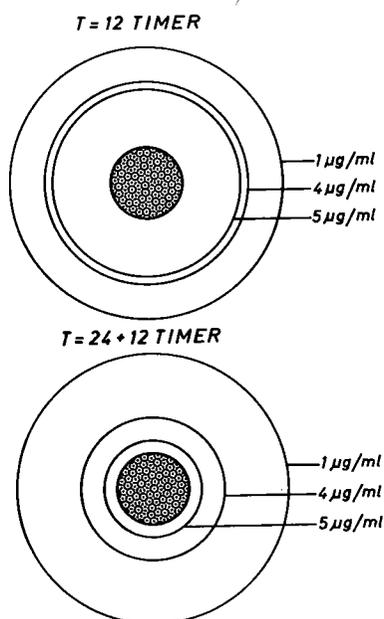


Fig. 1: Grafisk fremstilling af positionen af tre forskellige antibiotikumkoncentrationer efter 12 timers diffusion i agaren (øverst) og efter 36 timers diffusion (nederst), dvs. svarende til forholdene uden, henholdsvis med 24 timers prædiffusion (gengivet efter Bang 1970a).

Der er to problemer i forbindelse med inokulatets størrelse, som ikke løses ved anvendelse af en prædiffusionsperiode.

*Stammer der producerer ekstracellulært  $\beta$ -laktamase:* Sådanne stammers MIC og hæmningszone over for  $\beta$ -laktam-antibiotika (penicilliner og cefalosporiner) er stærkt afhængig af præformeret mængde af  $\beta$ -laktamase (som nedbryder  $\beta$ -laktam-antibiotika) i inoculum, og denne mængde stiger naturligvis med stigende inoculum. Prædiffusion er helt uden indflydelse på dette forhold. Et lille inoculum kan bevirke, at  $\beta$ -laktamase-producerende stammer fejlagtigt bestemmes som helt eller delvis følsomme for  $\beta$ -laktam-antibiotika, og et stort inoculum påvirker MIC-bestemmelsen, således at værdien kan øges med en faktor 100.

*Sulfonamidinhibitorer i inoculum:* p-aminobenzoesyre modvirker sulfonamids væksthæmning på sulfa-følsomme bakterier. Sulfonamid-antagonister produceres af mange bakteriearter under væksten, og den tilstedeværende mængde er derfor afhængig af inoculums størrelse. Et for stort inoculum vil bevirke, at nogle sulfa-følsomme stammer fejlagtigt bestemmes som resistente (Erlandson 1951; Thomsen 1967).

### **Relationen mellem zonestørrelse og bakteriestammers følsomhed over for antibiotika ved resistensbestemmelse (regressionskurven)**

Denne relation fremgår af ligning (10) i kap. 38. I praksis foretages eksperimentelt en bestemmelse af regressionskurven for et givet antibiotikum ved en samtidig bestemmelse af MIC eller  $IC_{50}$  ved agarfortyndingsmetoden og af hæmningszonen ved agardiffusionsmetoden, idet man benytter et stort antal stammer (helst over 100) dækkende alle klinisk relevante følsomhedsniveau'er. Stammerne skal være af forskellig art, repræsenterende almindeligt forekommende, humant patogene arter med forskellig væksthastighed og helst nyligt isolerede (Ericsson & Sherris 1971). Ifølge ligning (10) i kap. 38 er der en liniær relation mellem kvadratet på hæmningszonens radius og logaritmen af MIC (eller  $IC_{50}$ ), men i praksis er der også en næsten liniær relation mellem zonediameteren og log MIC, som derfor almindeligvis anvendes.

### **Bestemmelse af MIC eller $IC_{50}$ ved agarfortyndingsmetoden**

Metoderne er nøje beskrevet af Thomsen (1967) og Ericsson & Sherris (1971), også med begrundelse for hvorfor agarfortyndingsmetoden foretrækkes fremfor bouillonfortyndingsmetoden, skønt de stort set giver samme MIC-resultater (se også side 388-389). Siden midten af 1950'erne har man til penicillin og de fleste andre antibiotika anvendt 5% blodagarplader indeholdende pepton og til sulfonamider og trimetoprim 10% blodagar uden pepton. Af reference-mæssige grunde har man fastholdt brugen af disse substrater ved fortyndingsmetoden, mens substratet til diffusionsmetoden har været ændret flere gange i tidens løb (angående substratsammensætningen se side 54 i Thomsen 1967). Fremgangsmåden er følgende:

Der fremstilles en 2-folds fortyndingsrække af det pågældende antibiotikum i pladerne. Der benyttes fx. 10 fortyndingstrin dækkende det klinisk relevante koncentrationsområde, samt en kontrolplade uden antibiotikum. Pladerne skal helst bruges inden for det første døgn, men kan dog holde sig 1 uge i plastposer ved 4°C uden at antibiotikumaktiviteten falder væsentligt. Hver plade inddeles i et passende antal felter, således at mange stammer kan testes på samme plade. Et inoculum af størrelsesordenen  $10^2 - 10^3$  kim anbringes pr. felt på ca. 1 cm<sup>2</sup>. Dette opnås ved at tilså feltet med en øsefuld af en fortyndet døgngammel serumbouillonkultur (eller med en mekanisk multi-inoculator, der muliggør samtidig tilsåning med fx. 16 stammer). Serumbouillonkulturene fortyndes efter følgende skema:

Gramneg. stave og stafylokokker:  $10^{-3}$

Enterokokker og gramneg. kokker:  $10^{-2}$

Pneumokokker, andre streptokokker og coryneforme stave:  $10^{-1}$

Der inkuberes i 16–20 timer ved 35–37°C. Ved langsomt voksende bakterier (fx. nogle anaerobe) kan 2 døgn inkubation være nødvendig, hvis kontrolpladen ikke viser synlig vækst før efter 48 timer.

De fleste (ifølge Ericsson & Sherris 1971) aflæser derefter MIC som den laveste koncentration der giver komplet væksthæmning vurderet med det ubevæbnede øje, men det anbefales dog at se bort fra en enkelt koloni eller en knap synlig film af vækst. Det er imidlertid biologisk mere korrekt at beregne  $IC_{50}$  efter Kärbers metode af følgende grunde: 1) Betydningen af inokulatets størrelse elimineres vidtgående, idet stort inoculum giver højere MIC på grund af resistente varianter, der ofte optræder med en hyppighed på  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$ . 2) Kärber-metoden er en gennemsnitsberegning og derfor ikke så påvirkelig af målefejl som en enkelt observation. 3) Det "net" af doser ( $\frac{1}{4}$  fortyndingstrin), hvormed man "indfanger" titeren, er finere med Kärber-metoden end hvis man blot angiver MIC (ét fortyndingstrin); forskellen ligger i aflæsningsmetoden, idet fortyndingsrækkerne er de samme.

*Aflæsning af  $IC_{50}$  efter Kärbers metode:* Ved aflæsningen opdeles væksten i 5 vækstgrader: 0, 1, 2, 3, 4, svarende til 0, 25%, 50%, 75% og 100% vækst, hvor væksten i de enkelte felter sammenlignes med væksten i et antibiotikumfrit kontrolfelt. Aflæsningen forudsætter ideelt, at vækstforskelle på 25% er erkendelige, hvilket kun er muligt med et forholdsvis moderat inoculum, der giver 100–200 kolonier pr. felt. Et mindre inoculum giver for stor usikkerhed, idet spredningen på de enkelte tællinger (= kvadratrod af kolonitallet som følger Poisson-fordelingen) bliver for stor, og et større inoculum vil medføre, at mere end 25% skal hæmmes for at væksttætheden vurderes som nedsat til 75%. I praksis anvendes oftest et inoculum på ca.  $10^3$  kim og aflæsningen foretages subjektivt ved sammenligning med vækst på kontrolpladen. Denne sættes = 4 (100%). En reel reduktion til 50% vil under disse forhold ikke kunne iagttages, og sandsynligvis svarer den vækstgrad der angives ved 2 til en absolut reduktion i væksten på 90–95% (Reyn et al. 1963). Aflæsningen foretages fx. således:

Fortynding	Vækstgrad
1	0
1/2	0
1/4	0
1/8	0
1/16	0
1/32	0
1/64	1
1/128	2
1/256	3
1/512	4
Kärbersum =	10

Vækstgraderne summeres til Kärbersummen (her = 10), og derefter slås Kärbertallet op i en tabel eller beregnes. Kärbertallet er logaritmen til  $IC_{50}$  og beregnes således:

$$\log IC_{50} = \text{Kärbersummen} \cdot 0,07525 - (\text{antal plader} - 0,5) \cdot 0,3010 \text{ ligning (14)}$$

hvor 0,3010 er logaritmen til fortyndingsfaktoren 2 og 0,07525 er 1/4 heraf (svarende til én vækstgrad i aflæsningen). Beregningen ser i ovenstående tilfælde således ud:

$$\log IC_{50} = 10 \cdot 0,07525 - 9,5 \cdot 0,3010 = -2,107, \text{ dvs. } IC_{50} = 1/128 \text{ af udgangskoncentrationen.}$$

I stedet for at bruge fortyndingstrin af en udgangskoncentration til beregningerne kan man anvende de reelle koncentrationer af antibiotikum i pladerne til beregningerne på følgende måde:

Koncentration	Vækstgrad
512 $\mu\text{g/ml}$	0
256	0
128	0
64	0
32	0
16	0
8	1
4	2
2	3
1	4
Kärbersum =	10

Beregningen er derefter således:

$$\log IC_{50} = \text{Kärbersum} \cdot 0,07525 - 0,5 \cdot 0,3010 \quad \text{Ligning (15)}$$

altså i ovenstående eksempel:

$$\log IC_{50} = 10 \cdot 0,07525 - 0,5 \cdot 0,3010 = 0,6020, \text{ dvs. } IC_{50} = 4 \mu\text{g/ml.}$$

Stammer med vækstgrad 3 eller 4 på pladen med højeste antibiotikumkoncentration og stammer med vækstgrad 0 eller 1 på pladen med laveste antibiotikumkoncentration unddrager sig  $IC_{50}$ -bestemmelse. I stedet angives i disse tilfælde  $IC_{50}$  som henholdsvis  $> 512$  eller  $< 1 \mu\text{g/ml}$ . Spredningen på denne metode er 0,05 fortyndingstrin (Thomsen 1967).

Til daglig brug er det kun Kärbersummen, der skal beregnes; resten findes tabelleret (Finney 1947; Reyn et al. 1958; Thomsen 1967). Råder man ikke over sådanne tabeller, kan man undgå beregningerne og opslagene i logaritmetabeller ved i stedet for at anvende semilogaritmisk papir. I det sidst anførte eksempel vil fx. en  $IC_{50}$ -værdi på  $128 \mu\text{g/ml}$  betyde, at væksten på pladen indeholdende  $128 \mu\text{g/ml}$  vil være af grad 2, mens væksten på alle pladerne med mindre antibiotikumindhold vil være af grad 4. Det vil sige, at Kärbersummen er  $7 \cdot 4 + 2 = 30$ . Tilsvarende er Kärbersummen ved  $IC_{50} = 64 \mu\text{g/ml} = 6 \cdot 4 + 2 = 26$  etc. I ovenstående eksempel kan man altså opstille følgende tabel over samhørende  $IC_{50}$ -værdier og Kärbersummer for de "hele" fortyndingstrin:

$IC_{50}$	Kärbersum
512	38
256	34
128	30
64	26
32	22
16	18
8	14
4	10
2	6
1	2

Mellem koncentrationerne af antibiotikum og de tilsvarende Kärbersummer er der en lineær relation i et semilogaritmisk koordinatsystem. Afbildes derfor ovenstående koncentrationer ud af den logaritmiske akse og de tilsvarende

Kärbersummer ud af den aritmetriske akse, fås en ret linie. Ved interpolation på denne linie kan de til de mellemliggende Kärbersummer svarende  $IC_{50}$ -værdier aflæses.

Samhørende værdier af  $IC_{50}$  og zonediametrene bestemt ved agardiffusionsmetoden vil herefter kunne anvendes til tegning af regressionskurven i et semilogaritmisk koordinatsystem, hvor  $IC_{50}$  (eller Kärbertallet) afsættes ud ad den logaritmiske akse mod zonediameteren (mm) ud ad den aritmetriske. Herved fås i reglen en ret linie, selv om der teoretisk kun er lineær relation mellem kvadratet på zoneradius (eller kvadratet på diameteren) og  $\log IC_{50}$  (fig. 2). Regressionsliniens beliggenhed kan beregnes af ligning (10), kap. 38, eller ved hjælp af "mindste kvadraters metode", men tegning af regressionslinien anbefales i alle tilfælde, idet afvigelser fra den rette linie og afvigende enkeltresultater bedre afsløres (Ericsson 1960; Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971).

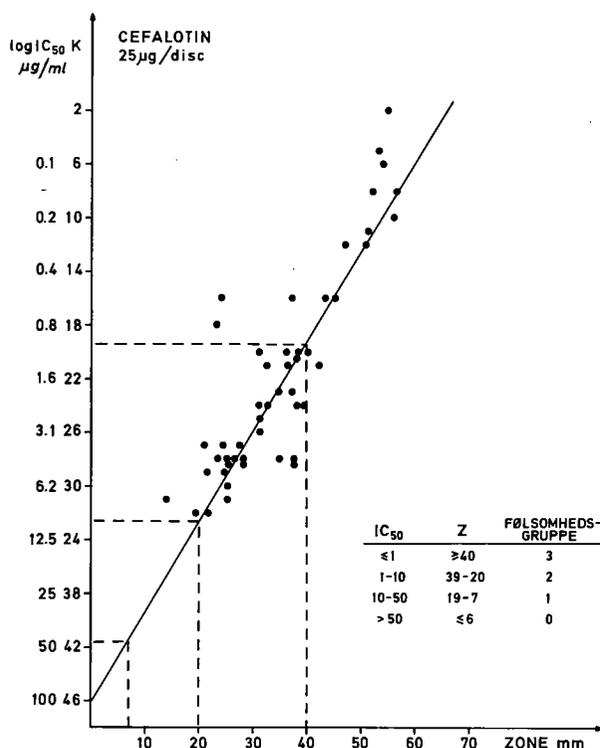


Fig 2: Regressionskurve for cefalotin (25 µg/disc). Ordinaten  $\log IC_{50}$  eller Kärbertal (K). Abscisse: diameteren af hæmningszonen. 20 timers prædiffusion. Bemærk at ud ad ordinaten er afsat *faldende* koncentrationer, dvs. at regressionskurvens hældningskoefficient er positiv i modsætning til den negative hældning, som ligning (10) angiver.

### Opstilling af følsomhedsgrupper (aflæsningskemaet)

En opdeling af antibiotika i grupper (se tabel 1), således at bestemmelsen med eet bestemt stof udstrækkes til at gælde for andre nærtstående antibiotika, er nødvendig af praktiske grunde og medfører, at resultaterne bliver mere eller mindre omtrentlige for de øvrige antibiotika i gruppen, da der sjældent er fuldstændig ensartet virkning af alle stofferne i en gruppe. For videre diskussion herom henvises til Thomsen (1967), WHO Technical Report (1961) og speciallitteraturen.

Tabel 2 viser en gruppering af resultaterne fra regressionskurverne i klinisk-bakteriologiske følsomhedsgrader ifølge Thomsens metode (1967), som anvendes på Seruminstitutet. Følsomhedsgraderne er i virkeligheden en semikvantitativ omsætning af den kontinuerlige skala af  $IC_{50}$ -værdier og den tilsvarende skala af zonestørrelser fastlagt ud fra regressionskurven. Basis for denne gruppering er serum-, vævs- og urinkoncentrationer af de forskellige antibiotika efter forskellige doseringsformer:

*Følsom* (i praksis angivet med tallet 3): omfatter stammer, hvor  $IC_{50}$  er mindre end ca.  $\frac{1}{5}$  af den maksimale serumkoncentration, der opnås ved standarddosis også ved peroral indgift, idet man antager, at den aktuelle koncentration på selve infektionsstedet altid er en del lavere end serumkoncentrationen (Jensen et al. 1950b). In vivo respons på behandling med stoffet er sandsynlig ved milde til moderate systemiske infektioner.

*Middelfølsom* (2): omfatter stammer med højere  $IC_{50}$ -værdier, som kræver tilsvarende forøgede serumkoncentrationer, som kan opnås efter forhøjet dosis (med  $\beta$ -laktam-antibiotika), eller de forøgede koncentrationer, der opnås hvis antibiotikum kan koncentreres på infektionsstedet som fx. i urin ved blærebetændelse. I begge tilfælde kan man med en rimelig grad af sandsynlighed forvente klinisk respons.

*Relativt resistent* (1): omfatter stammer med endnu højere  $IC_{50}$ -værdier, som kræver de høje koncentrationer der kan opnås lokalt ved lokal applicering af antibiotika, fx. som salve, pudder osv.

*Resistent* (0): omfatter stammer med så høje  $IC_{50}$ -værdier, at der ikke kan forventes klinisk respons.

Fordelen ved en sådan semikvantitativ gruppering er, at paratviden om opnåelige serumkoncentrationer sammenlignet med  $IC_{50}$ -værdierne ikke er nødvendig i den terapeutiske situation, og at der tages hensyn til, at den  $IC_{50}$ -værdi der findes med agardiffusionsmetoden i rutinesituationen er behæftet med nogen usikkerhed. Ulempen ved systemet ligger dels i kategoriseringen af zonestørrelser tæt ved "breaking-points" mellem grupperne, hvor en subjektiv "bias" kan spille ind, dels i en række andre forhold, som skal omtales kort:

Tabel 1: Antibiotika som for tiden anvendes til resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse med:	Gælder også for:	Disc-indhold (SSI)
Benzylpenicillin-natrium	Alle penicillinase-følsomme penicilliner undtagen ampicillin, carbenicillin og mecillinam	4 enh. (high-dose: 100 enh.)
Streptomycin-sulfat	Dihydrostreptomycin	40 µg S-base
Sulfametoxazol + trimetoprim (19+1)	Sulfadiazin + trimetoprim	75 µg
Gentamycin-sulfat		20 µg G-base
Tetracyclin-hydroklorid	Alle andre tetracyklinderivater	20 µg
Ampicillin (aminobenzylpenicillin)	Hetacillin, amoxicillin	40 µg
Cefalotin-natrium	De fleste andre cefalosporiner	25 µg
Kanamycin		40 µg K-base
Vancomycin-hydroklorid		150 µg
Fucidin-natrium		200 µg
Erytromycin		10 µg
Lincomycin-hydroklorid		15 µg L-base
Meticillin-natriummonohydrat	Alle penicillinase-resistente penicilliner og cefalosporiner overfor Staph. aureus	50 µg
Sulfatiazol-natrium	Alle sulfonamider	238 µg
Nalidixan-natrium		50 µg N-syre
Polymyxin-sulfat	Colistin	75 µg P-base
Karbenicillin-natrium		250 µg
Kloramfenikol		50 µg

De antibiotika der for tiden anvendes til resistensbestemmelse er opført i første kolonne, indholdet i discs er anført i tredje kolonne og beslægtede antibiotika som resistensbestemmelserne gælder for er anført i anden kolonne.

Tabel 2: Skematisk opstilling af følsomhedsgrupper (aflæsningskemaet).

Antibiotikum	Følsom 3	Middelfølsom 2	Relativt res. 1	Resistent 0
Penicillin	≥ 40 (≤ 0,03)	39-27 (0,03-0,125)	26-7 (0,125-1)	≤ 6 (> 1)
Penicillin high-dose	≥ 40 (≤ 1)	39-25 (1-10)	24-7 (10-50)	≤ 6 (> 50)
Streptomycin	≥ 27 (≤ 3)	26-15 (3-12)	14-7 (12-30)	≤ 6 (> 30)
Sulfam/trim	≥ 40 (≤ 2)	39-26 (2-8)	25-7 (8-40)	≤ 6 (> 40)
Gentamycin	≥ 40 (≤ 0,5)	39-29 (0,5-5)	28-18 (5-50)	≤ 17 (> 50)
Tetracyclin	≥ 40 (≤ 1)	39-25 (1-5)	24-7 (5-50)	≤ 6 (> 50)
Ampicillin	≥ 40 (≤ 2)	39-23 (2-8)	22-7 (8-32)	≤ 6 (> 32)
Cefalotin	≥ 40 (≤ 1)	39-20 (1-10)	19-7 (10-50)	≤ 6 (> 50)
Kanamycin	≥ 37 (≤ 2,5)	36-22 (2,5-10)	21-7 (10-40)	≤ 6 (> 40)
Vancomycin	≥ 35 (≤ 2)	34-26 (2-8)	25-7 (8-100)	≤ 6 (>100)
Fucidin	≥ 35 (≤ 1)	34-21 (1-10)	20-7 (10-100)	≤ 6 (>100)
Erytromycin	≥ 40 (≤ 0,1)	39-21 (0,1-1)	20-7 (1-6)	≤ 6 (> 6)
Linkomycin	≥ 37 (≤ 0,5)	36-25 (0,5-2)	24-7 (2-15)	≤ 6 (> 15)
Meticillin	≥ 40 (≤ 1)	39-24 (1-5)	23-7 (5-35)	≤ 6 (> 35)
Sulfatiazol	≥ 40 (≤ 4)	39-27 (4-12)	26-7 (12-80)	≤ 6 (> 80)
Nalidixan *)	≥ 38 (≤ 4)	37-24 (4-16)	23-7 (16-100)	≤ 6 (>100)
Polymyxin	≥ 32 (≤ 0,5)	31-25 (0,5-5)	24-7 (5-100)	≤ 6 (>100)
Karbenicillin	≥ 45 (≤ 5)	44-25 (5-50)	24-7 (50-400)	≤ 6 (>400)
Kloramfenikol	≥ 40 (≤ 1,5)	39-25 (1,5-5)	24-7 (5-25)	≤ 6 (> 25)

\*) Anvendes kun til urinvejsinfektioner.

I hver kolonne er angivet følsomhedsgruppens zonediameter i mm og i parentes de tilsvarende IC<sub>50</sub> intervaller, for penicillin i enh./ml for andre stoffer i µg/ml.

For *Streptococcus faecalis* tolkes følsomheden over for aminoglykosider en gruppe lavere end svarende til den aflæste zonestørrelse, idet regressionskurven for disse bakterier er anderledes.

Skemaer som tabel 2 er inkomplette vejledninger for situationen in vivo, idet de ignorerer proteinbindingen, lipid/vandopløseligheden og lignende forhold, som har betydning for fordelingen af antibiotika mellem på den ene side serum og på den anden side væv, CNS, betændelsesfoci og indtrængen i legemets celler. Der tages heller ikke hensyn til evt. specielle forhold i betændelsesfoci, til udskillellesvejen af antibiotika eller til evt. specielle forhold ved infektioner i selve udskillellesvejen (fx. pH i urinvejene). Sådanne skemaer giver ingen oplysninger om, hvorvidt der kan være effekt af subinhibitoriske koncentrationer af antibiotika, eller om stofferne virker baktericidt eller kun bakteriostatisk; ej heller viser de, om der er synergisme/antagonisme mellem de enkelte antibiotikagrupper ved kombinationsbehandling.

Relationen  $IC_{50}$ /serumkoncentrationen ved "almindelig dosis" er ret upræcis. Dels er "almindelig dosis" af fx. penicilliner ikke nogen veldefineret størrelse; den har undergået en stigning i de senere år, og dels kan "serumkoncentration" betyde "peak", "middel" eller "lige før næste dosis". I almindelighed anbefales det at anvende middelværdien (Ericsson & Sherris 1971). I nogle tilfælde er en stamme heterogen med hensyn til følsomhed over for et antibiotikum, dvs. at klonens enkeltindivider har forskellig følsomhed, og man kan risikere, at kun de følsomme varianter bliver undersøgt. Systematiske studier af korrelationen mellem følsomhedsgrupperne og klinisk behandlingseffekt er relativt sjældent udført, men sådanne studier er naturligvis af afgørende betydning for relevansen af skemaer som tabel 2.

Ovenstående følsomhedsgrupper bruges i Skandinavien, mens nogle andre lande foretrækker færre følsomhedsgrupper (se Dornbusch et al. 1977). På svensk initiativ arbejdes der her i Skandinavien på at gennemføre en følsomhedsinddeling i tre grupper betegnet S = sensitiv, I = intermediær og R = resistent.

De regressionskurver, der ligger til grund for tabel 2, er udarbejdet med stammer som vokser under aerobe forhold og giver synlig vækst i løbet af 1 døgn. Såfremt regressionskurven fremstilles med langsommere voksende stammer, som først giver synlig vækst efter 48 timer, vil regressionskurven blive lidt fladere, idet prædiffusionsperioden nu ikke mere er så dominerende (sml. ligning (12)). Det medfører, at følsomme stammer (gruppe 3) har lidt større zoner, resistente stammer (gruppe 1-0) mindre og de middelfølsomme stammer (gruppe 2) nogenlunde uændrede zoner (Thomsen 1967). At følsomme stammers  $IC_{50}$  således bestemmes for lavt, gør ikke så meget, men at delvis resistente stammers  $IC_{50}$  bestemmes for højt kan spille en rolle ved lokalbehandling, da en behandlingsmulighed kan forpasses. Endnu langsommere voksende bakterier som fx. mykobakterier må resistensbestemmes ved hjælp af en fortyndingsmetode i stedet for agardiffusionsmetoden (Jensen 1949).

For anaerobe bakteriers vedkommende kan følsomheden udmærket bestemmes med agardiffusionsmetoden, selv med anvendelse af ikke-præreducerede substrater. I de fleste tilfælde kan man konstruere regressionskurver, som dog adskiller sig fra tilsvarende kurver med aerobe bakterier. I nogle tilfælde, fx. med kloramfenikol, angives spredningen i følsomhed dog at være for lille til at regressionskurver kan konstrueres, så man kun kan sige om en stamme er følsom eller resistent over for det pågældende antibiotikum. Da der er stor forskel i væksthastigheden mellem forskellige anaerobe arter — fx. vokser *Cl. perfringens* hurtigt og anaerobe kokker langsomt — har flere forfattere set sig nødsaget til at konstruere regressionskurver for hver art (Sapico et al. 1972; Dornbusch et al. 1975a, b; Kwok et al. 1975).

Thomsens (1967) metode har ikke været afprøvet på anaerobe bakterierarter, men da de ændrede regressionskurver ifølge litteraturen synes at kunne henføres til langsommere vækst, burde Thomsens metode med den lange prædiffusion være velegnet, og man ville forvente, at regressionskurver for anaerobe arter, der vokser frem på 1 døgn, ikke ville adskille sig væsentligt fra de tilsvarende "aerobe" regressionskurver. Indtil dette forhold er undersøgt, må man dog advare mod ukritisk at anvende aflæsningskemaet i tabel 2 til anaerobe arter.

### Valg af resistensbestemmelsesmetode

Ved udførelse af resistensbestemmelse af bakterier over for forskellige antibiotika skelner man mellem *primær* resistensbestemmelse, som udføres direkte med det modtagne prøvemateriale, og *sekundær* resistensbestemmelse, som udføres på isolerede kolonier efter dyrkning af prøvematerialet. Fordelen ved primær resistensbestemmelse ligger naturligvis i, at svaret kan foreligge 1 døgn tidligere end ved sekundær resistensbestemmelse, og dette er ofte vigtigt i den kliniske situation. Sekundær resistensbestemmelse kan ofte undværes, når den bakteriologiske diagnose er kendt, og en anden fordel er, at undersøgelsen kan udføres under standardiserede forhold for hver art med hensyn til lag-fase og inoculum og uden indflydelse fra andre bakterier i kulturen. Naturligvis kan resultatet af en primær resistensbestemmelse altid kontrolleres ved en sekundær resistensbestemmelse, hvis dette anses for påkrævet.

*Fortyndingsmetoderne* giver direkte MIC eller IC<sub>50</sub>, men egner sig kun til sekundær resistensbestemmelse. Agarfortyndingsmetoden er lidt bedre reproducerbar end bouillonfortyndingsmetoden og giver samme eller lidt lavere MIC og IC<sub>50</sub> end denne. Agarfortyndingsmetoden er desuden mere økonomisk med hensyn til tid og materiale, idet mange stammer kan undersøges på samme

plade, og den er mindre følsom over for forekomsten af enkelte resistente varianter eller forureninger i inoculum. Ved bouillonfortyndingsmetoden er aflæsningstidspunktet mere kritisk, men metoden kan til gengæld mekaniseres, så den bliver egnet til rutinebrug, og til mindre opgaver er den at foretrække fremfor agarfortyndingsmetoden, som kræver mere forberedelse med hensyn til pladestøbning, selv om pladerne kan holde sig i op til 1 uge i køleskab (Ericsson & Sherris 1971).

*Agardiffusionsmetoderne* egner sig både til primær og sekundær resistensbestemmelse, og i standardiseret form er deres variabilitet den samme eller lavere end agarfortyndingsmetoden når MIC aflæses, fordi der ikke er de "spring" i aflæsningen, som der er ved en 2-foldsfortyndingsrække (Ericsson & Sherris 1971). Når  $IC_{50}$  aflæses ved agarfortyndingsmetoden, har denne dog mindre variabilitet end agardiffusionsmetoderne. Agardiffusionsmetoderne er simple og hurtige at udføre, de er fleksible med hensyn til hvilke antibiotika man ønsker at bruge på pladen, og økonomiske, og de egner sig således bedre end fortyndingsmetoderne til arbejdet i et rutinelaboratorium. Anvendt på det primære prøvemateriale tildeler agardiffusionsmetoderne ydermere substratet en selektiv karakter med hensyn til forskel i antibiotikumresistens, som tillader isolering af resistente bakteriearter blandt følsomme arter i sidstnævntes hæmningszone omkring en given antibiotikumdisc. Nogle arter har endvidere et så konstant resistensmønster, at dette bliver en hjælp i diagnostisk henseende, og i epidemiologiske udredninger spiller en given stammes specielle resistensmønster ofte også en rolle som epidemiologisk markør. Endelig muliggør en inspektion af kolonimorfologien i hæmningszonens rand omkring  $\beta$ -laktam-antibiotika i en del tilfælde, at  $\beta$ -laktamase-produktion opdages.

På baggrund af ovenstående fordele er det ikke overraskende, at agardiffusionsmetoderne foretrækkes langt de fleste steder til rutinebrug. I diagnoseafdelingen og antibiotika-afdelingen har vi anvendt Thomsens disc-diffusionsmetode med 6 mm discs og 20 timers prædiffusion siden 1960. Fordelene ved denne metode sammenlignet med andre her i landet anvendte (ROSCO's tablet metode (Neosensitabs), oprindeligt udviklet af Erna Lund i samarbejde med ROSCO (Lund et al 1951) og udført med 1 times prædiffusion eller uden prædiffusion, K.A.Jensen disc-metode med 20 mm discs og en  $\frac{1}{2}$  times prædiffusion og Ericsson disc-metode (AB Biodisk) med 5 mm discs og  $\frac{1}{2}$  times forlænget lag-fase ved henstand ved stuetemperatur) er angivet tidligere og skal summeres op: koncentrationsgradienten fra depotet er stabiliseret og mere flad, hvilket medfører, at forskelle i inoculumstørrelse, lag-fase og væksthastighed i vidtgående grad elimineres, og at følsomme stammer får større, mens resistente stammer får mindre zoner. Thomsens metode er derfor også velegnet til primær resistensbestemmelse. Ulemperne ved den består i, at man dagligt må skønne over næste dags behov for resistensplader, og da

disc'ene almindeligvis tages af før tilsåningen, er der ringe mulighed for at opdage evt. ombytninger af disc-rækkefølgen. Overskydende plader, der har diffunderet i 20 + 24 timer i stedet for 20 timer, kan dog bruges i week-end'er, hvis man husker på, at den fladere koncentrationsgradient bevirker, at følsomme stammer får større og resistente stammer mindre zoner, mens middelfølsomme stammer har relativt uændrede zoner (Thomsen 1967). I øvrigt henvises til Thomsens (1967) sammenlignende undersøgelse over egen metode, K.A. Jensens metode, Lunds tabletmetode, Ericssons metode og Kirby et al.'s (1957) disc-metode.

### Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Thomsens agardiffusionsmetode med 20 timers prædiffusion* (Thomsen 1967)

#### *Substrat*

Seruminstituttets resistensplader (14 cm, 90 g, 6 mm tykke) som består af:

Defibrineret hesteblood	5,0 %
Glukose	0,35 %
NZ-amin, type B	0,25 %
Orthana gærekstrakt <sup>1)</sup>	0,125 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	0,8 %
KCl	0,33 %
Sæbe	0,001 %
So-Bi-gel agar tilsat ekstra Ca <sup>++</sup> og Mg <sup>++</sup>	1,2 %
pH: 7,1-7,3. Ca <sup>++</sup> : ca. 25 mg/l. Mg <sup>++</sup> : ca. 12 mg/l.	

<sup>1)</sup> (udvalgt specielt med henblik på lavt indhold af sulfonamidantagonister).

Ved resistensbestemmelse af *H. influenzae* fordeles umiddelbart før tilsåning af pladen 100 µl (2-3 dråber) 5% NAD-opløsning på pladens overflade med steril glasstav.

*NAD-opløsning 5%* (nicotinamid-adenin-dinucleotid = V-faktor): 1 ml i hætteglas. Opbevares ved -20°C. Åbnede hætteglas opbevares i køleskab.

Ved resistensbestemmelse af thymidin-krævende bakterier fordeles umiddelbart før tilsåning 100 µl (2-3 dråber) 0,2% thymidinopløsning på pladens overflade med steril glasstav.

*Thymidinopløsning* 0,2% (2 mg thymidin/ml 0,1 M HCl) opbevares ved 4°C.

*Antibiotika:* Resistenspladerne forsynes i antibiotika-afdelingen med tørrede discs indeholdende de relevante antibiotika (Schleicher & Schuell filterpapir-discs no. 2668, ø: 6 mm). Efter imbibering med antibiotika og tørring opbevares disc'ene i lukkede krukker med tætsluttende låg ved -22°C uden tab af aktivitet i op til flere år. Disc-indholdet fremgår af Tabel 1. Disc'ene anbringes på pladerne 2 cm fra randen og 4 cm fra hinanden. Der er plads til 7 discs pr. plade. Derefter prædiffunderes med låget på ved stuetemperatur i 20 timer, hvorefter disc'ene fjernes, og pladerne er klare til brug. Hvis de ikke bruges straks, stilles de i køleskab og forsynes med dato. Et døgn senere kasseres de, hvis de ikke er blevet anvendt.

For øjeblikket fremstilles følgende plader:

*"7-plade"*: præpareret med penicillin, streptomycin, sulfametoxazol/trimetoprim, gentamycin, tetracyclin, ampicillin, cefalotin (startende ud for ribben på petriskålen og følgende uret).

*Udvidet grampos. plade mærket med rød streg:* kanamycin, vancomycin, fucidin, erytromycin, linkomycin og meticillin.

*Udvidet gramneg. plade mærket med sort kryds:* polymyxin, karbenicillin, kloramfenikol og kanamycin.

*Urinplade mærket med sort streg:* sulfametoxazol/trimetoprim, gentamycin, tetracyclin, ampicillin, cefalotin, sulfatiazol og nalidixan.

*Udførelse:* Både ved primær resistensbestemmelse af den modtagne prøve og ved sekundær resistensbestemmelse af en kultur bør det tilstræbes at få en tæt, men ikke sammenflydende vækst. Ericsson & Sherris (1971) har angivet tal for bakterietætheden i det ideelle inokulum. Inokulums størrelse har speciel betydning ved bestemmelser med sulfonamid, sulfonamid/trimetoprim, kloramfenikol samt ved  $\beta$ -laktam-antibiotika, når det drejer sig om  $\beta$ -laktamase-producerende stammer.

#### *Primær resistensbestemmelse*

*Podninger:* Halvdelen af pladen tilsås med tætte, parallelle strøg, mens podepinden stadig rulles mellem fingrene, så alle dens sider udsås. Pladen vendes 90°, og proceduren gentages, så strøgene nu dels dækker et nyt område af pladen, dels dækker halvdelen af det første tilsåningsområde. Pladen vendes atter 90°, proceduren gentages, og den vendes for tredje og sidste gang 90° efterfulgt af samme procedure. Herved opnås, at hele overfladen bliver næsten ensartet tilsået.

*Uriner:* Hvis man ved mikroskopi af ikke-centrifugeret urin finder en eller flere bakterier pr. synsfelt, fortyndes urinen 1:20 med sterilt saltvand, og 100  $\mu$ l (2-3 dråber) spredes jævnt over pladen med steril glasstav.

*Ekspektorater*

1. *metode*: To klatter anbringes diametralt modsat hinanden 1 cm fra kanten af skålen og spredes med en bøjet steril glasstav i et bælte langs kanten. Med spidsen af den ombøjede del af staven inokuleres resten af pladen med tætte parallelle strøg fra kant til kant. Denne metode medfører, at det 2 cm brede bælte langs kanten af skålen tilsås tættere end den centrale del af pladen (Tung 1951; Dragsted & Erichsen 1953), hvorved problemet med fx. sulfonamidantagonister i et stort inokulum afhjælpes, men til gengæld bliver hæmningszonerne ofte "skæve".

2. *Metode*: En klat spredes jævnt over hele agarfladen med en steril glasstav eller vatpind.

Nogle laboratorier foretrækker at behandle ekspektorat med mukolytikum (fx. N-acetyl-L-cystein) og vaske det inden udsåningen, men det er en tidsrøvende metode.

*Trachealsug*: Materiale hentes op fra det fysiologiske saltvand med en pasteurpipette, og tilsåningen følger derefter ovenstående retningslinier.

*Pus og bundfald fra centrifugerede "væsker"* (fx. *spinalvæske*): En øsefuld spredes jævnt over agarfladen med en steril glasstav eller øsken.

*Sekundær resistensbestemmelse*

Det er i reglen ikke muligt at opnå et passende inokulum ved direkte overføring af kolonimateriale til resistenspladen og spredning med glasstav. Ericsson & Sherris (1971) anbefaler at flyde pladerne med 3–5 ml af en døgngammel bouillonkultur fortyndet  $10^{-4}$  (= ca.  $10^5$  kim/ml), når det drejer sig om de fleste gramneg. stave, eller  $10^{-3}$  (= ca.  $10^6$  kim/ml), når det drejer sig om *S. aureus* og enterokokker, og afpipettere overskydende væske. Thomsen (1967) anbefaler at tilså pladerne med 2–3 øsefulde af en suspension af kolonimateriale i sterilt saltvand, som spredes med steril glasstav. Suspensionen kan fx. laves således:

	Kolonimateriale	Saltvand
Gramneg. stave	1 øsefuld	10 ml
Stafylokokker	"	2 ml
<i>Strep. faecalis</i>	"	2 ml
<i>H. influenzae</i>	"	2 ml
Grampos. stave	"	2 ml
Pneumokokker	"	få dråber
Streptokokker iøvrigt	"	få dråber
Meningokokker	"	få dråber
Coryneforme stave	"	få dråber

Spredning med glasstav foretrækkes af Thomsen, da flydningen med den efterfølgende skråstilling af pladerne ved afpipetteringen kan få zonerne til at trække i pæreform. I alle tilfælde bør inokulum helst stamme fra flere kolonier (Ericsson & Sherris (1971) anbefaler 10) for at undgå at overse resistente varianter. Pladerne inkuberes med bunden i vejret ved 35–37°C til næste dag. Stabling af plader bør så vidt muligt undgås. Når det drejer sig om hurtigt voksende bakterier, kan resistensbestemmelsen dog allerede aflæses efter 5–6 timer. Kuldioxid-atmosfære anvendes kun, hvis væksten kræver det.

*Aflæsning:* Hæmningszonerne aflæses med mm-papir på selvholdende pincet eller med skydelære, og zonestørrelserne omsættes til følsomhedsgrupperne 3, 2, 1, 0 efter tabel 2, og dette følsomhedsgruppetal meddeles klinikerens. Med skydelære kan 1/10 mm's nøjagtighed opnås ved aflæsningen. Det er vigtigt at holde aflæsningsinstrumentet helt ned til zonerne for at undgå paralakseforskydning med undervurdering af zonestørrelsen til følge.

#### *Fejlkilder og forhold der kan vanskeliggøre måling af hæmningszonen*

(1) Partiel hæmningszone som overgang mellem fuld hæmning og fuld vækst ses især ved følsomme stafylokokkers penicillinzoner og ved kloramfenikol- og streptomycinzonerne. Ifølge Thomsen (1967) får man den bedste overensstemmelse med  $IC_{50}$ -værdierne ved kun at måle den del af zonen, hvor hæmningen er total, men i reglen måler man dog også den del af zonen med, der består af meget svag vækst (Ericsson & Sherris 1971).

(2) Ved sulfonamid-resistensbestemmelse kan der ofte være vækst i hele hæmningszonen af små kolonier, således at zonen afgrænsning udgøres af en mere eller mindre skarp grænse mellem denne svage vækst og den normale vækst. Fænomenet skyldes formentlig inokulatets varierende indhold af sulfonamid-antagonister, der i nogle tilfælde muliggør dannelse af små kolonier før hæmningen indtræder, og fænomenet svinder ved fortynding af inokulatet. Af samme grund kan meget uensartet tilsåning af pladen medføre tungeformede indvækstpartier i sulfonamidzonen. I begge tilfælde bør den største zone tages som udtryk for følsomheden.

(3) Sværmning af fx. proteus-arter ind i hæmningszonen omkring visse antibiotika, fx. kloramfenikol, skal ignoreres og den under sværmningsløret liggende hæmningszone aflæses.

(4) *S. aureus* stammer som danner ekstracellulært  $\beta$ -laktamase, afsløres ved at hæmningszonerne omkring  $\beta$ -laktamase-følsomme antibiotika (penicillin, ampicillin, karbenicillin og i nogen grad cefalosporin) er skarpt definerede uden lysering, men med enkeltstående større kolonier i zoneranden, idet bakterierne har nedbrudt penicillin og i tilgift fået bedre vækstbetingelser på dette sted. Drejer det sig om ikke- $\beta$ -laktamase-producerende stammer, kan

en mindre veldefineret overgangszone med mindre kolonier iagttages, og væksten perifert for zonegrænsen er ofte præget af sekundær lysering med tab af pigment. For  $\beta$ -laktamase-producerende *S. aureus* stammers vedkommende er hæmningszonens størrelse omkring penicillin, ampicillin og karbenicillin helt afhængig af inoculums størrelse. Konstateres der  $\beta$ -laktamase-produktion hos en *S. aureus*, skal følsomheden — uafhængig af hæmningszonens størrelse — for penicillin, ampicillin og karbecillin angives som *I* eller *tv* (dvs. tvivlsomt om klinisk effekt kan opnås). Hvad angår  $\beta$ -laktamase hos gramneg. stave, så er denne cellebundet, hvorfor inoculum-afhængigheden er mindre eller ikke til stede (Sykes & Matthew 1976), og i disse tilfælde angives stammens følsomhed som svarende til den aktuelt målte hæmningszone. Der skal i øvrigt gøres opmærksom på, at der findes flere anbefalelsesværdige, nemme måder til påvisning af  $\beta$ -laktamaseproduktion (Sykes & Matthew 1976), fx. spaltning af kromogent cefalosporin, og en vejledning kan fås i antibiotikaafdelingen. Hvis en penicillin-følsom stamme forekommer i blanding med en  $\beta$ -laktamase-producerende stamme, kan sidstnævnte i nogle tilfælde ødelægge så meget penicillin, at der optræder en slags satellit-fænomen i hæmningszonen med følsomme kolonier omkring  $\beta$ -laktamase-producerende kolonier og evt. en generelt nedsat hæmningszone for den ellers følsomme stamme.

(5) Meticillin-resistente stafylokokstammer er en heterogen blanding af følsomme og resistente varianter. Ved resistensbestemmelse over for meticillin ved 37°C vil sådanne stammer ofte tolkes som følsomme, da de resistente varianter ved den temperatur gror langsomt i tilstedeværelse af meticillin. Udføres bestemmelsen ved lavere temperatur (35° og især 30°C), vil de resistente kolonier gro frem på 1 døgn (Ericsson & Sherris 1971; Brown & Kothari 1974). Hvis stafylokokker er meticillin-resistente, angives i svaret at de også er resistente over for cefalosporiner, og særskilt oplysning om følsomheden over for cefalosporiner skal i sådanne tilfælde ikke meddeles.

(6) Sulfonamid/trimetoprim: Selv om hæmningszonen viser fuld følsomhed, kan det dog ikke dermed afgøres, om stammen er følsom over for hvert enkelt af de to stoffer i blandingen. Såvel sulfonamid-følsomme, trimetoprim-resistente som sulfonamid-resistente, trimetoprim-følsomme stammer forekommer. Af den grund burde bakteriestammer altid undersøges for følsomhed over for både sulfonamid og trimetoprim særskilt og nogle laboratorier praktiserer også dette. I Seruminstituttets rutineplader indgår imidlertid kun sulfonamid særskilt og ikke på alle standardplader. En særskilt resistensbestemmelse over for sulfonamid skal imidlertid altid foretages og meddeles samtidig med resistensbestemmelse over for blandingen sulfonamid/trimetoprim.

(7) Anaerob inkubation, inkubation i CO<sub>2</sub>-atmosfære: se p. 388.

(8) Det kan anbefales ved alle agardiffusionsmetoder dagligt at resistensbestemme en kendt kontrolstamme sideløbende med de ukendte stammer; dette har naturligvis specielt betydning ved nye batches af substrat eller discs og tabletter.

(9) Såfremt zonerne er teknisk tilfredsstillende, og såfremt nedbrydning af antibiotikum ikke forekommer ( $\beta$ -laktamase), så kan flere stammers resistensmønster undertiden godt aflæses på en primær resistensbestemmelsesplade.

*Fortolkning:* De aflæste zonestørrelser omsættes til følsomhedsgrupper (se tabel 2) under hensyntagen til ovenstående punkter nævnt under fejlkilder. Spredningen på metoden er 3–5 gange større end ved agarfortyndingsmetoden (se p. 382), så usikkerheden på bestemmelsen af en  $IC_{50}$  ved en given zonestørrelse er af størrelsesorden  $\frac{1}{3}$  til 1 fortyndingstrin, afhængig af det pågældende antibiotikum (Thomsen 1967).

*Anvendelse:* Foruden kendskab til en given stammes følsomhed over for forskellige antibiotika (resistensmønster) er det nødvendigt for den behandlende læge at have viden om infektionens art og lokalisation, tilstanden af patientens egne forsvarsmekanismer, de forskellige antibiotikas farmakokinetik, proteinbinding, fordeling, metabolisering og udskillelse, deres bakteriostatisk eller baktericide virkning, eventuelle interaktioner med andre farmaka, herunder andre antibiotika (antagonisme/synergisme) og deres administrationsform, bivirkninger og pris, førend det rette valg af antibiotisk behandling kan foretages. Det må endvidere huskes, at kun ét antibiotikum fra hver gruppe (tabel 1) indgår i resistensbestemmelsen, og forskelle mellem gruppernes enkelte medlemmer findes. Med disse forudsætninger er de oplysninger, som resistensbestemmelsen giver klinikeren, af afgørende betydning for instituering eller justering af antibakteriel kemoterapi. For det klinisk-mikrobiologiske laboratorium har resultaterne som tidligere omtalt desuden ofte orienterende værdi i species-diagnostikken og i epidemiologisk henseende.

### Sikkerhedsforanstaltninger

Flydning af plader rummer en særlig risiko.

**Referencer:** se referencelisten efter kapitel 40.

## Kapitel 40

### Koncentrationsmåling

Betingelsen for at kunne måle koncentrationen af et antibiotikum i biologiske væsker med agardiffusionsmetoden er, at man råder over en bakteriestamme, der er følsom for det pågældende antibiotikum, men resistent over for andre væksthæmmende stoffer i disse væsker, herunder andre antibiotika og legemets egne bakteriebeskadigende stoffer (fx. lysozym og laktoferrin). Legemets egne bakteriebeskadigende stoffer spiller sjældent nogen rolle ved agardiffusionsmetoden, men det gør den samtidige tilstedeværelse af andre antibiotika. Det er i dag reglen snarere end undtagelsen, at patienter behandles med kombinationer af antibiotika. Specielt hyppig er en kombination af et  $\beta$ -laktam-antibiotikum og et aminoglykosid. For at kunne måle koncentrationen af et antibiotikum i tilstedeværelse af et eller flere andre, uden at disse måles med, har man udviklet flere metoder:

- 1) Den simpleste og mest udbredte metode er at bruge en bakteriestamme, der er følsom for det antibiotikum, der ønskes bestemt, men resistent over for andre tilstedeværende antibiotika. Da mange forskellige kombinationer af antibiotika bliver benyttet i klinikken, er det nødvendigt for laboratoriet at have en større kollektion af bakteriestammer med forskellige, kendte resistensmønstre.

- 2) En anden udbredt metode består i selektivt at inaktivere det antibiotikum, der ikke ønskes målt, men denne metode kan kun anvendes for et mindre antal antibiotika.  $\beta$ -laktam-antibiotika (penicilliner, cefalosporiner) kan inaktiveres med enzymet  $\beta$ -laktamase. Tetracyclin kan inaktiveres ved chelering med  $Mg^{++}$  tilsat substratet. Streptomycin-aktivitet kan elimineres ved tilsætning af semicarbazid-hydroklorid til substratet. Sulfonamid kan inaktiveres ved tilsætning af p-aminobenzoesyre til substratet og både sulfonamider og trimetoprim ved tilsætning af thymidin. Polymyxin og  $\beta$ -laktam-antibiotika kan måles i tilstedeværelse af aminoglykosider, hvis pH i substratet sænkes til 5,5–6,0 (Sabath et al. 1971; Malmborg 1974).

- 3) En tredje, sjældnere brugt metode er at separere de forskellige antibiotika i blandingen, fx. ved kromatografi eller elektroforese, før målingen (se Malmborg 1974).

Med agardiffusionsmetoden måles kun mængden af aktivt stof, men ikke de inaktive metaboliseringsprodukter. Når agardiffusionsmetoden anvendes til koncentrationsmålinger er man fri for de standardiseringsproblemer, som er en følge dels af væksten (inoculum, lag-fase og væksthastighed), dels af diffusionen når metoden anvendes til resistensbestemmelse. Man anbringer nemlig ved hver undersøgelse kendte opløsninger af det pågældende antibiotikum på pladen sammen med den ukendte prøve, så man får bestemt standardkurven (ligning (11), kap. 38) og derved bliver i stand til, efter at have bestemt den ukendte prøves hæmningszone, at interpolere sig til prøvens antibiotikum-indhold. Det er naturligvis en betingelse, at der er anvendt samme slags biologisk væske til standardopløsningerne af antibiotikum som til prøven, og det vil i de fleste tilfælde sige serum.

### Valg af metode

Selv om der er udarbejdet mange varianter af agardiffusionsmetoden til bestemmelse af antibiotikumkoncentrationer, bygger de på samme princip og adskiller sig hovedsageligt kun ved mængden af det prøvemateriale, der kræves, samt ved følsomheden og væksthastigheden af den anvendte tekstbakterie. Den nødvendige prøvemængde kan nedsættes ved at bruge disc i stedet for agarcup. Når der anvendes disc, vil metodens følsomhed men også risikoen for en øget usikkerhed stige ved anvendelse af tynde plader. Metodens hurtighed øges, hvis man bruger hurtigt voksende bakterier, men da de fleste toksiske antibiotika kun gives hver 8. time, er et hurtigt svar ikke så påkrævet. I det følgende beskrives en agarcup-metode og en disc-metode, som begge anvendes i antibiotika-afdelingen.

### Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Agarcup- og disc-metoden* (Rosdahl et al. 1969)

*Prøvemateriale:* Blod uden tilsætning eller serum, urin, spinalvæske, sekret og andre legemsvæsker. Blod tages ved venepunktur i Seruminstittets silikonerede plastrør med grønt skruelåg, og andre legemsvæsker forsendes i samme slags prøverør. Til agarcup-metoden ønskes ca. 2 ml serum eller andet prøvemateriale. Til disc-metoden tages blod i 4 hepariniserede kapillærrør fra øreflip, fingerpulpa eller hæl. Hvert rør giver 25–30  $\mu$ l serum. Prøverne opbevares og forsendes ved 4°C, hvor antibiotika er holdbare i mindst 24 timer. Efter centrifugering afpipetteres serum, som anvendes til koncentrationsbestemmelsen. Det er ligegyldigt, om serum udvindes med det samme eller 24 timer efter prøvetagningen, og prøvematerialet behøver ikke at være sterilt, men mikrobiel vækst må dog selvfølgelig undgås.

*Substrat og andet udstyr*

Seruminstituttets resistensplader (se kap. 39 side 390)

6 mm filtrerpapirdiscs (se kap. 39 side 391)

Propbor,  $\varnothing$ : 9 mm

Penase (Leo), 100.000 enh/ml

Standardopløsninger af antibiotika i poolet humant serum

Bakteriestammer med kendt selektiv følsomhed (teststammer)

*ad standardopløsninger af antibiotika:* Disse fremstilles som stamopløsninger i sterilt destilleret vand eller speciel solvens (penicilliner og cefalosporiner), fx. 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  af antibiotikumpræparationer særligt beregnet til dette formål, og opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$  i små portioner. Antibiotika til klinisk brug er ofte tilsat conserveringsmiddel og kan derfor ikke bruges. Stamopløsningernes holdbarhed ved  $-20^{\circ}\text{C}$  fremgår af tabel 3. Standardopløsningerne fremstilles i poolet humant serum eller i sterilt fysiologisk saltvand til henholdsvis måling af antibiotika i serum eller fx. spinalvæske, hvor dog Hammerberg et al. (1978) hævder, at serum er det bedste. Urinprøver fortyndes med serum (1+9), hvorefter en serumstandard kan bruges. Standardrækkerne med serum holder sig for de fleste antibiotikas vedkommende i 1 uge ved  $4^{\circ}\text{C}$ , bortset fra penicilliner, cefalosporiner og tetracykliner, der kun er holdbare 1 dag. Standardrækken består af 4 forskellige koncentrationer, fx. i 3-foldsfortyndinger, som dækker de klinisk relevante koncentrationer. Eksempelvis kan anføres gentamycin i serum: 1,1-3,3-10-30  $\mu\text{g}$  gentamycinbase/ml serum.

*ad teststammerne:* Et sæt af teststammerne opbevares frysetørret. Til daglig kan følgende fremgangsmåde anvendes: Stammerne opbevares på plade ved  $4^{\circ}\text{C}$  og omså ugentligt. Herfra tilsås bouillonkulturer 2 gange ugentligt. Efter fremvækst opbevares disse bouillonkulturer ved  $4^{\circ}\text{C}$ , og herfra laves fortyndinger til tilsåning af koncentrationsmålingspladerne. Der udarbejdes en "journal" for hver teststamme med angivelse af hæmningszonestørrelse over for alle de anvendte antibiotika og oplysninger om stammens særlige anvendelsesområde. Resistensmønstret kontrolleres af og til og de nye hæmningszonediametre indføres i journalen.

Tabel 3: Holdbarhed af antibiotikaopløsninger til brug ved koncentrationsmåling

Antibiotika i destilleret vand eller solvens	Holdbarhed ved -20°C
Colimycin-sulfat i vand	1 år
Cefalotin i solvens	1 år
Cefalexin i vand	10 mdr.
Clindamycin i vand	10 mdr.
Erytromycin i vand	6 mdr.
Gentamycin-sulfat i vand	1 år
Fucidin i vand	1 år
Kanamycin-sulfat i vand	1 år
Kloramfenikol i vand	1 år
Lincomycin i vand	1 år
Polymyxin-sulfat i vand	1 år
Streptomycin-sulfat i vand	1 år
Dihydrostreptomycin i vand	1 år
Tobramycin i vand	1 år
Trimetoprim i vand	1 år
Vancomycin i vand	1 år

Penicilliner opløst i solvens er ikke stabile i længere tid ved -20°C, men er holdbare i 1 uge ved 4°C. Tetracykliner opløst i vand er ligeledes holdbare i 1 uge ved 4°C, men ikke i længere tid ved -20°C.

### Prøvens udførelse

#### *Agarcup-metoden*

Substratet tilsås ved flydning med 3-5 ml af en passende suspension af teststammen, som er følsom for det antibiotikum, der skal måles, og resistent over for eventuelle andre antibiotika i prøven. Der tilstræbes en tæt, men ikke sammenflydende vækst, og for at opnå dette skal fx. en døgngammel bouillonkultur af en gramneg. stavbakterie fortyndes  $10^{-3}$  til  $10^{-4}$  og *S. aureus* og enterokokker  $10^{-2}$  inden tilsåningen (det svarer til ca.  $10^5$  til  $10^6$ , henholdsvis  $10^7$  kim/ml). Overskydende væske suges fra med pasteurpipette, og pladen stilles til tørring ved 35-37°C i ca.  $\frac{1}{2}$  time. Når pladen er tør, udstanses med et flamberet afkølet propbor 7 huller (ø: 0,9 cm) tværs gennem agaren ikke nærmere end 2 cm fra kanten af skålen og 4 cm fra hinanden. Eventuelt kan anvendes et specielt bor tilsluttet luftsug og en skabelon til de 7 huller

for at lette arbejdet (Bang & Bentzen 1947). Bunden af hullerne kan eventuelt forsegles med 2 dråber smeltet agar, men det er i reglen ikke nødvendigt. De fire standardopløsninger og prøven pipetteres hurtigt efter hinanden i hullerne, som skal fyldes til randen (ca. 0,3 ml). (Der laves tredobbelt bestemmelse af prøvens antibiotikumindhold, dvs. prøven fyldes i 3 huller fordelt mellem de 4 huller med standardopløsningerne). Pladen henstår i 15 min. eller længere ved stuetemperatur (det er ikke nødvendigt, men det øger hæmningszonernes størrelse) og inkuberes herefter ved 35–37°C på vandret underlag med låget opad.

#### *Disc-metoden*

Substratet tilsås som ovenfor, men i stedet for huller i agaren anbringes 16 filterpapirdiscs på agaroverfladen, og 20 µl standard eller prøve pipetteres hurtigt med Carlsberg-pipette på hver disc, inden disse suger væske fra pladen. Inkubering som ovenfor anført.

#### *Inaktivering af β-laktam-antibiotika med penase*

Ved agarcup-metoden fyldes prøvehullet med 100.000 enh./ml penase (dvs. ca. 30.000 enheder i hullet), og efter 5–10 minutters diffusion suges resten af penasen op af hullerne, hvorefter prøverne og standarderne pipetteres i. Det er ikke nødvendigt at komme penase i standardrækkernes huller. Ved disc-metoden dyppes hver disc i en opløsning af 100.000 enh. penase/ml dest. vand og tørres i ca.  $\frac{3}{4}$  time ved 37°C. Hver disc vil så indeholde ca. 5000 enh. penase, og disc'ene er nu klar til anbringelse på pladen og påpipettering af prøven og standarderne. Discs til standardrækken skal også imbiberes med penase. Større portioner af imbiberede og tørrede discs kan evt. opbevares i lukkede flasker i flere måneder ved -20°C (Justesen 1973).

#### *Inaktivering af sulfonamid*

Til dette formål anvendes plader med det almindelige resistensbestemmelses-substrat tilsat p-aminobenzoesyre (20 µg/ml), som bestilles specielt fra substratafdelingen.

De andre inaktiveringsmetoder bruges ikke i praksis på Seruminstituttet.

#### *Aflæsning*

Hæmningszonerne aflæses (se tidligere under resistensbestemmelse i kap. 39), og gennemsnittet af de tre målinger for den ukendte prøve udregnes. Resultaterne fra standardrækken tegnes ind på semilogaritmisk papir (koncentrationen afsættes ud ad den logaritmiske akse og zonediameteren i mm ud ad den aritmetriske akse). Punkterne forbindes, og herved fås en ret, eller næsten ret linie (standardkurven fig. 1), idet det egentlig er kvadratet på zone-radius (eller kvadratet på zonediameter) der er lineært relateret til log. konc. Standardkurven kan også beregnes ud fra ligning (11) eller ved hjælp af "mindste kva-

draters metode" (Malmberg 1974). Antibiotikumkoncentrationen i den ukendte prøve findes ved interpolation på standardkurven eller ved beregning. Ekstrapolering ved forlængelse af standardkurven uden for højeste og laveste standardkoncentration undgås, og i stedet for anføres, at prøvens koncentration er større, henholdsvis lavere end denne værdi. Aflæsning kan foretages efter 6-8 timer, afhængig af stammens væksthastighed.

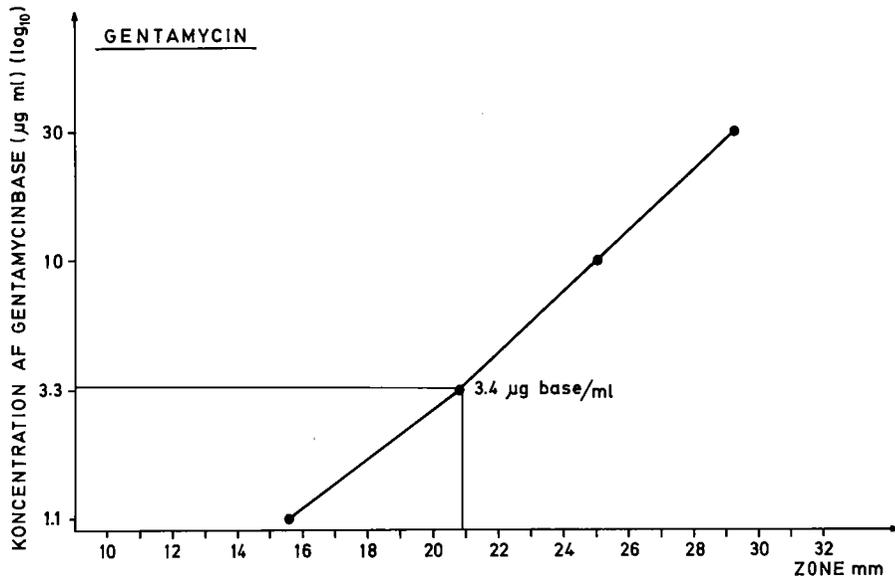


Fig. 1: Eksempel på koncentrationsbestemmelse af gentamycin i serum.

	Zonediameter (mm)	Koncentration af gentamycinbase (µg/ml)
Standard 1:	29,3	30
Standard 2:	25,1	10
Standard 3:	20,8	3,3
Standard 4:	15,6	1,1
Prøve:	20,9	
Prøve:	21,0	
Prøve:	20,8	
Prøvegennemsnit:	20,9	3,4 µg gentamycinbase/ml serum

### *Fejlkilder*

(1) Hvis oplysninger om anden antibiotisk terapi mangler, vil man risikere at få forkerte høje koncentrationer, idet andre antibiotika kommer med i bestemmelsen, hvis teststammen er følsom for dem.

(2) Ved fejlagtigt valg af teststamme, som ikke er følsom for det pågældende antibiotikum, vil prøvens (og standardernes) indhold blive bestemt til 0.

(3) Ved måling af antibiotikum i sekreter fra slimhinder kan tilstedeværende lysozym og laktoferrin give hæmningszoner, der fejlfortolkes som antibiotisk aktivitet. Dette kan der korrigeres for ved tillige at måle med en teststamme, som er resistent over for det antibiotikum, der skal måles, men har samme følsomhed for lysozym og laktoferrin (Malmberg 1974).

(4) Hvis diffusionen ikke foregår på vandret underlag, kan der optræde skæve zoner.

(5) Citratblod giver større tetracyklinzoner på grund af binding af divalente kationer.

(6) Heparin hæmmer aminoglykosiders aktivitet og nedsætter derfor deres zoner. Er prøven heparinplasma, bør standarderne også være fremstillet i heparinplasma.

### *Følsomhed*

1 µg/ml eller betydeligt derunder, afhængigt først og fremmest af testbakteriens følsomhed, men også af depotets størrelse og for discs-metoden af pladens tykkelse.

### *Fortolkning*

Fortolkningen af resultatet er helt afhængig af oplysninger om tidspunkt for sidste indgift af antibiotikum og for prøvetagningen, dosisstørrelse, doseringsinterval, administrationsmåde (i.v., i.m., peroralt), anden antibiotisk terapi inden for de sidste 3 døgn og nyrefunktionen. Forudsat at disse oplysninger foreligger, fremgår det af resultatet: 1) om patienten har tilstrækkelig høj koncentration i serum af det pågældende antibiotikum til at et godt terapeutisk resultat kan forventes, eller 2) om patienten har for høj en koncentration i serum af det pågældende antibiotikum eller akkumulerer dette med risiko for toksiske bivirkninger. Betingelsen for på korrekt måde at udnytte disse oplysninger ved vurdering af måleresultatet er, at prøvetagningen er sket på passende tidspunkt i forhold til tidspunkterne for antibiotikumindgift. Der er to forskellige fremgangsmåder at vælge imellem: Den almindeligste er at tage en prøve umiddelbart før næste indgift af antibiotikum for at få oplysning om akkumulering af antibiotika. Derefter tages en prøve 15–30 min.

efter i.v., 1 (evt. 2) timer efter i.m. eller 2 timer efter peroral indgift for at se, dels om terapeutisk niveau er nået, dels om toksisk niveau overskrides. Den anden fremgangsmåde er at bestemme koncentrationen fx. 1½ time og 3 timer efter i.m. indgift og derefter beregne halveringstiden for det pågældende antibiotikum hos patienten. Resultaterne fra hver af disse to fremgangsmåder anvendes så til tilpasning af antibiotikumdosering i den nærmest følgende tid.

Det skal understreges, at de angivne metoder måler den totale (frie og proteinbundne) koncentration af aktivt antibiotikum, såfremt standarderne er fremstillet i samme slags væske som prøven. Ydermere at resultatet kun siger noget om koncentrationen i den pågældende væske, men intet direkte om koncentrationen på infektionsstedet.

*Tabel over toksiske grænseværdier for de hyppigst målte antibiotika 2 timer efter i.m. indgift*

Penicilliner:	12 enheder i spinalvæske
Streptomycin:	40 µg/ml i serum
Kanamycin:	50 ”
Gentamycin:	10 ”
Tobramycin:	10 ”
Colistin:	10 ” (= 300 enh/ml)
Vancomycin:	40 ”

*Terapeutisk niveau* for antibiotikakoncentrationer i serum afhænger dels af bakterieartens MIC, dels af infektionens lokalisation. I almindelighed regner man med, at den maximale serumkoncentration skal være mindst 5 gange højere end bakterieartens MIC for at opnå klinisk effekt ved generelle infektioner. Der henvises i øvrigt til tabel 2 og kap. 39 p. 384.

#### **Sikkerhedsforanstaltninger**

Ingen særlige, men husk at mundpipettering ikke må finde sted.

## Samlet referenceliste for kapitlerne 38-40

- Abraham, E.P. & Chain, E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146: 837, 1940.
- Abraham, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A. & Florey, H.W.: Further observations on penicillin. *Lancet* 2: 177, 1941.
- Alicino, J.F.: Iodometric method for the assay of penicillin preparations. *Industrial and engineering Chemistry* 18: 619, 1946.
- Bang, J. & Bentzen, O.: A more rapid and reliable technique for preparing "agar cups" especially in soft media. *Acta pharmacol.* 3: 252, 1947.
- Bang, J.: Zone formation in the agar-cup method for determining resistance to antibiotics. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 111: 192, 1955.
- Bang, J.: Formation of the inhibition zone in the sensitivity test (agar diffusion technique). *Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy. Proc. 6th Int. Congr. Chemotherapy* 2: 945, 1970a.
- Bang, J.: The effect of a long prediffusion period on the sensitivity test. *Ibid.* 2: 947, 1970b.
- Bechhold, H. & Ehrlich, P.: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung. Ein Beitrag zum Studien der "inneren Antisepsis". *Hoppe-Seyl. Z.* 1906 (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 64, 1960).
- Beer, E.J. de & Sherwood, M.B.: The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances. *J. Bact.* 50: 459, 1945.
- Behring, E.: Ueber Desinfection, Desinfektionsmittel und Desinfektionsmethoden. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 9: 395, 1890.
- Bratton, A.C. & Marshall, E.K., jr.: A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. biol. Chem.* 128: 537, 1939.
- Brodersen, R.: Inactivation of Penicillin in Aqueous Solution. *Disputats, Munksgaard, Copenhagen* 1949.
- Brown, D.F.J. & Kothari, D.: The reliability of methicillin sensitivity tests on four culture media. *J. clin. Path.* 27: 420, 1974.
- Brown, D.F.J. & Kothari, D.: Comparison of tablets and paper discs for antibiotic sensitivity testing. *J. clin. Path.* 28: 983, 1975.
- Buchner, H.: Ueber die bakterientödtende Wirkung des zellefreien Blutserums. *Centralbl. Bakt.* 5: 817, 1889.
- Buchner, H.: Ueber die bakterientödtende Wirkung des zellefreien Blutserums. *Centralbl. Bakt.* 6: 1, 1889.
- Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J. & Sanders, A.G.: Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 2: 226, 1940.
- Colebrook, L., Buttle, G.A.H. & O'Meara, R.A.Q.: The mode of action of p-aminobenzenesulphonamide and prontosil in haemolytic streptococcal infections. *Lancet* 2: 1323, 1936.
- Cooper, K.E. & Woodman, D.: The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *J. Path. Bact.* 58: 75, 1946.
- Cooper, K.E. & Gillespie, W.A.: The influence of temperature on streptomycin inhibition zones in agar cultures. *J. gen. Microbiol.* 7: 1, 1952.

- Cooper, K.E. & Linton, A.H.: The importance of the temperature during the early hours of incubation of agar plates in assays. *J. gen. Microbiol.* 7: 8, 1952.
- Cooper, K.E., Linton, A.H. & Sehgal, S.N.: The effect of inoculum size in inhibition zones in agar media using staphylococci and streptomycin. *J. gen. Microbiol.* 18: 670, 1958.
- Cooper, K.E.: The Theory of Antibiotic Inhibition Zones. In: Kavanagh, F. (ed.): *Analytical microbiology*. Acad. Press Inc. New York 1963, p. 1.
- Domagk, G.: Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. med. Wschr.* 1: 250, 1935.
- Dons, N.: Eksperimentelle og kliniske undersøgelser over effekten af penicillin overfor infektioner med penicillinasedannende stafylokokker. Disputats, København 1966.
- Dornbusch, K., Nord, C.-E. & Olsson, B.: Antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria by the standardized disc diffusion method with special reference to *Bacteroides fragilis*. *Scand. J. infect. Dis.* 7: 59, 1975a.
- Dornbusch, K., Nord, C.-E. & Olsson, B.: Regression line analysis for five antibiotics with strains of *Clostridium* species. *Scand. J. infect. Dis.* 7: 135, 1975b.
- Dornbusch, K., Ericson, C., Kallings, L.O., Kamme, C., Nordbring, F., Norrby, R. & Wallmark, G.: Resistensbestämning av bakterier mod antibiotika. Förslag till känslighet-gruppering m.m. Rapport från "Referensgruppen för Antibiotikafrågor", Stockholm, oktober 1977.
- Dragsted, P.J.: Det teoretiske grundlag for indgift og dosering af penicillin belyst ved kliniske og eksperimentelle undersøgelser. Disputats, Munksgaard, København 1949.
- Dragsted, P.J. & Erichsen, I.: Technique for direct resistance determination of the bacterial flora in sputa. *Acta path. microbiol. scand.* 32: 383, 1953.
- Ehrlich, P. & Shiga, K.: Farbtherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. *Berl. klin. Wschr.* 1904. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 24, 1960).
- Ehrlich, P. & Gonder, R.: Chemotherapie. In: Kolle, W. & Wassermann, A. von (Eds.): *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Band III. Gustav Fischer, Jena 1913. p. 22.
- Ehrlich, P. & Gonder, R.: Experimentelle Chemotherapie. In: Barth (ed.) *Handb. path. Protozoen*, Leipzig 1914. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 559, 1960).
- Ericsson, H., Högman, C. & Wickman, K.: A paper disk method for determination of bacterial sensitivity to chemotherapeutic and antibiotic agents. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 6: Suppl. 11: 23, 1954.
- Ericsson, H. & Svartz-Malmberg, G.: Determination of bacterial sensitivity in vitro and its clinical evaluation. *Antibiotica et Chemotherapia* 6: 41, 1959.
- Ericsson, H.: Rational use of antibiotics in hospitals. Thesis, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 12: Suppl. 50, 1960.
- Ericsson, H. & Sherris, J.C.: Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta path. microbiol. scand.* B, Suppl. 217, 1971.
- Eriksen, K. Riewerts: Penicillinresistente stafylokokker. Deres egenskaber og opståelsesmåde samt det teoretiske grundlag for behandling af stafylokokinfektioner med antibiotika. Disputats, København 1965.
- Erlanson, P.: Determination of the sensitivity in vitro of bacteria to chemotherapeutic agents with special reference to routine tests. Thesis, *Acta path. microbiol. scand.* Suppl. 85, 1951.

- Espersen, E.: Undersøgelser over streptomycinresistente tuberkelbacilstammer, virkning af paraaminosalicylsyre (PAS) på tuberkelbaciller og kombineret virkning af streptomycin-penicillin, streptomycin-sulfathiazol samt streptomycin-PAS på tuberkelbaciller. Disputats, Munksgaard, København 1951.
- Felke, H.: Das Verhalten der Gonokokken gegenüber der Chemotherapie. (Ein Beitrag zum Problem der sogenannten Versager). *Klin. Wschr.* 18: 568, 1939.
- Ferone, R., Bushby, S.R.M., Burchall, J.J., Moore, W.D. & Smith, D.: Identification of Harper-Cawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diaminopyrimidines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 91, 1975.
- Finney, D.J.: Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. Univ. Press, Cambridge 1947.
- Fleming, A.: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. roy. Soc. B* 93: 306, 1922.
- Fleming, A.: A comparison of the activities of antiseptics on bacteria and on leucocytes. *Proc. roy. Soc. B* 96: 171, 1924.
- Fleming, A.: On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. exp. Path.* 10: 226, 1929.
- Fleming, A.: The antibacterial action in vitro of 2-(*p*-aminobenzenesulphonamido) pyridine on pneumococci and streptococci. *Lancet* 2: 74, 1938.
- Fleming, A.: In-vitro tests of penicillin potency. *Lancet* 1: 732, 1942.
- Foster, J.W.: Quantitative estimation of penicillin. *J. biol. Chem.* 144: 285, 1942.
- Foster, J.W. & Woodruff, H.B.: Microbiological aspects of penicillin. I. Methods of assay. *J. Bact.* 46: 187, 1943.
- Foster, J.W. & Woodruff, H.B.: Microbiological aspects of penicillin. VI. Procedure for the cup assay for penicillin. *J. Bact.* 47: 43, 1944.
- Fuller, A.T.: Is *p*-aminobenzenesulphonamide the active agent in prontosil therapy? *Lancet* 1: 194, 1937.
- Gallardo, E.: Sensitivity of bacteria from infected wounds to penicillin. II. Results in one hundred and twelve cases. *War Med.* 7: 100, 1944.
- Gotschlich, E.: Desinfektionslehre (Bakteriologischer Teil.). In: Kolle, W. & Wassermann, A. von (Eds): *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Band III, Gustav Fischer, Jena, 1913, p. 443.
- Guttman, P. & Ehrlich, P.: Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berl. klin. Wschr.* 1891. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 9, 1960).
- Hagerman, G.: Studien zur Chemoresistenz der Gonokokken. Mittels einer neuen Methode zur Bestimmung der Chemoresistenz in vitro. Thesis, *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 46, 1942.
- Hammerberg, S., Sinai, R. & Marks, M.I.: Serum standards for the bioassay of aminoglycosides in cerebrospinal fluid. *J. clin. Path.* 31: 172, 1978.
- Heatley, N.G.: A method for the assay of penicillin. *Biochem. J.* 38: 61, 1944.
- Herriott, R.M.: A spectrophotometric method for the determination of penicillin. *J. biol. Chem.* 164: 725, 1946.
- Hoyt, R.E. & Levine, M.G.: A method for determining sensitivity to penicillin and streptomycin. *Science*, 106: 171, 1947.
- Humphrey, J.H. & Lightbown, J.W.: A general theory for plate assay of antibiotics with some practical applications. *J. gen. Microbiol.* 7: 129, 1952.

- Jensen, K.A., Møller, K.O. & Overgaard, K.: Studies on the excretion of penicillin through the kidneys and the mechanism of this process. *Acta pharmacol.* 1: 184, 1945.
- Jensen, K.A. & Kiær, I.: Problems concerning the estimation of the chemosensitivity of microbes and measuring of penicillin and streptomycin concentrations in the blood and spinal fluid. *Separatum Acta path.* Vol. 25: 146, 1948. Proc. of the 8. Scand. Path. Congr. Uppsala July 7-9, 1947).
- Jensen, K.A.: Streptomycin. Resistensbestemmelser. — Fordelingen og anvendelsen af streptomycin. *Ugeskr. Læg.* 111: 259, 1949.
- Jensen, K.A., Dragsted, P.J. & Kiær, I.: Undersøgelser af penicillinpræparater og doseringsmåder — II. *Ugeskr. Læg.* 112: 1075, 1950.
- Kirby, W.M.M., Yoshihara, G.M., Sundsted, K.S. & Warren, J.H.: Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics Annual 1956-1957*, p. 892.
- Koch, R.: Über Desinfektion. *Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. I*, 1881. (Gesammelte Werke von Robert Koch, I. Band, p. 287, Leipzig, 1912).
- Kwok, Y.-Y., Tally, F.P., Sutter, V.L. & Finegold, S.M.: Disc susceptibility testing of slow-growing anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 1, 1975.
- Laveran, A. & Mesnil, F.: Recherches sur le traitement et la prevention du Nagana. *Ann. Inst. Pasteur* 16: 785, 1902.
- Lechevalier, H.A. & Solotorovsky, M.: *Three Centuries of Microbiology*. Dover Publications Inc., New York 1974, p. 429.
- Linton, A.H.: Influence of inoculum size on antibiotic assays by the agar diffusion technique with *Klebsiella pneumoniae* and streptomycin. *J. Bact.* 76: 94, 1958.
- Linton, A.H.: Interpreting antibiotic sensitivity tests. *J. med. Lab. Technol.* 18: 1, 1961.
- Lund, E., Funder-Schmidt, B., Christensen H. & Dupont, A.: Sensitivity test with the tablet method. *Acta path. microbiol. scand.* 29: 221, 1951.
- Lundsteen, E., Vermehren, E. & Vermehren, M.: Bestemmelse af sulfanilamid i blod og urin. Med angivelse af en mikrometode. *Ugeskr. Læg.* 100: 530, 1938.
- Maclean, I.H., Rogers, K.B. & Fleming, A.: M. & B. 693 and pneumococci. *Lancet* 1: 562, 1939.
- Malmberg, A. S.: *Assay of Antibiotics, Single or in Combination, by Agar Diffusion Technique. A study of penicillins, tetracycline, streptomycin and rifampicin*. Thesis, Stockholm 1974.
- Marshall, E.K. jr., Emerson, K., jr. & Cutting, W.C.: Para-aminobenzenesulfonamide absorption and excretion: method of determination in urine and blood. *J. Amer. med. Ass.* 108: 953, 1937.
- Mitchison, D.A. & Spicer, C.C.: A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids by diffusion through agar enclosed in glass tubes. *J. gen. Microbiol.* 3: 184, 1949.
- Murayama, O.: Fundamental study on the disc method of antibiotic sensitivity test. *J. Antibiot. (Tokyo)* 12: 263, 1959.
- Murtaugh, J.J. & Levy, G.B.: Chemical method for the determination of penicillin. *J. Amer. chem. Soc.* 67: 1042, 1945.
- Nuttall, G.: Experimente über die bacterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 4: 353, 1888.
- Rammelkamp, C.H.: A method for determining the concentration of penicillin in body fluids and exudates. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* 51: 95, 1942.

- Reddish, G.F.: Methods of testing antiseptics. *J. Lab. clin. Med.* 14: 649, 1929.
- Reymann, F.E. & Schmith, K.: Gonokokkers kemoresistens og sulfatiazolbehandling. *Ugeskr. Læg.* 104: 1043, 1942.
- Reyn, A., Korner, B. & Bentzon, M.W.: Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. *Brit. J. vener. Dis.* 34: 227, 1958.
- Reyn, A., Bentzon, M.W. & Ericsson, H.: Comparative investigations of the sensitivity of *N. gonorrhoeae* to penicillin. *Acta path. microbiol. scand.* 57: 235, 1963.
- Rosdahl, V., Thamdrup, Vejlsgaard, V., Rosdahl, N. & Vejlsgaard, R.: A micromethod for determination of antibiotics in serum. *Dan. med. Bull.* 16: 133, 1969.
- Rose, S.B. & Miller, R.E.: Studies with the agar cup-plate method I. A standardized agar cup-plate technique. *J. Bact.* 38: 525, 1939.
- Ruehle, G.L.A. & Brewer, C.M.: Methods of testing antiseptics and disinfectants. United States Food and Drug Administration. Circular 198, U.S. Dept. of Agriculture, Wash. 1931, p. 1.
- Sabath, L.D., Casey, J.I., Ruch, P.A., Stumpf, L.L. & Finland, M.: Rapid microassay of gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, and vancomycin in serum or plasma. *J. Lab. clin. Med.* 78: 457, 1971.
- Sapico, F.L., Kwok, Y.-Y., Sutter, V.L. & Finegold, S.M.: Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of anaerobic bacteria: in vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* to nine antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2: 320, 1972.
- Schmith, K. & Reymann, F.E.: Experimentelle og kliniske Undersøgelser over Gonococcers Følsomhed overfor Sulfapyridin. *Nord. Med.* 8: 2493, 1940.
- Scudi, J.V.: A colorimetric method for the determination of penicillin. *J. biol. Chem.* 164: 183, 1946.
- Scudi, J.V. & Jelinek, V.C.: A rapid micromethod for the fluorometric determination of penicillin. *J. biol. Chem.* 164: 195, 1946.
- Sievers, O.: K.A. Jensens metod för bestämning av bakteriers resistens. *Svenska Läk.-Tidn.* 45: 1650, 1948.
- Sindbjerg-Hansen, V.: Om moderne kemoterapeutikas virkning in vitro. Oversigt og egne undersøgelser. *Nord. Med.* 7: 1171, 1940.
- Staun, J.: Experimentelle undersøgelser over streptomycinvirkning og immunitet belyst ved infektionsforsøg med *P. pseudotuberculosis rodentium*. Disputats, Pharmakon, København 1959.
- Sykes, R.B. & Matthew, M.: The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. antimicrob. Chemother.* 2: 115, 1976.
- Thomas, A.R. jr., Levine, M. & Vitagliano, G.R.: Simplified procedures for ascertaining concentration of and bacterial susceptibility to penicillin. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 55: 264, 1944.
- Thomas, H.W.: Some experiments in the treatment of trypanosomiasis. *Brit. med. J.* 1: 1140, 1905.
- Thomsen, V. Frølund: Om teknikken ved resistensbestemmelse med særligt henblik på anvendelse af prædiffusion. Disputats, Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck, København 1967.
- Tréfouël, J., Tréfouël, Mme J., Nitti, F. & Bovet, D.: Activité du p-aminophénylsulfamide sur les infections streptococciques, expérimentales de la souris et du lapin. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 120: 756, 1935.

- Tung, S.L.: Studies on a direct method for estimation of bacterial resistance to antibiotics. *Acta path. microbiol. scand.* 29: 182, 1951.
- Vesterdal, J.: Studies on the inhibition zones observed in the agar cup method for penicillin assay. *Acta path. microbiol. scand.* 24: 272, 1947a.
- Vesterdal, J.: *Maaling og Standardisering af Penicillin*. Disputats, Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck, Kjøbenhavn 1947b.
- Vincent, J.G. & Vincent, H.W.: Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 55: 162, 1944.
- Wld Hlth Org. Techn. Rep. Ser., 1961, 210: Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests. Second Report of the Expert Committee on Antibiotics.
- Wld Hlth Org. Expert Committee on Biological Standardization: Proposed requirements for antibiotic susceptibility tests. WHO/BS/76.1129, 1976.
- Wright, A.E.: New principles in therapeutic inoculation. *Lancet* 1: 365, 1923.



## Stikordsregister

- Acetoin 175-184  
 Acetolaktat 176-178  
 Adenin 341  
 Adenosintrifosfat = ATP 125, 142, 275  
 Affarvningsmidler 21  
 Agar-cup metoden = variant af  
   agardiffusionsmetoden 357  
 Agardiffusionsmetoden 355-375  
 ALA =  $\delta$ -aminolævulinsyre 77-84  
 Aldonsyrer 186-187  
 Alfa (=  $\alpha$ )-hæmolyse 53-66  
 Alfa (=  $\alpha$ )-hæmolytiske streptokokker 64  
 Alfa (=  $\alpha$ )-naphtylamin 143  
 Alfa (=  $\alpha$ )-naphtylaminsulfonsyre =  
   Cleve's syre 143-145  
 Alkoholer som affarvningsmidler 21, 29,  
   33, 36-38  
 Alkoholer i forgæringsrækken 155-156  
 Aminer 266, 276  
 Aminoglykosider 357, 373, 374, 384,  
   386, 396, 399, 401-403  
 Aminosyredeaminase 282  
 Aminosyreoxidase 282-284  
 Aminosyrer 253, 266, 268  
 Amylase 210-215  
 Amylopektin 211  
 Amylose 211  
 Anilinfarver 14, 16  
 Antibiotika 355-375, 376-395, 396-409  
 Antibiotikainaktivering 396  
 Arginindecarboxylase 266-274  
 Arginindihydrolase 275-281  
 Arginindihydrolase-positive bakterier 280  
 Assimilatorisk nitratreduktion 139, 141  
 Assimilatorisk sulfatreduktion 304  
 ATP = adenosintrifosfat 125, 142, 275  
 Autolyse af pneumokokker 96  
 Auxokromer 15  
  
 Baktericid (bakteriedræbende) 357  
 Bakteriostatisk (bakteriehæmmende) 357  
 Barrit's V-P prøve 175-184  
 Basisk fuksin 17  
 Bejdser 19  
  
 Benedict's væske 232-234  
 Benzidintest til streptokokker 131  
 Bergquist & Sercy's fenylalanindeaminase-  
   prøve 285  
 Beta (=  $\beta$ )-galaktosidase 194-202  
 Beta (=  $\beta$ )-hæmolyse 53-66  
 Beta (=  $\beta$ )-hæmolytiske streptokokker 63  
 Beta (=  $\beta$ )-laktamase 378  
 Bionsyrer 158  
 Blodagar til hæmolyseforsøg 59  
 Blodagar til resistensbestemmelse 390  
 Blodagar til symbioseforsøg 73  
 Blyacetat til  $H_2S$ -påvisning 300-302  
 Blyacetatmedium til  $H_2S$ -påvisning 307  
 "Blå plade" 166  
 Brintoverilte 130-138  
 Butandioldehydrogenasetest 176  
 Butandiolforgæring 157, 175  
  
 CAMP-test 55, 62  
 Carboxymethylcellulose 218-219  
 Cellobiase 218  
 Cellulaseenzymer 218  
 Cellulose 216-222  
 Cellulosespaltende bakterier 221  
 Christensens ureaseprøve 313-314  
 Citratplasma  
   – fra hesteblood 89  
   – fra menneskeblood 90  
 Cleve's syre = alfa ( $\alpha$ )-naphtyl-  
   aminsulfonsyre 143-145  
 Clumping factor 85-92  
 Coenzym 69, 266, 268, 292  
 Conradi-Drigalski's medium 166  
 Creatin til V-P prøven 180  
 Cyanid-følsom 113-119  
 Cyanid-resistent 113-119  
 Cystathionase 303  
 Cysteindesulfhydrase 303  
 Cystin og cystein 301-303  
 Cytochrom c 80, 123-126  
 Cytochromer 78, 114, 115, 123-129  
 Cytochromoxidase 115, 120, 125  
 Cytosin 341

- Decarboxylaser 266-274  
Delta (=  $\delta$ )-aminolævulinsyre = ALA 77-84  
Denitrificerende bakterier 147-148  
Denitrifikation 139, 142-143  
Deoxycholsyre, deoxycholat 96-99  
Desoxyribonuklease = DNase 341-352  
Dextran 238-250  
Dextran-positive bakterier 246-247  
Dextransukrase 238, 241  
Dextrin 212  
Diacetyl 175-184  
Diastase = amylase 210  
Diazoreaktion med sulfonamid 358  
Diesterase 344  
Diffusionsteori 360  
Dimetylparafenylendiamin = oxidase-reagens 120-129, 126  
Direkte enzymtest 79, 167, 176, 194-202, 204-205, 235, 259, 261, 278, 291, 295, 301, 305, 313, 315, 316, 325, 327, 331, 347, 348  
Disakkarider 155, 187  
Disk-metoden, variant af agardiffusionsmetoden 400  
Dissimilatorisk nitratreduktion 139, 141-142  
Dissimilatorisk sulfatreduktion 304  
DNA = desoxyribonukleinsyre 341-352  
DNase = desoxyribonuklease 341-352  
DNase-positive bakterier 349  
Dobbeltspiralen = DNA molekylet 341, 343  
Durham-glas 161
- ”Egg-yolk” reaktion 326-327  
Ehrlich’s indolreaktion 290  
Ehrlich-Böhme’s indolreagens 293  
Elektrontransportkæden 124-125  
Emden-Meyeroff’s reaktionskæde 157  
Entner-Doudoroff’s reaktionskæde 157  
Esterase 325, 327
- Farveblindhed 15  
Farvekemi 16  
Farveopfattelse 15  
Fede syrer 323, 324  
Fedtstoffer 323, 327-328  
Fehlings væske 232-233
- Fenylalanindeaminase 282-288  
Fenylalanindeaminase-positive bakterier 286-287  
Fenylketonuri 282, 283  
Fenylpyrodruesyre 282  
Fenylpyrodruesyrereaktionen = fenylalanindeaminaseprøve 283  
Fermentation = forgæring 157, 160-174  
Ferrikloridgelatinestik = gelatinestik 259, 300, 304, 306  
Fiksering af bakteriepræparater 23  
Filtrerpapir som cellulosesubstrat 219  
Flagelfarvning 39-44  
Flagelundersøgelse 42  
Flammefiksering 23  
Flavoproteiner 124, 131-132  
Fluorescens 82, 203-204, 347  
Forgæring = fermentation 157, 160-174  
Forgæringsmønster 166  
Forgæringsrækker 161, 168  
Forrådelse 254, 266, 299  
Fosfatider 329  
Fosfodiesterase 345-346  
Fosfoglycerider 326  
Fosfolipase C positive bakterier 334-335  
Fosfolipaser 323-337  
Fosforylering 156, 186  
Frazier’s metode (gelatinesmeltning) 257  
Fucosidase 196  
Fuksin 17  
Følsomhedsgrupper ved resistensbestemmelse 385-386
- Galaktosidase 194-196  
Galakturonsyre 225  
Galdeopløselighed 95-101  
Galdesalte 95-101  
Galdesyrer 95-101  
Garvesyre 19-21  
Gaskromatografi 157, 167, 176, 267, 269, 276  
Gel af kollagen 257  
Gel af levan og dextran 241-242  
Gel af nukleinsyre 341  
Gel af pektin 225  
Gelatine 257-259  
Gelatinesmeltende bakterier 262-263

- Gelatinesmeltning 256-265  
Gelatinstik (= ferrikloridgelatinstik) 256, 259, 300, 306  
Glukonsyre 158, 185-187  
Glukosemolekylet 154  
Glukuronidase 195  
Glukuronsyre 158  
Glycholat 95-101  
Glycocholsyre 95-101  
Glykosidaseprøver 194-202  
Glykosidbinding 154, 194, 196, 241  
Glykosider 194-209, 196  
Glykosyltransferase 242  
Gnezda's indolprøve 291  
Gore's indolprøve 290  
Gram-farvning 27-34  
Griess-Ilosvay's nitritprøve 139  
Grå kok til symbioseforsøg 73  
Guanin 341
- Heteropolysakkarider 241  
Hexoser 154  
Histo hæmatin = cytochrom 123  
Histologiske præparater til bakteriefarvning 22-23  
Homopolysakkarider 241  
H<sub>2</sub>S-dannelse 299-311  
H<sub>2</sub>S-positive bakterier 308  
Hugh & Leifson's medium 159, 185-193  
Hutner's medium 219  
Hæm = X-faktor 77-84, 126  
Hæmatin 80  
Hæmin 80  
Hæmningszoner, se zonedannelse  
Hæmoglobin 54, 77-80  
Hæmoglobinofile bakterier 77  
Hæmoproteiner 132
- IC<sub>50</sub> 379  
Iltningstrin, kvælstof 141  
Iltningstrin, svovl 301  
Incidentel nitratreduktion 142, 144  
IMVIC-mønster 175  
Indikator 157, 162-163  
Indofenol 123  
Indofenoloxidase 123
- Indolbouillon 293  
Indol-positive bakterier 296  
Indolprøver 289-298  
Indolreagens = p-dimetylaminobenzaldehyd 290  
Influenzabacillus = *Haemophilus influenzae* 67
- Jeffries' metode til DNase-påvisning 347  
Jod til bakteriefarvning 20  
Jod til stivelsespåvisning 210-215, 212, 213
- Kalireaktion = V-P prøve 175  
Kaliumcyanid = KCN 113-119  
Kaliumnitrat = KNO<sub>3</sub> 142, 145  
Kalksæber ved lipaseundersøgelse 325  
Kapselfarvning 13  
Kapselpolysakkarider 159, 241  
Karbolfuksin 18, 30, 35-37  
Katalaseprøver 130-138  
Katalase-negative bakterier 135-136  
KCN (kaliumcyanid) prøver 113-119  
KCN-positive bakterier 117  
Kemoterapeutika 355-375, 376-395, 396-409  
3-ketoglykosider 158, 232-233  
3-ketolaktose 231-237  
Ketolaktose-positive bakterier 236  
Ketosyrer 276, 282, 284  
Kloramfenikol 356  
Klortetracyclin 356  
Koagulase-positive bakterier 91  
Koagulaseprøver 85-92  
Kohn's eller Kohn-Lautrop's metode til påvisning af gelatinesmeltning 257, 259, 261  
Kolerarødtreaktion = indolreaktion 289  
Kollagen 257  
Koncentrationsmåling (antibiotika) 396-409  
Kovacs' indolprøve 290  
Kovacs' indolreagens 290  
Kovacs' metode til H<sub>2</sub>S-påvisning 300  
Kovacs' oxidaseprøve 124, 126-127  
Krebs' cyklus 157  
Kromofore grupper 15  
Krystalviolet 18  
Kulgelatine 257

- Kulhydratomsætning, oversigt 153-159  
 Kärber's metode til bestemmelse af  
   IC<sub>50</sub> 380  
 Kødekstrakt 164  
 Kødinfus 164
- Lecithin 329  
 Lecithinase 326  
 Leifson's flagelfarvningsmetode 40  
 Levan 159, 238-250  
 Levan-positive bakterier 246-247  
 Levansukrase 238, 241  
 Lipase-positive bakterier 334  
 Lipaser 323-337, 327  
 Lipolyse 225  
 Loeffler's medium 107  
 Luftdannelse ved fermentation 157, 161  
 Luftdannelse ved nitratreduktion =  
   denitrifikation 139, 141-143  
 Lugol's væske 213  
 Lysindecaboxylase 266-274  
 Lysofosfatidylkolin 242
- Maltase i hestenserum 165  
 McConkey's medium 166  
 McLeod's medium = tellurplade 109  
 Metalsulfid 299, 302  
 Methionin 302  
 Meticillinresistens 375  
 Metylenblåt 18  
 Metylenblåtfarvning 25-26  
 MIC 357, 359, 379  
 Mineral medium til påvisning af  
   cellulosespaltning 219  
 Mineralisationsprocessen 254  
 "Mixed-acid" forgæring 157, 182  
 Monosakkarider 154, 186  
 Møllers KCN prøve 113-119
- NAD = nikotinamid-adenin-dinukleotid =  
   V-faktor 67-76  
 NADI-reaktion 123  
 Nagler's plade 331, 332  
 Nagler's reaktion 332  
 Naphtylamin 139
- Neisser's farvning (difteribaciller) 107  
 Neisseria-polysakkarid 240  
 Nikotinamid-adenin-dinukleotid = NAD =  
   V-faktor 67-76  
 Nilblåt til lipaseundersøgelse 324  
 Nitratreducerende bakterier 147-148  
 Nitratreduktase 140, 141, 146  
 Nitratreduktion 139-150  
 Nitritpåvisning = Griess-Ilosvay's  
   prøve 139, 145  
 Nitritreduktase 140, 141, 146  
 Nitrosoindolreaktion = indolreaktion 286  
 Nuklease = DNase eller RNase 341  
 Nukleinsyre 341-352  
 Nukleosider 344  
 Nukleotider 344
- O/F medium = Hugh & Leifson's medium  
   185-193, 189  
 Oligonukleotider 341-352, 345  
 Oligosakkarider 154, 194, 196  
 O'Meara's V-P prøve 180  
 ONPG = o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid  
   (syntetisk glykosid) 194-202  
 ONPG-positive bakterier 200  
 ONPG-prøven 194-202, 199  
 ONPX-prøven 198  
 Optokinfølsomhed 102-105  
 Optokin-følsomme bakterier 104  
 Optokinprøven 102-105  
 Ornithindecaboxylase 266, 271-272  
 Orto (= o)-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid =  
   ONPG 194-195  
 Oxidase-positive bakterier 127-128  
 Oxidaseprøver 123-129  
 Oxidasereagens 124, 126  
 Oxidationsreduktionsproces 69-70, 158  
 Oxidativ deaminering 285  
 Oxidativ fosforylering 125  
 Oxidoreduktaser 132
- Para (= p)-dimetylamino benzaldehyd  
   (indolreagens) 290  
 Pektin 223-230  
 Pektinspaltende bakterier 228  
 Pektinspaltende enzymer 225-226

- Penicillin 356  
Penicillinase 378, 400  
Pentose-fosfat-shunt 157  
Pentoser 154  
Peptidase 254, 258  
Peptidbinding 253  
Peptider 254  
Peroxidase 130-132  
Pfeiffer's bacil = *Haemophilus influenzae* 67-76  
PGUA-prøven til påvisning af  $\beta$ -glukuronidase 198  
Pikrinsyre 19  
Plasmin 90  
Polynukleotider 341-352, 344  
Polypeptider 254, 257-258  
Polysakkarider 154, 155, 187, 194, 196, 217, 238  
Porfyriner 77-84  
Porfyrin-negative bakterier 83  
Primær resistensbestemmelse 388, 391  
Prontosil 356  
Prostetisk gruppe, se coenzym  
Proteaser 254, 258, 341  
Proteinomsætning, oversigt 253-255  
Prædiffusion 358, 376  
Præparatfremstilling til bakteriefarvning 21  
Pseudokatalase 131  
Purinbaser 344  
Pyrimidinbaser 344  
Pyrodruesyre 157, 303
- Reduktion og reduktionsprocesser 125, 139-150, 301  
Regressionskurver (antibiotika) 367, 379, 383  
Resistensbestemmelse 376-395, 390  
Resistenspladeaflysning 386  
Resistenspladeaflysning, fejlkilder 393  
Respiration 157-158  
Respiration, anaerob 157-158  
Respirationskæden = transportkæden 124-125, 157-158  
Ribonukleinsyre = RNA 345  
RNA = ribonukleinsyre 345
- Sakkarosebouillon 245  
Sakkaroseplader 243, 244  
Salicin 155, 205  
Salkowski's indolreaktion 290  
Salvarsan 356  
Saponin 96, 97  
Sekundær resistensbestemmelse 388, 392  
Serumbouillon 61  
Sphingolipider 326, 330  
Sphingomyelinase C 326, 330  
Sporefarvning 13  
Staphylokokkoagulase 85-92  
Standardkurver (antibiotika) 368, 400  
Stereoisomeri 154  
Stivelse 210-215  
Stivlessespaltende bakterier 214  
Streptolysin O 56  
Streptolysin S 56  
Streptomycin 356  
Sukkerarter 154, 163, 168  
Sulfanilsyre 139, 145  
Sulfat 301, 304  
Sulfatreduktion, assimilatorisk 304  
Sulfatreduktion, dissimilatorisk 304  
Sulfid 301  
Sulfit 299, 300, 301, 304, 305  
Sulfitreduktase 305  
Sulfonamider 356  
Sulfonamidinhibitorer 378  
Superoxydismutase 130  
Svovl 299, 301  
Svovlbrinte 299-311, 301  
Svovlbrintedannende bakterier 308  
Svovlbrinteprøver 299-311  
Svovlets iltningstrin 301  
Symbiose 67-76  
Syredannelse, fermentativ 157, 162  
Syredannelse, oxidativ 158, 185, 190
- Tannin 20, 21  
Taurocholsyre, taurocholat 95, 98  
TB-farvning 35-38  
Telluritreduktase 109  
Tellurplade = McLeod's medium 109  
Tellur-resistente bakterier 110  
Tetrametylparafenyldiaminhydroklorid = Kovacs' oxidasereagens 123-129

- Tetrathionat 301, 304  
 Tetrathionatreduktase 305  
 Thiocystein 303  
 Thiosulfat 299, 300, 301, 304, 305  
 Thiosulfatreduktase 305  
 Thornley's metode (arginindihydrolase)  
     275-276, 278, 279  
 Thymidin 390, 396  
 Thymin 341  
 Transportkæden = respirationskæden 124  
 Tributyrin 325  
 Triglycerider 325  
 Trisakkarider 155, 187  
 Trombin 85-92  
 Tryptofan 283, 289-298, 291  
 Tryptofanase 289-298, 291  
 Tryptofandeaminaseprøve 285  
 "Tween"-substrater (lipaseundersøgelser)  
     325, 327-328  
 Tyrosin 283
- Ultraviolet lys (Wood's lampe) 82, 204  
 Uracil 344  
 Urease-positive bakterier 317-318  
 Ureaseprøver 312-319  
 Urinstof 255, 312-319  
 Urinstofspaltende bakterier 317-318  
 Uronsyrer 186-187
- V-faktor = NAD = nikotinamid-adenin-  
     dinukleotid 67-76  
 V-faktor-krævende bakterier 75  
 Voges-Proskauer's prøve = V-P prøven  
     175-184  
 V-P-positive bakterier 182  
 V-P prøven = Voges-Proskauer's prøve  
     175-184  
 Wood's lampe (ultraviolet lys) 82, 204
- Xanthin 341  
 X-faktor = hæg 77-84  
 X-faktor-krævende bakterier 83  
 Xylenekstraktion ved indolprøver 290-291,  
     294  
 Xylosidase 196
- Ziehl-Neelsen-farvning 35-38  
 Zinkpulver (nitratreduktionsprøve) 140, 145  
 Zonedannelse
  - Antibiotikakoncentrationsmåling 400
  - Celluloseplade 217
  - DNA-plade 346
  - Gelatineplade 257
  - Hæmolyseplade 54, 56-58
  - Kalciumkarbonatplade 162
  - Nagler-plade 326
  - Nilblåtplade 324
  - Optokinplade 102-104
  - Resistensplade 385, 386, 393
  - Stivelsesplade 210-211
  - Tween-plade 325
- Æskuletin 204  
 Æskulin 155, 203-209  
 Æskulinspaltende bakterier 207  
 Ætylhydrocuprein = optokin 102-105



