

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. α -naftol og β -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" (Marks 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 α -toksinet fra *Cl. perfringens*, som udløste reaktionen, at man fik samme reaktion med en æggeblommepræparation som med serum, og at α -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* α -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 β -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 vandopløselige, hvorimod nogle af deres salte (Na^+ , 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.

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 β -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 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°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 α 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.