

## **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 blodlegerne, 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 blodlegerne, 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 hæmolsin. Marmorek (1895) viste, at ved skiftevis at passerer 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 kredsrunde, helt lyse opklaringer i blodpladen, mens andre streptokokker i stedet for 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 hæmoglobinetræder 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 grønfarfning, betegnedes 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 streptokok-hæmolysinets 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 gærestraktholdigt 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 iltstabilit 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 ustabilt, specielt i vandig oplosning, 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 streptokokinfectioner (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 én 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 hæmolyse, og man ved det stadig ikke. Fænomenet udnyttes 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 hæmolyse blod, men har vist sig at beskadige mange andre slags celler, dvs. de er ikke blot hæmolysiner, men cytolysiner eller cytotoxiner. Som sådan har de længe været studeret og sammenlignet med andre cytolysiner 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 molekulvægt 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. leukocytter, makrofager og fibroblaster, og virker i små doser som en dødelig gift på forsøgssdyr som mus, kaniner og marmoset.

Streptolysin O er biokemisk beslægtet med flere andre toksiner produceret af græmpositive 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 hæmolyszoner 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 inaktivert, bidrager også dette hæmolysin til zonedannelsen, men det er ikke almindeligt accepteret. En mere detailleret 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 molekulvægt 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 hæmolsin.

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 erytrocytter, 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 lyse 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 så kaldte 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 hæmolyse 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 glucoseindholdet, 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 erytrocytter 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 erytrocytterne 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.

Oprindelig 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 skelnen 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 oprindelig 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 oplosninger af 0,2 ml 25% cysteinhydroklorid (Millipore sterilfiltreret), 9,4 ml 27% Na-pyruvat (autoklaveret) og 5% blod (defibrineret hesteblad). 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 autoklaves 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 menneskeblod.

#### *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 misfarving ( $\alpha$ -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 erytrocytter.

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 hæmolysen i flydende substrat = prøve for opløseligt hæmolysin*

*Substrat*

"Serumbouillon": filtreret oksebouillon tilsat 5% hesteserum, 0,1% glukose og 3,3% hæmolysin, defibrineret hesteblood (1 del hesteblood + 9 dele vand), hvorefter der sterilfiltreres (Millipore) og aftappes steril 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, tilsettes 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> tilsettes og koges 10 minutter. pH indstilles med NaOH til 7,5., der koges 5 minutter efter hver NaOH tilsetning. Filtreret 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. Den 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 udtagtes fx. 0,25 ml celler til 4,75 ml stødpudesaltvand.

*Udførelse*

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

i et Widalglas og henstilles ved ca. 35°C i 1 time, hvorefter glasset centrifugeses.

#### *Aflæsning og fortolkning*

Hvis hele væsken er rød og gennemskinnelig, betyder det at blodlegemerne er hämolyserede. Det er det udtrådte hämoglobin, 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 føreblodlegemer i 0,9% saltvand i pulveragar.

##### *Udførelse*

Tværs over pladens midte udsås i en bred streg en  $\beta$ -hämolysin-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 tilsåede plade inkuberes aerobt eller anaerobt i 20 timer.

#### *Aflæsning*

Man ser dels efter hämolytiske opklaringer dels efter streptokokkulturernes farve. De hämolytiske 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 $\text{CO}_2$ 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.: Sulphydryl activated toxins. In: Bernheimer, A.W. (ed.): Perspectives in Toxinology. John Wiley & Sons, N.Y. 1977, p. 85.
- Bordet, J.: Contribution à l'étude du serum 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 pathogènes 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 udsæt 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 næringsskrav 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 angå 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 Seruminstittutet (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  $120^{\circ}\text{C}$ , 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 såkalde 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.

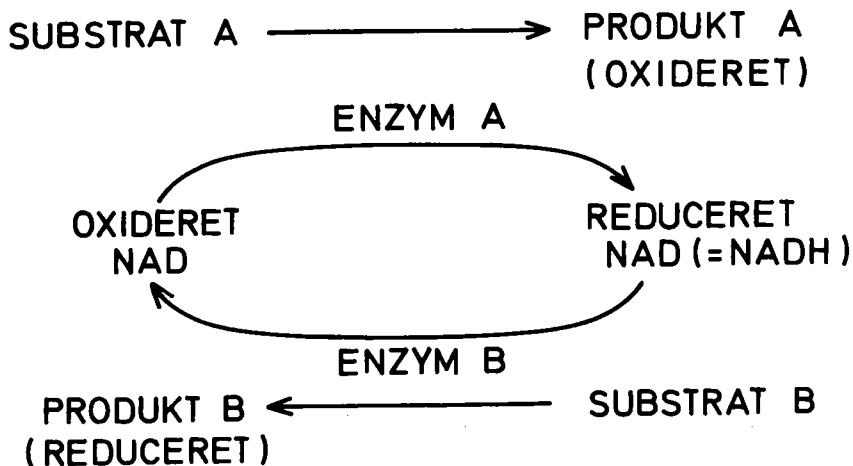
Trods disse mange fremskridt var X- og V-faktorernes kemiske natur stadig helt ukendt, men i 1937 opklærede ægteparret Lwoff dette spørgsmål for V-faktorens vedkommende (A. & M. Lwoff 1937a). De fremstillede af gær et ekstrakt, der var aktivt som V-faktor i fortyndingen 1:50.000, og forsøgte at udfælde 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 renset 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 adenylysyre 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 coenzymer 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 deltagte i en oxidationsproces. Disse processer er skematisk vist i Fig. 1.



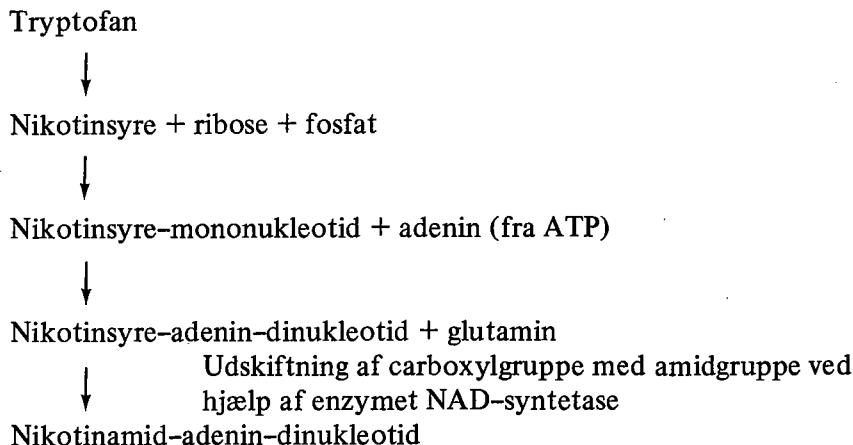
Figur 1  
NAD's funktion som coenzym

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 organisms stofskifte består i sådanne oxidationsreduktionsprocesser, er de to omtalte coenzymer uundværlige for livets opretholdelse. Ganske vist findes der andre coenzymer 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 coenzymer 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 *Haemophili-*

*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. gærkstrakt til særlige blodplader og kartoffelekstrakt til kighosteplader. For så vidt planteekstrakterne er steriliseret ved autoklavering, burde V-faktoren på grund af sin varmefølsomhed 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 % gærkstrakt. 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 filterpapirskiver 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.

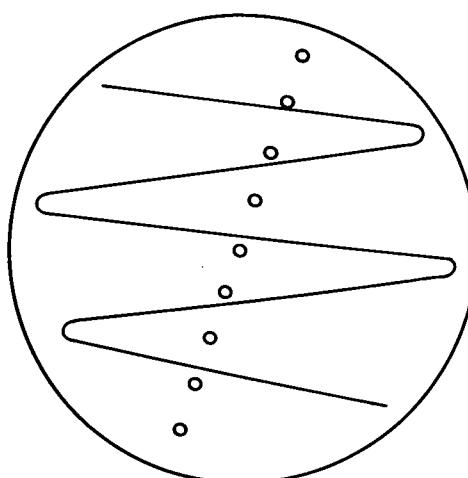
### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

**Substrat:** En 5 eller 10% hestebloods-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 hvilkensomhelst anden bakterie, som i forsøg har vist sig egnet. Den "grå kok" er en stafylokokstamme, som i ørrevis 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 omrent 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 bakteriens 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. paragallinarum* og desuden ubenævnte *Haemophilus* spp svarende til Kilians taxon A, B og C som i alt 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 Wachsthum 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 satteliting 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 δ-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 blodlegemerne og ikke serum, som var nødvendigt, og at det var hæmoglobinets og ikke cellestroma, som var den aktive bestanddel. Bakterierne kaldtes derfor hæmoglobinofile. Da Pfeiffer kunne vise, at hæmoglobinets evne til reversibel binding af ilt var uden betydning i denne sammenhæng, nåede han den konklusion, at det var hæmoglobinets jernindhold, som gjorde det til en effektiv vækstfaktor (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 hämatin som substrattilsætning, men Ghon & Preyss (1903) viste, at hämatin 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 vækstfaktorer (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 influen zabakteriernes X-faktorkrav kunne have samme betydning. For at undersøge dette bestemte de først den mindste mængde hæmin, som lige netop kunne få influen zabakterier 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 tilsatte små ekstra mængder hæmin. Da de fandt god parallelitet mellem størrelsen af iltoptagelsen og de tilsatte hæminmængder, drog de den slutning, at hæmin brugtes af bakterierne ved syntese af respirationsenzymer som cytokrom, 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. δ-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 δ-aminolævulinsyre som udgangsmateriale. Forsøgene viste, at hæmin-uafhængige stammer dannede porfobilinogen og uro- og coproporfyrin, mens de hæminaafhængige stammer ikke dannede disse intermediærprodukter.

White foreslog derefter Biberstein at undersøge ukendte *Haemophilus*-stammers evne til at omdanne δ-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 δ-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 δ-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.

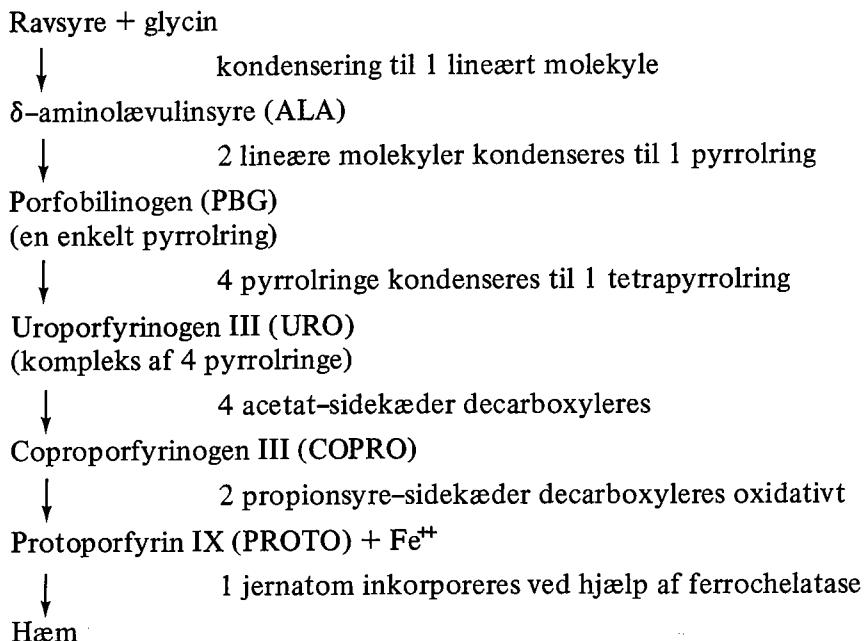
Selv om hæmin og NAD som vækstfaktorer kun kræves i små mængder, har det vist sig, at den nødvendige mængde varierer ret betydeligt. Det er bl.a. vist, at *H. influenzae* og *H. parainfluenzae* kræver forskellig mængde NAD for at give optimal kolonistørrelse, hvilket kan udnyttes diagnostisk (Evans et 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 autoxideres 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 ferriprotoporfyrin. Ferriprotoporfyrin kaldes *hæmin*. I fri form er hæm ustabilt og iltes hurtigt til hæmin, der som regel forekommer som et klorid-salt og nemt kan opnås i krystallinsk form. *Hæmatin* er ferriprotoporfyrinhydroxyd, som fremstilles af hæmin ved opløsning i overskud af alkali og påfølgende udfældning ved tilbagetræring 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 præcis, 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 hämin-afhængige *Haemophilus* syntetiserer häm på stort set samme måde som andre bakterier og højere organismer. Med de hämin-afhængige stammer kunne ingen af de nævnte intermediærprodukter påvises, og dette i forbindelse med substitueringsforsøgene 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 hämin 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 hämin 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 fejlidentificeret 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*

$\delta$ -aminolævulinsyrereklorid (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 øskenu fuld 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 når som helst 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 vanskeligt 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 cytochrome; den har altså intet vækstkrav. (Læg mærke til at i diagnostiske tabeller har der ud for *H. influenzae*'s vækstfaktorkrav 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 δ-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 Wachsthum 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 *Hemophilus* group of organisms. Quantitative aspects of growth on various porphin 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 *Rhodopseudomonas sphaeroides*. 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.
- Thjöftta, T. & Avery, O.T.: Studies on bacterial nutrition. II. Growth accessory substances in the cultivation of hemophilic bacilli. J. exp. Med. 34: 97, 1921a.
- Thjöftta, 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-foredrag). 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 gæseplasma, mens en række andre bakterier, især *Enterobacteriaceae*, enten virkede svagt eller slet ikke. Much, der tilsyneladende ikke kendte Loeb's iagttagelse, var interesseret i serumbactericidi 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 stafylokotrombokinase, 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).

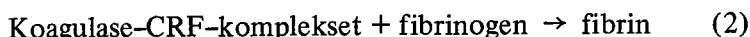
Ifølge en oversigt fra 1958 (cit. af Tager & Drummond 1965) fandtes der på det tidspunkt mindst 45 forskellige metoder til påvisning af koagulase. Blandt nyere modifikationer kan nævnes plademetoder, hvor de enkelte koloniers koagulasedannelse kan iagttages umiddelbart (se Elek 1959; Munch-Petersen 1961; 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 aklaret, om koagulasen 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 react-ing 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 detailler 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 vækstfase, 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 koagulasesen, og det har været formodet, at albumin beskyttede koagulasesen mod proteasens virkning, men forsøg taler imod denne forklaring. Ved immunologiske forsøg er det vist, at der er fire antigenet forskellige koagulaser (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 fibrinogenet uden medvirken af en plasmafaktor. 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 saltsyre. 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 hestesplasma, 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 antigenet forskellige koagulaser, dvs. at de positive kontrolstammer skal repræsentere alle de hyppigt forekommende phaggrupper. Da man på Seruminstittutet 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. Blandinghenstår 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 tilslås med en hel koloni fra en døngammel plade-kultur eller med 0,5 ml fra en flydende kultur, fx. også direkte fra et af blod-dykningsmedierne. Til korrekt udførelse bør der medtages et utilsået kontrolglas, et kontrolglas tilslået med en koagulase-positiv stamme og et kontrolglas tilslået 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 iagttager, 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 op løse 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 bloddyrkningsglas 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 frisktappet blod med 0,5 ml af en 3,13% opløsning af natriumcitrat i destilleret vand. Ved -20°C er reagenset holdbart i længere tid, ved +4°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 koagulase-prøven 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., Sawcka, J., Jeljaszewicz, J. & Pulverer, G.: Mechanism of action of staphylocoagulase. *Zbl. Bakt. I. Abt. Reihe A, Suppl.* **5**: 549, 1976.