

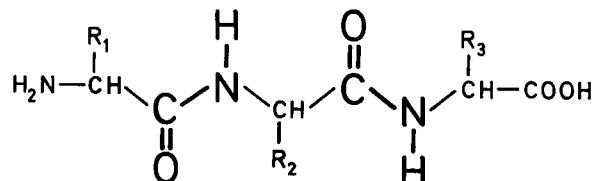
Undersøgelse af proteinomsætning

Kapitel 28

Alment om proteinomsætning

I alle levende celler udgør protein (æggehvilstof) omkring halvdelen af tørstoffet. Det siger noget om proteinstofferne fundamentale betydning for cellernes liv og forklarer, at de træffes overalt i naturen. Antallet af forskellige proteinstoffer er enormt stort, og de har talrige forskelligartede funktioner i de levende organismer. En almennyldig klassificering af proteinstoffer er derfor nærmest umulig, men en ofte anvendt deling er at skelne mellem strukturproteiner og funktionelle proteiner, selv om der ikke er nogen helt skarp grænse. De funktionelle proteiner er først og fremmest enzymer, af hvilke man kender over 2000 forskellige, og strukturelle proteiner består især af de proteiner, som indgår i celler og organismer som en del af selve organismens substans. Det er navnlig strukturproteinerne, der menes, når man taler om protein som substrat i forbindelse med bakteriologiske undersøgelser til påvisning af proteinomsætning.

Alle proteiner består af kæder af aminosyrer, indbyrdes forbundet ved peptidbindinger, en kemisk binding mellem en terminal carboxylgruppe i den ene aminosyre og en aminogruppe i α -stilling i den næste. Et fælles træk for alle aminosyrer er nemlig, at de indeholder en endestillet carboxylgruppe og en aminogruppe i α -stilling, dvs. bundet til det kulstofatom der ligger nærmest carboxylgruppens kulstofatom. Resten af molekylet (sidekæden) i de 20 forskellige aminosyrer, som indgår i levende organismer, er bygget på forskellig måde og udgør grundlaget for de forskelle, der karakteriserer de individuelle aminosyrer. Figuren viser skematisk 3 aminosyrer forbundne ved 2 peptidbindinger.



Skematisk fremstilling af 2 peptidbindinger angivet ved store typer mellem 3 aminosyrer med sidekæderne R_1-R_3 . På aminosyren til venstre en fri NH_2 gruppe og på aminosyren til højre en fri carboxylgruppe. Ved dannelse af en peptidbinding mellem en $-\text{NH}_2$ gruppe og en $-\text{COOH}$ gruppe fraspaltes vand.

Aminosyrekæderne benævnes på grund af peptidbindingen polypeptider. Kædelængden kan variere meget, men hyppigst er der 100 til 300 aminosyrer; forgreninger forekommer ikke. Proteiner består ofte af aggregater af flere polypeptider, der kan være ens eller forskellige. Et for funktionen helt afgørende træk ved de enkelte polypeptider er den bestemte rækkefølge, hvori aminosyrerne optræder i kæderne. Rækkefølgen bestemmes af den pågældende organismes DNA, dvs. den er arveligt bestemt (se kapitel 37).

Kæder af polypeptider kan enten foldes sammen, så proteinmolekylet som helhed nærmest bliver kugleformet, et såkaldt globulært protein, eller de kan holdes sammen i bundter som lange trådformede molekyler, såkaldt fibrillært protein. Enzymer er som regel globulære proteiner. Eksempler på fibrillære proteiner er kollagen, elastin og keratin, der udgør substansen i knoglevæv, bindevæv, hud, hår og negle hos dyr.

Når dyr og planter er døde, nedbrydes alle de organiske forbindelser, de er opbygget af (proteiner, kulhydrater, fedtstoffer og nukleinsyrer), til uorganiske forbindelser som salte, vand og CO_2 . Under eet kaldes denne omdanelse i naturen en mineralisationsproces, fordi slutproduktet bl.a. omfatter mineralsalte. Den modsatrettede proces, hvor CO_2 , H_2O og mineralsalte opbygges til organisk stof, sker i fotosyntetiske organismer som planter og fotosyntetiske bakterier under udnyttelse af solenergi, og det således dannede organiske stof spredes til andre levende organismer gennem fødekæderne. Der foregår altså i naturen et kredsløb fra uorganisk stof til organisk stof og tilbage til uorganisk. Dette kredsløb ville gå i stand, hvis der ikke fandtes bakterier til at gennemføre mineralisationsprocessen. En del af mineralisationsprocessen er bedre kendt under betegnelsen forrådnelsesprocesser, som specielt angår nedbrydning af protein.

Alle bakteriologiske prøver, der har med omsætning af proteinstof at gøre, er prøver som påviser et eller andet trin i den del af mineralisationsprocessen, som angår proteinnedbrydning, mens man foreløbig ikke har prøver, der påviser den modsatrettede proces: opbygning af protein.

Første trin i nedbrydningen af protein er en spaltning af polypeptidkæderne – først til mindre stykker af vekslende længde, kaldet peptider eller oligopeptider, og til sidst til de enkelte aminosyrer. De involverede enzymer er proteaser og peptidaser, der er omtalt i kapitel 29 om gelatinesmelting. Det kan her indskydes, at den samme nedbrydning, men udført kemisk eller ved en kontrolleret enzymatisk proces, anvendes ved fremstilling af bakteriesubstratet pepton, som altså består af en blanding af peptider og aminosyrer.

Næste trin er nedbrydningen af de enkelte aminosyrer. Mange forskellige enzymer deltager, deriblandt decarboxylaser, som af carboxylgruppen danner CO_2 , og deaminaser, som fjerner aminogrupper under dannelse af ammoniak.

Aminosyredeskarboxylaser er omtalt i kapitel 30 og fenyllalanindeaminase, er omtalt i kapitel 32. Nedbrydning af aminosyren arginin kan ske på særlig måde ved hjælp af enzymer, der sammenfattes under betegnelsen arginindihydro-lase, det er omtalt i kapitel 31. Afspaltning af indol fra aminosyren tryptofan er omtalt i kapitel 33.

I to aminosyrer, methionin og cystein, findes svovl, der ved nedbrydningen i hvert fald delvis frigøres som svovlbrinte. Prøver til påvisning af frigjort svovlbrinte er omtalt i kapitel 34. Da omdannelsen formentlig hyppigst sker ved en primær oxidation efterfulgt af en sekundær reduktion af de oxiderede uorganiske svovlforbindelser og altså principielt er nært beslægtet med reduktionen af oxiderede kvælstofforbindelser som nitrat og nitrit, burde man egentlig placere svovlbrinteproverne sammen med nitratreduktionsprøverne under oxidations-reduktionsprøver. Der er imidlertid i bakteriologien tradition for at behandle svovlbrinteproverne sammen med prøverne for proteinomsætning.

Ureaseprøvens placering blandt prøver for proteinomsætning (se kapitel 35) er heller ikke helt logisk fra et biokemisk synspunkt, da prøven ikke direkte viser noget om proteinnedbrydning. Indirekte er der dog den forbindelse, at urinstof dannes ved en særlig proces i bestemte højere organismer, som skaffer sig af med aminogrupper fra aminosyrerne ved at omdanne dem til det neutrale urinstof, som udskilles gennem nyrerne.

Kapitel 29

Gelatinesmeltningsprøver

Gelatinesmeltningsprøver påviser gelatinaser, dvs. enzymer som er i stand til at nedbryde proteinstoffet gelatine, så dets tilstandsform ændres fra fast til flydende. Gelatinesmelting er et eksempel på nedbrydning af protein til peptider og aminosyrer.

1. Historisk indledning

Robert Koch indførte i 1881 brugen af faste næringssubstrater som et middel til at opnå renkulturer. For at få de flydende næringssubstrater til at stivne brugte han først gelatine (Koch 1881), og året efter indførtes agar-agar (se Hitchens & Leikind 1939). I begyndelsen lod han substraterne stivne på en afkølet glasplade, en teknik han var fortrolig med fra fremstilling af sine egne fotografiske plader. Pladerne stilledes under en glasklokke. I 1887 indførtes Petri's glasskålē.

Visse bakteriers evne til at gøre gelatine flydende blev straks iagttaget, og forskellen mellem forskellige bakteriers evne i denne henseende omtales allerede i 1883 af Koch og blev senere udnyttet i forbindelse med hans koleraundersøgelser (Koch 1884). Efter dyrkning på plade overførte han renkulturer til et reagensglas med en søjle af stivnet næringsgelatine ved et stik ned i substratet. Dette klassiske gelatinestik fik hurtig stor udbredelse og er omtalt i ældre arbejder af Hauser (1885), Liborius (1886), Senger (1887), Sternberg (1887), og Fermi (1890, 1891).

Eijkman (1901) foretog en sammenligning mellem evne til gelatinesmelting og evne til opløsning af kasein og fandt, at de to egenskaber fulgtes ad.

To nye fremgangsmåder til påvisning af gelatinesmelting blev introduceret i 1926. Gates (1927) foreslog at anvende en eksponeret og fremkaldt, dvs. sort filmstrimmel, som substrat. En fotografisk film er et tyndt gelatinelag med inkorporeret sølvbromid på en gennemsigtig bærestrimmel, og når strimlen udsættes for enzymernes påvirkning i en kultur, vil gelatinelaget fordøjes og sølvsaltet frigøres, hvorved det sorte lags gennemsigtighed ændres. Denne ændring kan på forskellig vis måles, så man kan få et kvantitativt udtryk for

enzymaktiviteten. Samme princip i forskellige udformninger er senere blevet udnyttet af andre (se fx. Hoyt & Pickett 1957 og Porres & Harris 1974).

Frazier's metode (1926) var baseret på, at tunge metalsalte er i stand til at fælde gelatine, mens den enzymatisk nedbrudte gelatine ikke fældes. Gelatinen inkorporerede han i en agarplade, som blev tilsået med en plet på midten. Efter en vækstperiode på 2-3 dage ved 30°C blev pladen overhældt med en oplosning af $HgCl_2$ i saltsyre. Herved blev pladen på grund af udfældning uklar alle steder, hvor gelatinen var uændret, mens gelatinesmeltende bakterier viste en ring af klart substrat omkring pletten. Metoden gav med de fleste bakterier et hurtigere resultat end det klassiske gelatinestik og har siden været meget anvendt i forskellige modifikationer.

Da de eksisterende prøver til påvisning af gelatinesmeltnings på grund af deres langsomhed stadig kun var af begrænset værdi i den kliniske bakteriologi, forsøgte man på forskellig måde at fremskynde reaktionen.

Kohn foreslog i 1953 at anvende formalinhærdet gelatine med inkorporet kulpulver, hvorved han opnåede dels at prøven kan udføres ved 37°C, da formalinhærdet gelatine ikke varmesmelter, dels at kun en ringe mængde gelatine skal nedbrydes enzymatisk, før det kan ses ved frigørelse af kulpulver, der lægger sig på bunden af glasset. Lautrop (1956a) anvendte Kohns gelatine sat til tætte bakteriesuspensioner og opnåede derved en yderligere afkortning af den nødvendige observationstid. Samtidig blev det vist, at der var forskellige gelatinaser, idet nogle krævede nærvær af calciumjoner og andre ikke, og nogle hæmmedes af toluol-tilsætning, mens andre var upåvirkede.

I tidens løb er der beskrevet mange hurtigmetoder til påvisning af gelatinesmeltnings, men alle udformet på grundlag af de allerede beskrevne principper og vanskelige at tage stilling til uden selv at have prøvet dem (se fx. Greene & Larks 1955; Thirst 1957; McDade & Weaver 1958; Smith & Goodner 1958; Pitt & Dey 1970). For at gøre gelatinesmeltningsprøver til et endnu mere nyttigt hjælpemiddel i diagnostisk bakteriologi end de er i øjeblikket, tror vi, at man i fremtiden snarere bør stile mod metoder, som vil gøre det muligt at skelne mellem forskellige slags gelatinaser, fremfor at prøve at opnå resultaterne hurtigere end det allerede er muligt.

2. Biokemisk baggrund

Af hud eller knogler fremstilles proteinstoffet kollagen, som når det koges længe optager vand og bliver til gelatine. Ved temperaturer over 22-25°C er gelatine en tyktflydende, viskøs substans, som ved afkøling bliver til et fast stof. Det er opbygget af lange spiralsnoede polypeptidkæder.

Mange bakterier indeholder enzymer med evne til at spalte peptidbindingerne i gelatinens polypeptider, så de omdannes til kortere kæder, oligopeptider, med det resultat, at gelatinen omdannes til en tyndtflydende opløsning.

Der er uden tvivl flere forskellige slags enzymer, men da de præcise betingelser, hvorunder de enkelte enzymer virker, ikke kendes, samles de under betegnelsen gelatinaser, og deres virkning beskrives generelt som gelatinesmeltnings. Denne enzymatiske smeltnings er helt forskellig fra den varmesmeltnings der sker ved temperaturer over 22-25°C.

Den enzymatiske gelatinesmeltnings, hvis grad er afhængig af gelatinens art og koncentration og af temperaturen, vil i nogle tilfælde efterfølges af en nedbrydning af oligopeptiderne ved hjælp af andre enzymer, peptidaser, så der dannes tri- og dipeptider og aminosyrer, som derefter kan udnyttes af bakterierne i deres stofskifte.

Blandt gelatinaserne er nogle specifikke, for så vidt som de kun nedbryder gelatine, men ikke andre proteinstoffer; de findes især inden for slægten *Clostridium*. Andre har en bredere substratspecificitet og kan nedbryde flere slags protein og kaldes derfor også proteaser eller proteinaser; dem finder man fx. i *Pseudomonas aeruginosa* og *Serratia marcescens* (Maschmann 1943).

Til yderligere karakteristik af proteaser i almindelighed kan man bruge deres stabilitet over for ilt. De ekstracellulære enzymer, der især dannes tidligt under væksten, er stort set iltstabile, mens de intracellulære, der frigøres ved autolyse af cellerne er iltlabile. Nogle clostridier har begge slags enzymer. De fleste iltstabile proteaser hæmmes af stoffer i normalt serum, men der er undtagelser som fx. *Cl. welcii* (Maschmann 1943). Hartley (1960) har givet en af de nyeste inddelinger af de proteolytiske enzymer.

Så vidt vides er gelatinaserne konstitutive, således at en induktion ikke er nødvendig. Glukose i substratet har en hæmmende virkning, enten fordi syredannelse vil forskyde pH fra de 7,0-7,5, som er gelatinaserne optimum, eller/og fordi enzymproduktionen hæmmes. Gelatinaserne stabilitet nedsættes med stigende temperatur, men i nogle tilfælde kan stabiliteten forøges, hvis der er overskud af calciumjoner i miljøet, mens omvendt fosfat, citrat og andre anjoner som fælder calcium nedsætter stabiliteten (Gorini 1950; Gorini & Fromageot 1950). For stafylokokkers og *Proteus'* vedkommende er det vist, at dyrkning i 10-20% CO₂ atmosfære forøger gelatinase-aktiviteten (Birch-Hirschfeld 1940; Kourilsky et al. 1953).

Kommerciel gelatine til bakteriologisk brug er et variabelt produkt, bl.a. afhængigt af udgangsmaterialet og fremstillingsprocesserne. Nogle egenskaber som gelstyrke, viskositet og pH, kan bestemmes, men alligevel må man være forberedt på variationer, som kan påvirke udfaldet af gelatinesmeltningsprøverne.

Ved forskellige kemiske påvirkninger, fx. behandling med formalin, hexametylentetramin, acetaldehyd etc., kan man ”hærde” gelatinen, så den ikke længere varmesmelter. Det har praktisk betydning ved udformning af nogle gelatinaseprøver (Zimmerman 1939; Kohn 1953).

3. Valg af metode

Det klassiske gelatinestik er så simpelt at anvende, at det ville være svært at erstatte. Det fungerer stort set tilfredsstillende med alle hurtigt gelatinesmeltende bakterier, dvs. stammer som viser smelting i løbet af et par dage eller højst een uge. Jo langsommere bakterierne smelter gelatinen, desto mindre bliver prøvens praktiske værdi, og desuden er det ganske vilkårligt, hvor længe et gelatinestik skal observeres, før man vil udelukke evne til gelatinesmelting.

De langsomt smeltende stammers enzymer kan påvises betydelig hurtigere, hvis man bruger en direkte enzymtest med tætte toluenbehandlede suspensioner og Kohns formalinhærdede kulgelatine. Desværre kan nogle af de hurtigtsmeltende stammer ikke behandles med toluen, da dette af uopklarede grunde har vist sig at hæmme enzymaktiviteten (Lautrop 1956a, b).

Det bedste kompromis med ukendte stammer er derfor samtidig brug af to metoder: det klassiske gelatinestik, som vil være det hurtigste til nogle stammer, og Kohn-Lautrop's metode, som vil være den hurtigste til andre stammer. Mange positive resultater vil foreligge i løbet af 1 døgn, men 4 døgns observation er nødvendigt, hvis ikke for mange gelatinesmeltende stammer fejlagtigt skal karakteriseres som uden evne til gelatinesmelting.

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

A. Det klassiske gelatinestik (med samtidig påvisning af H₂S dannelse)

Substrat

Kødekstrakt	0,75%
Pepton	2,50%
NaCl	0,50%
Gelatine	12,00%
pH indstilles til	7,6
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	0,05%
pH	7,8

Aftappes i 6 cm høj søje i tynde reagensglas (155 x 10/11 mm) og lukkes med paraffineret korkprop.

Ved nye indkøb af pepton, kødekstrakt og gelatine udvælges de fabrikationsnumre, der antages at ville give resultater i overensstemmelse med de hidtidige. Desuden undersøges H_2S reaktionen for 6 *E. coli* stammer, der normalt betragtes som ikke H_2S dannere. Sværtingen skal her være minimal på 7. dagen samtidig med, at *C. freundii* skal være tydelig positiv på 2. dagen og *Proteus vulgaris* på 1. dagen.

Udførelse: Fra en renkultur på standardmedium tages med en lang, lige platinståltråd et stort inoculum, som anbringes ved et stik helt til bunds midt i søjlen. Den paraffinerede prop sættes på plads efter flambering af glassets øverste ende, for at den smelte paraffin kan lukke glasset tæt, så fordampning undgås. (Tæt lukning af glaset har også betydning for at undgå oxidation af det dannede sulfid). Inkubering ved 22°C. I visse håndbøger anbefales inkubering ved 35-37°C, hvor alle glas vil være flydende, og aflæsning ved at se hvilke glas, der stivner når de afkøles under vandhanen. Metoden giver, udført på denne måde, særlig mange lunefulde resultater og kan derfor ikke anbefales.

Aflæsning: Glassene aflæses dagligt i op til 7 dage, idet man ser efter, om noget af gelatinen er blevet flydende, ved at vende glassene skrænt nedad og lægge mærke til, om substratet flyder ned ad væggen. Sker det, er noget af gelatinen smeltet og prøven positiv. Endnu tidligere kan begyndende smelting konstateres, hvis man ser efter, om væksten øverst i stikket ligger i en lille forsænkning, og hvis det er tilfældet, slår glaset hårdt mod håndfladen, så eventuelt flydende gelatine slynges ud og sætter sig som en dråbe på væggen oven over substratet. Hvis man er sikker på, at det er gelatine og ikke blot noget af kulturen, som har sat sig på væggen, er det tilstrækkeligt til at fastslå, at stammen kan smelte gelatine. Ved fortsat observation vil mængden af flydende gelatine tiltage, men der er store variationer. I nogle tilfælde er hele søjlen smeltet på mindre end 24 timer, i andre skrider processen meget langsomt frem, og i efter andre går den på et vist tidspunkt helt i stå. Fortsat observation er kun nødvendig, hvis smeltingen er så ubetydelig, at der kan være tvivl om aflæsningen.

Fortolkning: Varmesmelting kan forveksles med enzymatisk smelting, men vil kun forekomme, hvis temperaturreguleringen har svigtet, så glassene har stået ved for høj temperatur. Et negativt resultat kan skyldes en dårlig gelatine, og hvis resultatet er mod forventning, er der god grund til at gentage undersøgelsen med et glas fra en ny portion substrat.

B. Direkte enzymtest a.m. Kohn-Lautrop

Substrat: Kohn's formalinhærdede kulgelatine findes udskåret i små stykker opbevaret i vand i særlige glas med skruelåg eller enkeltvis tilsat suspensionsglasset. Angående fremstillingen henvises til Kohn's artikel 1953.

Suspensionsvæsken består af fysiologisk saltvand enten i et WR-glas eller et Widalgglas.

Cellesuspensionen høstes fra en bouillon-agarplade, som har været inkuberet ved 30°C natten over. Pladen inspiceres for evt. forureninger, som fjernes ved udskæring med en kniv, før kulturen høstes. De 30°C er et kompromis, idet man med nogle stammer finder størst aktivitet efter vækst ved 35°C og med andre efter vækst ved 20°C. Det er vigtigt, at suspensionerne er så tætte som muligt; selv med kraftigt voksende bakterier bør man bruge hele væksten fra en lille plade suspenderet i 3-4 ml suspensionsvæske, men reducerer man det samlede volumen suspensionsvæske, kan bakteriemængden nedsættes tilsvarende.

Udførelse: Kulturen skrabes af pladen, fx. med en svagt bøjet Pasteurpipette, og overføres til suspensionsmediet. Derefter tilsættes ca. 0,2 ml toluen, og der foretages en omhyggelig homogenisering med pipette, hvorved samtidig det uopløselige toluen bringes i kontakt med cellerne. Med pincet anbringes et stykke gelatine forsigtigt i suspensionen, så det hviler på bunden af glasset. Glasset henstilles ved 35°C og observeres dagligt i 4 dage.

Aflæsning: En positiv reaktion giver sig til kende ved et bundfald af frigjort kulpulver. I den tætte suspension med gelatinestykket hvilende på bunden kan det være vanskeligt at se meget små mængder frigjort kul, men efter synetlettes ved at holde glasset lidt skræt og kigge op mod bunden. Glasset må ikke rystes, da et meget lille bundfald kan forsvinde i den tætte suspension. Så snart en lidt større mængde kul er frigjort, er der ingen vanskelighed ved aflæsningen, for ikke at tale om når hele gelatinestykket er forsvundet.

Fortolkning: Det sker, at et par små stumper går af gelatinestykket og lægger sig på bunden. På grund af deres størrelse i forhold til de enkelte meget små fine kulpistikler bør de ikke kunne forveksles med kul frigjort ved smelting og tolkes som et positivt resultat. En svagt positiv prøve kan skyldes en forurening af suspensionen med en aktivt smeltende stamme; det må som nævnt forebygges ved et omhyggeligt eftersyn af pladen, før kulturen høstes. Ved henstand i meget lang tid, fx. 10-14 dage, kan gelatinestykket blive blødt og synke sammen på bunden og simulere et bundfald, men ved rystning afsløres det, at bundfaldet ikke består af frie kulpistikler. I øvrigt er det ikke meningsfuldt at fortsætte observationen så længe.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Arbejdet med de meget tætte suspensioner og specielt homogeniseringen rummer risiko for infektion, hvis proceduren ikke udføres med tilstrækkelig forsigtighed. Da toluen er brændbart, må flasken og den fyldte pipette ikke komme i nærhed af gasflammen. Toluenmængden i suspensionen er dog så lille, at man uden risiko kan flambere glasset, når det sker inden toluenen igen samler sig i et lag på overfladen.

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

- Pseudomonas*: flere species, deriblandt *P. aeruginosa* og de fleste stammer af *P. fluorescens*. Desuden *P. maltophilia* og *P. pseudomallei*.
- Xanthomonas*: enkelte species.
- Salmonella*: nogle serotyper, deriblandt alle som tidligere regnedes til slægten *Arizona*.
- Klebsiella*: kun "oxytoca"-gruppens stammer.
- Enterobacter*: alle species.
- Serratia*: alle species.
- Proteus*: 2 species.
- Erwinia*: flere species.
- Vibrio*: alle species.
- Aeromonas*: alle species.
- Photobacterium*: nogle stammer.
- Lucibacterium*: alle stammer.
- Flavobacterium*: de fleste species.
- Actinobacillus*: 1 species.
- Bacteroides*: nogle species.
- Fusobacterium*: enkelte stammer.
- Acinetobacter*: nogle stammer.
- Staphylococcus*: mange stammer af alle species.
- Micrococcus*: mange stammer af alle species.
- Planococcus*: alle stammer.
- Streptococcus*: enkelte stammer af enkelte species.
- Peptococcus*: en enkelt species.
- Peptostreptococcus*: enkelte stammer.
- Bacillus*: de fleste species.
- Clostridium*: en del species.
- Corynebacterium*: enkelte stammer af 2 species.
- Arthrobacter*: mange species.

Eubacterium: enkelte species og enkelte stammer af andre species.

Actinomyces: enkelte stammer af få species.

Nocardia: få arter.

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Som helhed har gelatinesmeltningsprøverne begrænset værdi. Der er to hovedårsager hertil: (1) Med alle eksisterende metoder er grænsen mellem smeltende og ikke-smeltende stammer fastsat arbitrært, og ofte er ikke engang denne arbitrære grænse klart defineret. (2) Det erfaringssgrundlag, der er en forudsætning for at udnytte evnen til gelatinesmeltningsprøverne i diagnostikken, er både ufuldstændigt og heterogent, dels fordi gelatinestikket ved 22°C ikke kan anvendes til alle slags bakterier, dels fordi nogle af de andre metoder anvendt på forskellige grupper af bakterier giver forskelligt resultat og derfor kun kan udnyttes, hvis undersøgelsen af den ukendte stamme er foretaget med samme metode, som er anvendt til at fremskaffe de i litteraturen angivne data. Disse vanskeligheder gælder tildels også for andre af de karakteriseringsprøver vi anvender, men de er særligt iøjnefaldende for gelatinesmeltningsprøverne, måske fordi der her er tale om påvisning af flere forskellige slags enzymer med metoder, som kun ufuldstændigt er i stand til at skelne mellem de enkelte enzymer.

Konsekvensen af det ovenstående er, at gelatinesmeltningsprøvernes værdi er begrænset til bestemte, snævre områder af bakteriologien, hvor erfaringerne – især med det klassiske gelatinestik – giver det nødvendige faste grundlag for en praktisk udnyttelse.

Til disse områder hører familien *Enterobacteriaceae*. I slægten *Proteus* er den konstante, hurtige evne til smeltningsprøverne over for de øvrige *Proteus*-arter. Alle *Serratia*-arternes evne til gelatinesmeltningsprøverne har også praktisk betydning, især når det drejer sig om ikke-pigmenterede stammer. Adskillelsen mellem *Salmonella* og *Arizona* på grundlag af en sen gelatinesmeltningsprøve har mistet sin betydning, efter at man er enedes om, at *Arizona*-gruppen bør inkluderes i *Salmonella*, der derved bliver en taxon som er variabel med hensyn til gelatinesmeltningsprøverne. I slægten *Klebsiella* findes nogle langsomt smeltende stammer, der fra gammel tid har været benævnt "oxytoca" stammer. Nogle opfatter disse stammer, når de samtidig er indol-positive, som en selvstændig art, andre opfatter dem som en biotype af *Klebsiella pneumoniae*. *Enterobacter cloacae* hører til de langsomt smeltende stammer.

I slægten *Pseudomonas* med dens overordentlig mange species er påvisning af evne til gelatinesmeltningsprøverne over for *P. aeruginosa* ved diagnosen af *P. aeruginosa*.

P. pseudomallei og *P. maltophilia*. De er alle hurtigt smeltende arter. En del af de fluorescerende pseudomonader, inklusive flere af de plantepatogene arter, har evne til langsom smeltning. Den postulerede forskel mellem *P. fluorescens* som smeltende og *P. putida* som ikke-smeltende (Stanier et al. 1966) gælder som hovedregel, men en del *P. fluorescens* mangler evne til smeltning i gelatinestik.

I slægterne *Bacillus* og *Clostridium* findes en del hurtige smelttere, og efter litteraturen at dømme har prøven værdi ved artsdiagnosen.

8. Referencer

- Birch-Hirschfeld, L.: Die sekretorische Staphylokokkenproteinase und ihre Beziehung zu den Plasma-virksamen Stoffen pyogener Staphylokokken. Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. 145: 476, 1940.
- Eijkman, C.: Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. 29: 841, 1901.
- Fermi, C.: Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. Centralbl. Bakt. 7: 469, 1890.
- Fermi, C.: Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. Centralbl. Bakt. 10: 401, 1891.
- Frazier, W.C.: A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. J. infect. Dis. 39: 302, 1926.
- Gates, F.L.: A method of proteolytic enzyme titration. Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 24: 936, 1927.
- Gorini, L.: Le rôle du calcium dans l'acidité et la stabilité de quelques protéinases bactériennes. Biochim. biophys. Acta. 6: 237, 1950.
- Gorini, L. & Fromageot, C.: Les facteurs physiologiques conditionnant la présence de protéinase dans les cultures de *Micrococcus lysodeikticus*. Biochim. biophys. Acta 5: 524, 1950.
- Greene, R.A. & Larks, G.G.: A quick method for the detection of gelatin liquefying bacteria. J. Bact. 69: 224, 1955.
- Hartley, B.S.: Proteolytic Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 29: 45, 1960.
- Hauser, G.: Über Fäulnissbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie. Ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze. Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig, 1885.
- Hitchens, A.P. & Leikind, M.C.: The introduction of agar-agar into bacteriology. J. Bact. 37: 485, 1939.
- Hoyt, R.E. & Pickett, M.J.: Use of "rapid substrate" tablets in the recognition of enteric bacteria. Amer. J. clin. Path. 27: 343, 1957.
- Koch, R.: Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mitteilungen aus den Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. I, 1881. (Gesammelte Werke von Robert Koch, Bd. I, p. 112. Verlag von Georg Thieme, Leipzig 1912).
- Koch, R.: Über die neuen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Mikrokosmen in Boden, Luft und Wasser. Ärzliches Vereinsblatt f. Deutschland, 1883, Nr. 137. (Gesammelte Werke von Robert Koch, Bd. I, p. 274. Verlag von Georg Thieme, Leipzig 1912).

- Koch, R.: Erste Konferenz zur Erörterung der Cholerafrage am 26. Juli 1884 in Berlin. Berl. klin. Wschr. 1884. (Gesammelte Werke von Robert Koch, Bd. II, 1. del, p. 20. Verlag von Georg Thieme, Leipzig 1912).
- Kohn, J.: A preliminary report of a new gelatin liquefaction method. J. clin. Path. 6: 249, 1953.
- Kourilsky, R., Richou, R. & Schlaepfer, J.: Recherches sur les diastases microbiennes. De l'existence de principes gélatinolytiques dans les filtrats de culture de *Proteus*. C.R. Soc. Biol. (Paris) 147: 18, 1953.
- Lautrop, H.: A modified Kohn's test for the demonstration of bacterial gelatin liquefaction. Acta path. microbiol. scand. 39: 357, 1956a.
- Lautrop, H.: Observations on gelatin-liquefying strains of the *Salmonella*-group. Acta path. microbiol. scand. 39: 370, 1956b.
- Liborius, P.: Beiträge zur Kenntniss des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 1: 115, 1886.
- Maschmann, E.: Bakterien-Proteasen. Ergebnisse der Enzymforschung. Akademische Verlagsgesellschaft. Becker & Erler Vol. 9, Leipzig 1943, p. 155.
- McDade, J.J. & Weaver, R.H.: Rapid methods for the detection of gelatin hydrolysis. J. Bact. 77: 60, 1958.
- Petri, R.J.: Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens. Centralbl. Bakt. 1: 279, 1887.
- Pitt, T.L. & Dey, D.: A method for the detection of gelatinase production by bacteria. J. appl. Bact. 33: 687, 1970.
- Porres, J.M. & Harris, D.: Rapid gelatin liquefaction test. Amer. J. clin. Path. 62: 428, 1974.
- Rietsch, In: Baumgarten, P. (ed.): Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Pathogenen Mikroorganismen umfassend Bacterien, Pilze und Protozoen. III. Jahrgang, 1887, p. 362.
- Senger, E.: Ueber die Einwirkung des Jodoforms auf das Wachsthum und die Virulenz der Milzbrandbacillen. Dtsche med. Wschr. 13: 726, 752, 1887.
- Smith, H.L. & Goodner, K.: Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. J. Bact. 76: 662, 1958.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. gen. Microbiol. 43: 159, 1966.
- Sternberg, In: Baumgarten, P. (ed.): Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Pathogenen Mikroorganismen umfassend Bacterien, Pilze und Protozoen. III. Jahrgang, 1887, p. 363.
- Thirst, M.L.: Gelatin liquefaction: a microtest. J. gen. Microbiol. 17: 396, 1957.
- Zimmermann, W.: Demonstration neuer Nährböden als Ersatz für Agar. Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. 144: 65, 1939.

Kapitel 30

Aminosyredcarboxylaseprøver

Med disse prøver påviser man bakterielle decarboxylaser, som kan omdanne aminosyrer til de tilsvarende aminer.

1. Historisk indledning

I sit arbejde ”Studier over Gæring og Forrådnelse” 1876 skrev Panum: ”Jeg er derfor tilbøjelig til at antage at flere forskellige Bakterieformer og rimeligtvis tildels virkelig forskellige Arter bidrager til Æggehvilstofferne ”sædvandede stinkende Forrådnelse”, og at Lugtens Forskellighed står i genetisk Forbindelse hermed”. Blandt de stinkende stoffer, der her er tale om, er også de forskellige aminer, cadaverin, putrescin, agmatin, isobutylamin og isoamylamin, som opstår ved forskellige aminosyrers decarboxylering. I virkeligheden antyder Panum, at man kan lugte sig til, hvilken art der er tale om, og det gælder jo faktisk i en del tilfælde. Sammenhængen blev først tilfredsstillende oplyst ved undersøgelser over bakteriers decarboxylaser, som biokemikeren E.F. Gale og hans gruppe udførte i 1940’erne i Cambridge (Gale & Epps 1944a, b; Epps 1944, 1945).

Gale viste, at der for 6 forskellige aminosyrer fandtes specifikke decarboxylaser i forskellige bakterier. Nogle arter af bakterier havde et enkelt af enzymerne, andre havde et større antal eller dem alle. Gale bestemte også de nærmere betingelser for enzymdannelse og enzymaktivitet og viste, at fire af disse enzymer krævede en særlig, hidtil ikke kendt, prostetisk gruppe, der senere er identificeret som pyridoxalfosfat.

Som diagnostisk hjælpemiddel anvendte Sharpe (1948) en af Gale udarbejdet tyrosidecarboxylase-test på et større antal streptokokker, og Proom & Woiwod (1951) undersøgte værdien af en papirkromatografisk metode til påvisning af glutaminsyredcarboxylase blandt *Enterobacteriaceae*.

Gale’s elev, Vagn Møller, arbejdede i 1950’erne på Seruminstittuttet med at udforme decarboxylase-prøver for arginin, lysin, ornithin og glutaminsyre i en form, der var egnet til rutinemæssig brug ved diagnosen af *Enterobacteriaceae*, og han demonstrerede i sin disputats deres differentialdiagnostiske

værdi. Møllers simplificerede decarboxylase-prøver, baseret på den pH forskydning til alkalisk side som finder sted ved en decarboxylering, har vundet stor udbredelse og betragtes idag som standardmetoden. Prøvernes begrænsning i Møllers udformning ligger i, at de kun er anvendelige på stammer, der kan vokse anaerobt med glukose som kulstof- og energikilde. Det skyldes, dels at et initialt pH-fald som følge af glukosefermentation er nødvendigt af hensyn til decarboxylasernes lave pH optimum, dels at en evt. sekundær oxidation af peptonet ville føre til en alkalisering, som ikke ville kunne skelnes fra den alkalisering, som skyldes decarboxyleringen (Møller 1955, 1956).

Blandt senere udformede decarboxylase-prøver kan nævnes:

Carlquist's (1956), hvor lysinets amin cadaverin påvises med ninhydrin; Falkow's (1958) lysinprøve, der kun er en lettere modifikation af Møllers tilsvarende, og som ved at udelade paraffinolie-laget netop giver de problemer, som Møller undgik ved at gøre forholdende anaerobe med paraffinolie; Edwards & Fife (1961) inkluderede lysin i et skråagarmedium, hvor den sekundære alkalisering som følge af peptonoxidation undgås, fordi det faste medium hæmmer iltdiffusionen.

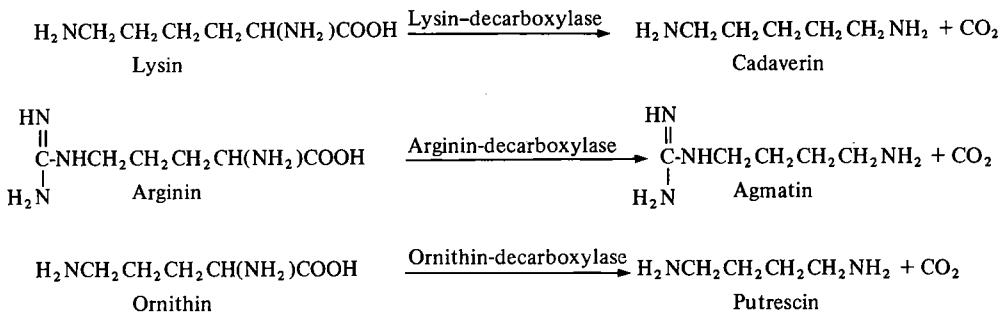
Ederer & Clark (1970) brugte ligeledes agartilsætning og kunne derved utvetydigt påvise ornithindecarboxylering uden at bruge paraffinolie-lag;

Fay & Barry (1972) og Brooker et al. (1973) udformede hurtigprøver (4 timer) til påvisning af henholdsvis ornithin og lysin ved at indstille mediets udgangs-pH til 5,5.

Tyndtagskromatografi til rutinebrug er foreslægt af Goldschmidt & Lockhart (1971), Williams et al. (1971) og Zolg & Ottow (1973). Denne tekniks særlige fordel er, at den tillader at skelne mellem arginin-decarboxylase- og arginindihydrolase-aktivitet. Det samme kan naturligvis opnås ved gaskromatografi (Lambert & Moss 1973).

3. Biokemisk baggrund

Her vil kun blive omtalt decarboxylering af de 3 aminosyrer, som anvendes i de nuværende rutineprøver: arginin, lysin og ornithin. Foruden de terminale grupper, COOH og NH₂ gruppen, har alle disse 3 aminosyrer en ekstra NH₂ gruppe, således at der i alt er 3 polære grupper, hvilket ifølge Gale er en forudsætning for, at en aminosyre kan decarboxyleres enzymatisk af bakterier. Decarboxyleringsprocessen ses af følgende formler:



Disse aminer med deres to NH₂ grupper vil i vandig oplosning reagere stærkt basisk, og det er fremkomsten af denne basiske reaktion påvist med en indikator, der tages som udtryk for, at en decarboxylering har fundet sted. Under de betingelser, der anvendes ved prøvernes udførelse, vil aminerne ophobes, mens de under andre betingelser ville kunne nedbrydes yderligere.

De 3 decarboxylaser, der her er tale om, er alle udtalt substrat-specifikke, men udviser ellers stor lighed med hensyn til deres struktur (Appelbaum et al. 1975) og betingelserne for deres dannelse og aktivitet. De er således alle inducerbare enzymer, som kun dannes, hvis substratet er tilstede. De dannes kun, når dyrkningsmediet har et stærkt surt pH, 5,0–5,5, men da bakterier vokser dårligt ved så lavt pH, bruger man tilsætning af et fermenterbart kulhydrat (glukose), således at pH falder gradvis. Det er vist, at enzymdannelsen er maximal på det tidspunkt, da aktiv celledeling er ved at ophøre. Alle 3 enzymer kræver for at kunne fungere tilstedeværelse af pyridoxalfosfat, der udgør enzymets prostetiske gruppe.

pH-optimum for enzymaktiviteten angives af Gale at ligge usædvanlig lavt. Lysin-decarboxylasen har optimum ved pH 6, de andres ligger derunder. Vagn Møller angiver for lysin og ornithin, at aktiviteten er optimal på et pH-niveau mellem 6 og 7, og mener, at forklaringen på denne uoverensstemmelse kan skyldes, at han bruger tilsætning af pyridoxalfosfat og en anden buffer.

I Møllers udformning af decarboxylase-prøverne er der tale om et lukket vækstsysten, hvor enzymet induceres, dannes og virker i samme system. Et væsentligt træk ved dynamikken i systemet er, at der først sker et kraftigt pH-fald og derefter – når aminen dannes – en sekundær stigning. Det er en komplikation, at vækstsubstratet på grund af sit indhold af pepton vil give anledning til alkalidannelse, hvis bakterierne respiratoriske stofskifte går igang, men det forhindrer man ved at gøre systemet (delvis) anaerobt ved hjælp af et lag paraffinolie over mediet. Med lysin og ornithin vil et indikatoromslag under de givne betingelser med stor sikkerhed kunne tolkes som

en stedfundnen decarboxylering; det samme er ikke tilfældet med arginin som substrat. Det skyldes, at arginin under prøvens betingelser kan metaboliseres på en anden måde end ved decarboxylering, nemlig ved hjælp af dihydrolasesystemet, som spalter arginin til citrullin, der går videre i en energigivende proces, som fører til dannelse af ammoniak, der også vil medføre en pH-stigning. I en prøve udformet efter Møllers princip kan disse to – helt forskellige – enzymatiske processer altså ikke adskilles uden supplerende undersøgelser. Når det drejer sig om fakultativt anaerobe bakterier, har man på Seruminstittutet gjort det til en vedtægt at tolke et positivt indikatoromslag i argininglassen som en positiv reaktion for decarboxylase, vel vidende at der kan være tale om decarboxylase alene, dihydrolasesystemet alene eller begge enzymer samtidigt. Om brug af Møllers argininglas til dihydrolasepåvisning ved en direkte enzymtest, se kapitel 31.

3. Valg af metode

På Seruminstittutet har man naturligt nok holdt sig til den af Møller angivne metode. Andre metoder baseret på indikatoromslag ses ikke at frembyde umiddelbare fordele, hvorimod kromatografiske metoder, specielt gaskromatografi, i princippet nok må foretrækkes, hvis den fornødne tekniske kapacitet er til stede, især af hensyn til argininprøven.

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

*Møllers forenklede metode til påvisning af aminosyredecarboxylase
Substrat*

Pepton	0,5%
Kødekstrakt	0,5%
Bromkresolpurpur (1:500)	0,5%
Kresolrødt (1:500)	0,25%
Pyridoxal	0,0005%
Glukose	0,05%
i dest. vand	

Til substratet sættes en af de følgende aminosyrer:

1% L(+)–lysindihydroklorid	glas mærket "lysin"
1% L(+)–argininmonohydroklorid	" " "arginin"
1% L(+)–ornithindihydroklorid	" " "ornithin"
Som kontrol substrat uden aminosyre	" " "kontrol"
pH indstilles til 6,0.	

Af substraterne aftappes ca. 1,1 ml i snævre reagensglas (155 x 10/11 mm), og efter autoklaveringen tilsættes steril paraffinolie, så der dannes et ca. 5 mm højt lag over substratet.

Ved nye indkøb af pepton eller kødeksstrakt udvælges fabrikationsnumre, der giver passende tydelige reaktioner, således at prøverne ikke bliver for følsomme eller for svage.

Udførelse: Glassene tilsås med lige platinål fra en døgngammel renkultur på bouillonagar eller blodagar. Det er tilstrækkeligt at føre nålen med inoculum gennem paraffinlaget ned i mediet som ved inkubation af et forgæringsglas. De tilsåede glas inkuberes ved 35°C i 4 dage. Gale har anbefalet en lavere inkubationstemperatur, men Møller fandt 35°C bedre og mener, det skyldes de anaerobe vækstbetingelser.

Aflæsning: Glassene aflæses dagligt i 4 dage. Når indikatorsystemet viser strågul farve, aflæses prøven som negativ, og når det viser violet farve som positiv. I omslagsområdet viser glassene en grålig farve, der kan aflæses som en svag positiv reaktion, når kontrolglasset er strågult. Man kan se svagt positive reaktioner ved aflæsning senere end 4 døgn, men da de i diagnoseskemaerne ikke er registreret som positive, bør aflæsninger efter 4 døgn ikke medtages.

Fortolkning: En positiv reaktion i lysin- og ornithinglasset kan umiddelbart tolkes som tilstedeværelse af henholdsvis lysin- og ornithin-decarboxylase. Som nævnt kan en positiv reaktion i argininglasset betyde, enten at bakterierne har en arginin-decarboxylase eller en arginindihydrolase eller at begge enzymer er til stede. En hurtigt indtrædende og kraftig positiv reaktion tyder på, at arginindihydrolase er til stede, mens sene og svage reaktioner er typiske for decarboxylasen. Møller har foreslået ved hjælp af Nesslers reagens at undersøge, om der er ammoniak til stede i glasset, da dette vil være udtryk for dihydrolaseaktivitet, men Nessler's ammoniakprøve giver ikke altid klare resultater, og vi bruger den ikke i diagnoseafdelingen. Da diagnoseskemaerne for *Enterobacteriaceae* anfører positivt udfald for Møllers argininglas uden at skelne mellem, om den skyldes det ene eller det andet enzym, skal positive

prøver altid fortolkes som decarboxylase-positive, når der er tale om stammer af *Enterobacteriaceae*.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ved flambering af platinståle, der har været stukket igennem et lag paraffin, fremkaldes et spruttende fyrværkeri af brændende paraffindråber, der medfører risiko for samtidig spredning af bakterier. Flamberingen bør derfor ske i særlige Bunsen-brændere omgivet af en kappe, der opfanger de klumper og dråber, der springer fra nålen ved opvarmningen.

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Forekomsten af decarboxylaser er først og fremmest undersøgt systematisk i familien *Enterobacteriaceae*. Det største materiale kommer fra CDC, Atlanta, publiceret af Ewing i 1973, og vi har valgt at reproducere en oversigtstabell fra dette arbejde, som har den fordel, at resultaterne er angivet i procent, og at de såvidt man kan se må være udført med Møllers teknik — den samme som vi bruger.

Decarboxylasreaktioner indenfor Enterobacteriaceae (modificeret efter Ewing 1973)

Species	Antal stammer	Lysin		Arginin		Ornithin		
		tegn	% ¹⁾ (%+) ²⁾	tegn	% ¹⁾ (%+) ²⁾	tegn	% ¹⁾ (%+) ²⁾	tegn
<i>E. coli</i>	872	d	81 (1,5)	d	16 (39)	d	58 (8)	
A-D ³⁾	618	d	74 (8)	d	7 (43)	d	12 (3,4)	
<i>S. dysenteriae</i>	400	-	0	d	1,5 (11)	-	0	
<i>S. flexneri</i>	1817	-	0	-	8 (1,6)	-	0	
<i>S. boydii</i>	400	-	0	d	18 (32)	-	2,5 ⁴⁾	
<i>S. sonnei</i>	633	-	0	-	0,5 (5)	+	99	
<i>E. tarda</i>	494	+	100	-	0 (0,2)	+	100 (0,2)	
<i>S. cholerae-suis</i>	20	+	95	(+)	0 (95)	+	100	
<i>S. typhi</i>	288	+	100	-/(+)	0 (22)	-	0	
<i>S. enteritidis</i>	995	+	95	+/(+)	65 (27)	+	0	
<i>A. hinchawii</i> ⁵⁾	315	+	99 (0,3)	(+)/+	25 (74)	+	100	
<i>C. freundii</i>	582	-	0	d	45 (45)	d	13 (0,2)	
<i>C. diversus</i> = <i>C. koseri</i>	226	-	0	+/(+)	62 (35)	+	100	
<i>K. pneumoniae</i>	3560	+	98 (0,1)	-	0,2 ^w	-	0	
<i>K. ozaenae</i>	256	d	36 (6,3)	-	4,2 (4)	-	1	
<i>K. rhinoscleromatis</i>	50	-	0	-	0	-	0	

Species	Antal stammer	Lysin		Arginin		Ornithin		
		tegn	%+ ¹⁾ (%+) ²⁾	tegn	%+ ¹⁾ (%+) ²⁾	tegn %+ ¹⁾	(%+) ²⁾	
E. cloacae	460	-	0	+	92 (2)	+	94	(1,3)
E. aerogenes	121	+	98	-	0	+	96	(1)
E. hafnia	286	+	100	d	5 (7)	+	99	
E. agglomerans = Erwinia herbicola	536	-	0	-	0	-	0	
S. marcescens	1402	+	100	-	(0,9)	+	100	
S. liquefaciens	109	+/(+)	64 (31)	-	0	+	100	
S. rubidaea	49	+/(+)	61 (31)	-	0	-	0	
P. vulgaris	70	-	0	-	0	+	98	
P. mirabilis	372	-	0	-	0	+	96	
P. morganii	208	-	0 (1,5 ^w)	-	0	-	0	
P. rettgeri	170	-	0	-	0	-	0	
P. alcalifaciens	249	-	0 (1 ^w)	-	0 (0,4 ^w)	-	1,2 ^w	
P. stuartii	162	-	0 (0,6 ^w)	-	0	-	0	
Erwinia spp.	16	-	0	-	0	-	0	
Pectobacterium spp.	95	-	0	-	0 (10)	-	0	
Y. enterocolitica ⁶⁾	330	-	0	-	0	+	93	
Y. pseudotuberculosis	20	-	0	-	0	-	0	

1) % positive efter 1-2 døgns inkubation.

2) % positive efter 3-4 døgns inkubation.

3) A-D = Alkalescens-Dispar (bioserotyper af *E. coli*).4) Alle var *S. boydii* biotype 13.5) *A. hinshawii* repræsenterer den tidligere genus *Arizona*.

6) Data fra Nilehn (1969).

Nøgle

+ ≥90% positive inden for 1-2 døgn.

(+) positiv reaktion efter 3 eller flere døgn.

- ≥90% viser ingen reaktion.

-/(+) de fleste negative, nogle stammer dog sent positive.

+/(+) de fleste reaktioner kommer inden for 1-2 døgn, nogle dog senere.

d vekslende udfald af reaktionen (+, (+), -).

w svagt positiv reaktion.

Skråstreg skal i alle tilfælde læses som "eller".

Desuden er decarboxylaserne værdifulde ved adskillelsen af de to genera, *Vibrio* og *Aeromonas*. Hovedmønstret er:

	Arg	Lys	Orn
<i>Vibrio</i>	-	+	+
<i>Aeromonas</i>	+	d+	-

Arterne *Vibrio parahaemolyticus* og *V. alginolyticus* er dog ofte ornithin-negative. I genus *Plesiomonas* er alle 3 decarboxylaser til stede.

I genus *Pasteurella* er det vist af Frederiksen (1973) og andre, at *P. multocida* og *P. pneumotropica* som regel er ornithin-positive, mens *P. ureae* er negativ. De øvrige decarboxylaser er kun meget sjældent til stede. Ornithindeskarboxylase anvendes som led i en biotypeinddeling af *H. influenzae* og *H. parainfluenzae* (Kilian 1976; Bruun & Friis-Møller 1976).

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Det er ikke helt sjældent at finde en negativ decarboxylasereaktion hos stammer, hvor reaktionen efter diagnoseskemaet kunne forventes at være positiv. Om dette skyldes, at prøven ikke er tilstrækkelig følsom, eller om tabsmutanter er særligt hyppige, vides ikke; det kunne også være, fordi de eksisterende diagnoseskemaer trænger til at revideres.

Selv om undtagelser forekommer, har de fleste species af *Enterobacteriaceae* et ret stabilt mønster af bestemte decarboxylasereaktioner, der er af betydelig værdi ved diagnosen. Særlig kan fremhæves *Klebsiella pneumoniae* mønstret, hvor der alene findes en kraftig lysindeskarboxylase. Samme mønster findes hos *S. typhi* og hos nogle *Serratia rubidaea*, men det forringer ikke prøvens værdi ved identifikation af *Klebsiella*. Differentialdiagnostisk har det stor værdi, at *Salmonella* regelmæssigt er lysin-positiv og *Citrobacter* lysin-negativ. En undtagelse herfra er *S. paratyphi A*, som er lysin-negativ. Adskillelse mellem *Vibrio* og *Aeromonas* er tidligere omtalt. *Pseudomonas maltophilia* og *Alteromonas putrefaciens* er ornithindeskarboxylase-positive.

8. Referencer

- Applebaum, D., Sabo, D.L., Fischer, E.H. & Morris, D.R.: Biodegradative ornithine decarboxylase of *Escherichia coli*. Purification, properties, and pyridoxal 5'-phosphate binding site. *Biochemistry* 14: 3675, 1975.

- Brooker, D.C., Lund, M.E. & Blazevic, D.J.: Rapid test for lysine decarboxylase activity in *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 26: 622, 1973.
- Bruun, B. & Friis-Møller, A.: Ampicillin sensitivity and biotypes of recent Danish isolates of *Haemophilus influenzae*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 84: 201, 1976.
- Carlquist, P.R.: A biochemical test for separating paracolon groups. *J. Bact.* 71: 339, 1956.
- Ederer, G.M. & Clark, M.: Motility-indole-ornithine medium. *Appl. Microbiol.* 20: 849, 1970.
- Edwards, P.R. & Fife, M.A.: Lysine-iron agar in the detection of *Arizona* cultures. *Appl. Microbiol.* 9: 478, 1961.
- Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 2. 1(-)-tyrosine decarboxylase from *Streptococcus faecalis*. *Biochem. J.* 38: 242, 1944.
- Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 4. 1(-)-histidine decarboxylase from *Cl. welchii* type A. *Biochem. J.* 39: 42, 1945.
- Ewing, H.E.: Differentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Reactions. Revised. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. DHEW Publ. No. (CDC) 74-8270. Atlanta, Georgia, 1973.
- Falkow, S.: Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of Salmonellae and Shigellae. *J. clin. Path.* 29: 598, 1958.
- Fay, G.D. & Barry, A.L.: Rapid ornithine decarboxylase test for the identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 23: 710, 1972.
- Frederiksen, W.: *Pasteurella* Taxonomy and Nomenclature. In: Winblad, S. (Ed.): Contributions to Microbiology and Immunology, Vol. 2, S. Karger, Basel, 1973, p. 170.
- Gale, E.F. & Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 1. 1(+)-lysine decarboxylase. *Biochem. J.* 38: 232, 1944a.
- Gale, E.F. & Epps, H.M.R.: Studies on bacterial amino-acid decarboxylases. 3. Distribution and preparation of codecarboxylase. *Biochem. J.* 38: 250, 1944b.
- Goldschmidt, M. & Lockhart, B.M.: Rapid methods for determining decarboxylase activity: arginine decarboxylase. *Appl. Microbiol.* 22: 350, 1971.
- Kilian, M.: A Taxonomic Study of the Genus *Haemophilus*, with the Proposal of a New Species. (Disputats) *J. gen. Microbiol.* 93: 9, 1976.
- Lambert, M.A. & Moss, C.W.: Use of gas chromatography for detecting ornithine and lysine decarboxylase activity in bacteria. *Appl. Microbiol.* 26: 517, 1973.
- Møller, V.: Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. path. microbiol. scand.* 36: 158, 1955.
- Møller, V.: Bidrag til den biokemiske inddeling af Enterobacteriaceae. Disputats, Christ-treus Bogtrykkeri, København 1956.
- Niléhn, B.: Studies on *Yersinia enterocolitica* with Special Reference to Bacterial Diagnosis and Occurrence in Human Acute Enteric Disease. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 206, 1969.
- Panum, P.L.: Studier over Gåring och Forrådnelse med särligt Hensyn til de mikroskopiske Organismers Andel i Fermentvirkningerne. I. Indledning, Overblik og Plan. *Nordisk medicinsk Arkiv*, Bd. VIII, Nr. 25. 1876, p. 1.
- Proom, H. & Woiwod, A.J.: The distribution of glutamic acid decarboxylase in the family *Enterobacteriaceae*, examined by a simple chromatographic method. *J. gen. Microbiol.* 5: 681, 1951.
- Sharpe, M.E.: Some biochemical characteristics of group D streptococci isolated from infant faeces with reference to their tyrosine decarboxylase activities. *Proc. Soc. appl. Bact.* 1948, p. 13.
- Williams, G.A., Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Detection of arginine dihydrolase in non-fermentative Gram-negative bacteria by use of thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 22: 1135, 1971.
- Zolg, W. & Ottow, J.C.G.: Improved thin-layer technique for detection of arginine dihydrolase among the *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 26: 1001, 1973.

Kapitel 31

Arginindihydrolaseprøver

Prøver der påviser de bakterielle enzymer, tilsammen kaldet arginindihydrolasesystemet, der spalter arginin til citrullin og dette videre til ornithin, CO_2 og NH_3 under energiudvikling.

1. Historisk indledning

I 1940 viste Hills, at streptokokker og stafylokokker spalte arginin til ornithin under samtidig dannelse af NH_3 og CO_2 . Han mente spaltningen skyldtes et specifikt enzym, som han foreslog at kalde arginindihydrolase, men han kunne ikke i detailler angive reaktionsforløbet, da han hverken fandt citrullin eller urinstof som frie intermediærprodukter. Den i øjeblikket accepterede forklaring på reaktionsforløbet blev fundet af Knivett i 1952. Han viste, at citrullin faktisk optræder som intermediærprodukt, og at der ved dettes spaltning dannes ornithin og carbamylfosfat; dette sidste giver CO_2 og NH_3 , samtidig med at der dannes et molekyle ATP. Hills' dihydrolase var altså i virkeligheden et kompleks af flere enzymer, som nu kaldes dihydrolasesystemet. At denne argininspaltningsproces er energigivende blev siden vist på en meget direkte måde af Sherris et al. (1957) ved hjælp af en *Pseudomonas*-stamme, som i argininfrigt medium hørte op med at bevæge sig, når ilten var opbrugt, men genoptog bevægelsen når der tilsattes arginin.

Som bakteriologisk prøve blev afspaltning af NH_3 fra arginin som udtryk for dihydrolase-aktivitet indført i streptokokdiagnosikken af Niven et al. i 1942, og til undersøgelse af lactobaciller indførtes den i 1953 af Briggs. I Møllers decarboxylase-prøve med arginin fra 1955 til undersøgelse af *Enterobacteriaceae* indgik for så vidt også dihydrolasepåvisning, som omtalt i afsnittet om decarboxylase-prøver. Slade et al. (1954) og Sherris et al. (1957) var de første som viste, at pseudomonader også indeholder dihydrolasesystemet. Mere målbevidste forsøg på at udnytte påvisning af dihydrolasesystemet i diagnostikken af gramnegative stave og forsøg på at udarbejde en simpel metode er udført af Hormaeche & Munilla (1957), Sherris et al. (1959), Thornley (1960) og Stanier et al. (1966), og blandt disse er det især Thornley's metode som har fundet anvendelse.

Thornley havde observeret, at i Hugh & Leifson's lukkede forgæringsglas viste en del pseudomonader omslag til basisk reaktion, og hun viste at denne alkalisering var uafhængig af, om der var vækst i glasset, og at den udeblev, hvis inoculum havde været opvarmet til 100°C. Der var altså tale om en virkning af præformerede enzymer. I særlige forsøg viste Thornley, at det var arginin-indholdet i peptonen, der betingede reaktionen, og at der dannedes citrullin som intermediærprodukt, således at der ikke kunne være tvivl om, at det var dihydrolasesystemet der fremkaldte reaktionsforskydningen. Hun udformede derefter et særligt halvflydende medium med 0,1% pepton og 1,0% arginin og fenolrødt som indikator; pH var indstillet til 7,2, og efter inokulering dækkes substratet med smeltet vaselin for at skabe delvis anaerobe forhold. Ved undersøgelse af et stort antal stammer fandtes en klar adskillelse i to grupper. Blandt de arginindihydrolase-positive stammer fandtes næsten alle undersøgte pseudomonader, nogle aeromonader, en enkelt vibrio og et par stammer af *Enterobacter cloacae*. Blandt de arginindihydrolase-negative fandtes *Achromobacter* (heri inkluderet *Acinetobacter*), *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, flertallet af *Enterobacteriaceae* og enkelte pseudomonader.

Thornley's resultater er siden bekræftet af Taylor og Whitby (1964) og af Stanier et al. (1966). De sidstnævnte påviste arginindihydrolasesystemet ved en kvantitativ bestemmelse af argininresten efter 2 timers indvirkning af bakteriesuspensionen i et glas med en bestemt ringe mængde tilsat arginin.

De viste også, at udnyttelse af arginin som eneste kulstof- og energikilde er en egenskab, som ikke er korreleret med forekomsten af arginindihydrolase. Desuden har de bekræftet, at enzymerne er konstitutive, og at de er inaktive i nærvær af ilt, men aktive under anaerobe forhold.

Analyse af arginin-nedbrydningsprodukter ved hjælp af tyndlagskromatografi og gaskromatografi tillader bedre end de simplificerede metoder at afgøre, hvilke enzymer der har været aktive. De har også været anbefalet til rutinebrug (Williams et al. 1971; Moss et al. 1972; Zolg & Ottow 1973), specielt til at skelne mellem arginin-decarboxylase og arginindihydrolasesystemet.

2. Biokemisk baggrund

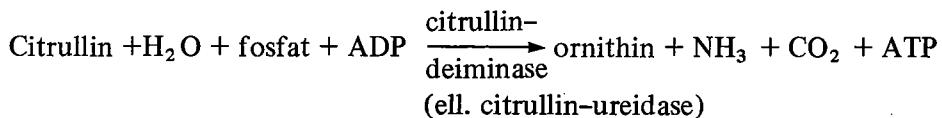
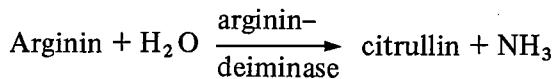
Der er mindst tre måder, hvorpå bakterier kan nedbryde arginin:

(1) Ved hjælp af en aminosyreoxidase, som er en deaminase, kan bl.a. *Proteus* danne den tilsvarende α -ketosyre, dvs. α -ketoglutarat med samtidig frigørelse af NH_3 (se kapitel 32).

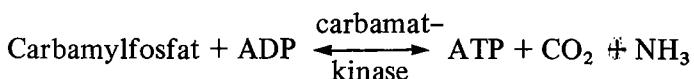
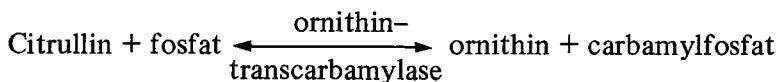
(2) Ved hjælp af en decarboxylase kan mange bakterier danne den tilsvarende amin, dvs. agmatin, som derefter af enzymet agmatinase i alle tilfælde spaltes videre til putrescin og urinstof, der evt. yderligere vil kunne spaltes til NH_3 og CO_2 (se kapitel 30).

(3) Ved hjælp af arginindihydrolasesystemet kan en del bakterier ved en hydrolytisk proces først danne citrullin og derefter ornithin; det er den proces dette kapitel handler om.

Reaktionsforløbet i dihydrolasesystemet er følgende:



Den sidste af de anførte reaktioner beskrives også som opdelt i to individuelle reaktioner (Barker 1961; Schimke et al. 1966):



Da de tre nævnte former for argininomdannelse alle fører til dannelse af alkaliske produkter, må to testbetingelser være opfyldt, for at man kan tolke et indikatoromslag til alkalisk side som udtryk for en positiv dihydrolase-reaktion: (1) Den oxidative deaminase må ikke kunne fungere, og det kan opnås ved at skabe anaerobe forhold i prøven. (2) Decarboxylasen må ikke kunne fungere, og det kan undgås hvis den nødvendige induktion ved lav pH forhindres, hvilket kan ske ved at holde pH omkring neutralpunktet i hele forsøgsperioden. På grund af dihydrolasesystemets egenskaber kan disse betingelser let opfyldes. Enzymerne er nemlig konstitutive, så induktion er overflødig, og de fungerer kun under anaerobe betingelser. Det, der kræves, er derfor: 1) en ikke på forhånd induceret cellesuspension, 2) en argininoplosning med moderat bufferkapacitet indstillet omkring neutralpunktet, og 3) anaerobe betingelser i reaktionsblandingingen, som kan opnås med et lag paraffinolie. Under disse forhold kan man én tydigt fortolke et indikatoromslag i alkalisk retning som ensbetydende med tilstedeværelse af arginindihydrolase.

Modsat decarboxylasetesten, hvor vækst er en forudsætning, er dihydrolasetesten udpræget en direkte enzymtest baseret på præformeret enzym og kræver derfor et relativt stort inoculum.

Dannelse af dihydrolasesystemets enzymer er upåvirket af glukose i mediet. Syntesen er konstitutiv og foregår både under aerobe og anaerobe betingelser. Hvorvidt de udelukkende er aktive under anaerobe forhold, som hævdet af Stanier et al., er usikkert; litteraturen i øvrigt tyder på, at der er aktivitet både under aerobe og anaerobe forhold. Aktiviteten hæmmes ikke af cyanid, der er en kraftig inhibitor for decarboxylase (Taylor & Whitby 1964).

3. Valg af metode

Hvis man ønsker så vidt muligt at differentiere mellem tilstedeværelse af arginin-decarboxylase og arginindihydrolase, må man udføre to prøver: (1) Møllers decarboxylase-prøve, og (2) Thornley's dihydrolase-prøve, hvor man er sikker på, at decarboxylasen ikke vil fungere. Hvis kun én af prøverne er positiv, er resultatet klart; hvis begge er positive er det sikkert, at dihydrolasesystemet er tilstede, men det er ikke dermed udelukket, at decarboxylasen samtidig er til stede.

I Møllers argininglas til decarboxylase-undersøgelse er det en forudsætning, at inoculum kommer i vækst, men det ser ud til – efter erfaringer på Serum-instituttet – at samme glas også kan bruges til en direkte enzymtest for dihydrolase ved at suspendere en større mængde kultur i mediet.

I hvert fald har det vist sig med pseudomonader – som kun vil vokse meget sparsomt eller slet ikke under paraffinolen – at man får positiv reaktion med stort set de samme pseudomonasarter, som gav positivt udfald med en modificeret Thornley-prøve (Reiter og Bruun i diagnoseafdelingen, upubliceret). I streptokokafdelingen har man over en længere periode sammenlignet Møllers arginin-prøve og den tidligere anvendte arginin-prøve med NH_3 påvisning og ikke fundet systematiske forskelle.

Disse erfaringer synes at vise, at Møllers glas udmærket kan bruges til en dihydrolase-prøve for strikt aerobe bakterier, når man i stedet for at betragte det som et vækstmedium bruger det som argininopløsning og sørger for at lave en passende tæt bakteriesuspension i opløsningen. Der vil derfor i rutinediagnostik af strikt aerobe bakterier ikke være grund til at anvende en særligt dihydrolase-prøve, hvorimod man til fakultative bakterier og ved systematiske eller specielle undersøgelser må anbefale at bruge både Møllers decarboxylase-prøve og Thornley's dihydrolase-prøve.

I det følgende beskrives kun Thornley's prøve til påvisning af arginin-dihydrolasesystemet, hvorimod der med henblik på anvendelse af Møllers argininglas til dihydrolase-påvisning henvises til ovenstående og til afsnittet om decarboxylaser (se kap. 30).

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Thornley's metode (let modificeret, idet pepton er udeladt)

Substrat

L-arginin monohydroklorid	1,0%
NaCl	0,5%
K ₂ HPO ₄	0,03%
Fenolrødt	0,001%
Agar	0,3%

Dest. vand; pH indstilles til 7,0-7,2.

Substratet aftappes i 5 cm høje lag i almindelige 155 x 14/15 mm reagensglas. Efter inokulation dækkes substratet med et lag smeltet paraffin eller man kan bruge et lag paraffinolie som i Møllers glas. Som kontrol anvendes samme substrat uden arginintilsætning. Det er vigtigt, at pH er indstillet på nøjagtig samme værdi, så prøveglas og kontrolglas har samme farve.

Udførelse: Glassene inokuleres fra en døgngammel renkultur på standardplade uden forgærbart kulhydrat. Inokuleringen skal være massiv i form af en synlig tyk søjle af bakterier ned igennem det halvflydende substrat. Dette opnås bedst ved hjælp af en pasteurpipette fyldt med en meget tæt suspension af renkulturen. Glasset inkuberes ved 35°C.

Aflæsning: Prøve- og kontrolglas aflæses efter 4 timer og efter 1 døgn. Indikatorens omslag til rød farve betegnes som positiv reaktion. Som ved en ureasereaktion skal der være klar farveforskel mellem kontrol- og prøveglas for at man kan stole på en positiv reaktion. Prøver, der er positive efter 4 timer, betegnes som stærke: +++, senere indtrædende omslag som svage: +. Farveomslaget vil være tydeligst lige omkring inoculum; man kan ikke forvente, at hele substratsøjlen skifter farve.

Fortolkning: Da en oxidativ desaminering er udelukket på grund af paraffinolen og arginin er eneste kvælstofholdige stof, kan et indikatoromslag med sikkerhed tolkes som tilstedeværelse af arginindihydrolasesystemet.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

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

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Den eksisterende viden om arginindihydrolasesystemets udbredelse blandt bakterier er meget mangelfuld. Af oplysningerne i litteraturen kan man ikke altid afgøre, om bestemte bakterier indeholder dihydrolase, decarboxylase eller begge enzymer. De følgende data er samlet fra de forskellige arbejder om dihydrolase, især Niven et al., Møller, Thornley, Stanier et al., og suppleret med egne erfaringer.

Pseudomonas: Følgende species er regelmæssigt positive: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. pseudomallei* og *P. mallei*. I følgende species er nogle stammer positive: *P. stutzeri*, *P. picketti*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes* og *P. fragi*.

Enterobacteriaceae: I særlige undersøgelser er det med sikkerhed vist, at praktisk talt alle stammer af *Salmonella* og *Enterobacter cloacae* er positive. Men *Salmonella* er så sent positive, at det tjener til at differentiere dem fra *E. cloacae* ved aflæsning på 2. dag. Formentlig er stammer af mange andre genera, fx. *Escherichia*, *Shigella* og *Citrobacter*, også positive.

Vibrionaceae: Dihydrolase er sikkert påvist i nogle *Aeromonas*-stammer og en enkelt stamme af *Vibrio anguillarum*, men systematiske undersøgelser mangler.

Chromobacterium: Nogle stammer af *C. violaceum*.

Micrococcus: Nogle stammer af *M. varians*.

Staphylococcus: Alle stammer af *S. aureus* og *S. epidermidis* og de fleste stammer af *S. saprophyticus*.

Streptococcus: De fleste species. Enkelte species som *S. bovis* og *S. salivarius* og stammer af gruppe M og O er negative.

Bacillus: *B. licheniformis* angives som positiv.

Lactobacillus: Ca. $\frac{2}{5}$ af de undersøgte species.

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Kun for genus *Streptococcus* er der et tilstrækkeligt stort erfaringssmateriale til at vise, at prøven er værdifuld til at differentiere på species-niveau. Det samme synes at være tilfældet i genus *Lactobacillus* og genus *Pseudomonas*, men i hvert fald for sidstnævntes vedkommende er erfaringerne med de sjældnere species foreløbig for små. Til adskillelse af *Micrococcus* og *Staphylococcus* har prøven en vis værdi, men nogle stammer i begge grupper afviger fra hovedmønstret.

I familien *Enterobacteriaceae* er situationen den, at man rutinemæssigt registrerer en alkalisk reaktion i Møllers decarboxylase-prøve som positiv

uden sikkert at kunne skelne mellem decarboxylase- og arginindihydrolaseaktivitet; også som sådan har prøven værdi, men en særligt undersøgelse af dihydrolasens forekomst ville være ønskelig.

8. Referencer

- Barker, H.A.: Fermentation of nitrogenous compounds. In: Gunsalus, I.C. & Stanier, R.Y. (Eds.): *The Bacteria*, vol. II, Academic Press, 1961, p. 156.
- Briggs, M.: The classification of lactobacilli by means of physiological tests. *J. gen. Microbiol.* 9: 234, 1953.
- Hills, G.M.: Ammonia production by pathogenic bacteria. *Biochem. J.* 34: 1057, 1940.
- Hormaeche, E. & Munilla, M.: Biochemical tests for the differentiation of *Klebsiella* and *Cloaca*. *Int. Bull. bact. Nomencl. Tax.* 7: 1, 1957.
- Knivett, V.A.: Citrulline as an intermediate in the breakdown of arginine by *Streptococcus faecalis*. *Biochem. J.* 50: 30, 1952.
- Moss, C.W., Lambert, M.A. & Cherry, W.B.: Use of gas chromatography for determining catabolic products of arginine by bacteria. *Appl. Microbiol.* 23: 889, 1972.
- Møller, V.: Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta path. microbiol. scand.* 36: 158, 1955.
- Niven, C.F., Smiley, K.L. & Sherman, J.M.: The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bact.* 43: 651, 1942.
- Schimke, R.T., Berlin, C.M., Sweeney, E.W. & Carroll, W.R.: The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma hominis* 07. *J. biol. Chem.* 241: 2228, 1966.
- Sherris, J.C., Preston, N.W. & Shoesmith, J.G.: The influence of oxygen and arginine on the motility of a strain of *Pseudomonas* sp. *J. gen. Microbiol.* 16: 86, 1957.
- Sherris, J.C., Shoesmith, J.G., Parker, M.T. & Breckon, D.: Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria: their use in the identification of pseudomonads. *J. gen. Microbiol.* 21: 389, 1959.
- Slade, H.D., Doughty, C.C. & Slamp, W.C.: The synthesis of high-energy phosphate in the citrulline ureidase reaction by soluble enzymes of *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.* 48: 338, 1954.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.Y. & Doudoroff, M.: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.* 43: 159, 1966.
- Taylor, J.J. & Whitby, J.L.: *Pseudomonas pyocyanea* and the arginine dihydrolase system. *J. clin. Path.* 17: 122, 1964.
- Thornley, M.J.: The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. appl. Bact.* 23: 37, 1960.
- Williams, G.A., Blazevic, D.J. & Ederer, G.M.: Detection of arginine dihydrolase in non-fermentative Gram-negative bacteria by use of thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 22: 1135, 1971.
- Zolg, W. & Ottow, J.C.G.: Improved thin-layer technique for detection of arginine dihydrolase among the *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 26: 1001, 1973.

Kapitel 32

Fenylalanindeaminaseprøver

Enzymet fenylalanindeaminase påvises ved at konstatere at bakterierne er i stand til af aminosyren fenylalanin at danne fenylypyrodruesyre.

1. Historisk indledning

Med et klassisk arbejde af Krebs i 1935 begyndte det nærmere studium af oxidativ aminosyrenedbrydning. Krebs anvendte lever- og nyrehomogenater, men samme år viste Bernheim et al., at også en suspension af *Proteus*-bakterier var i stand til at oxidere, decarboxylere og deaminere en række aminosyrer, deriblandt fenylalanin. Stumpf & Green (1944) viste eksperimentelt, at der ved bakteriel deaminering af en bestemt α -aminosyre dannedes den tilsvarende α -ketosyre og ammoniak. (I enzym-nomenklaturen betegnes aminosyredeaminase som regel kun som aminosyreoxidase, hvad der kan virke lidt forvirrende).

Til aminosyren fenylalanin svarer ketosyren fenylypyrodruesyre, men at denne sidste faktisk dannes ved bakteriel deaminering af fenylalanin var ikke kendt i 1938, da Henriksen & Closs i Norge i forbindelse med nordmanden Fölling's (1934) grundlæggende arbejde over sygdommen fenyldketonuri påtog sig at undersøge, om noget af den i urinen udskilte fenylypyrodruesyre stammede fra tarmbakteriers omsætning af fenylalanin. De viste, at en *Proteus*-stamme var i stand til af fenylalanin at danne store mængder fenylypyrodruesyre, som påvistes ved fremkomst af en grøn farve efter tilsætning af ferri-ammoniumsulfat. Da en samtidig undersøgt colistamme ikke førte til dannelse af fenylypyrodruesyre, så forfatterne en mulighed for at anvende evnen til at danne fenylypyrodruesyre af fenylalanin i bakterieklassifikationen. De undersøgte derfor et større antal bakteriearter, idet de tilsatte tætte suspensioner til et mineralmedium indeholdende fenylalanin og glycerin og kunne vise, dels at en positiv farvereaktion indtrådte så hurtigt ($\frac{1}{2}$ til 1 time), at den måtte skyldes præformeret enzym, dels at kun stammer af klassisk *Proteus* og Morgans bakterie gav kraftigt positive reaktioner.

Dette udmærkede og originale arbejde satte sig ingen spor, før Henriksen i 1950 publicerede et nyt arbejde om fenylpyrodruesyrereaktionen, som han dengang kaldte den, og påny viste, at blandt *Enterobacteriaceae* var *Proteus*-gruppen den eneste, som gav meget stærke reaktioner.

I årene derefter fulgte en lang række arbejder, hvor Henriksens resultater blev bekræftet og metoden modifieret på forskellig måde.

Singer & Volcani (1955) viste, at også *Providencia* gav en kraftig positiv reaktion, og foreslog dels at bruge ferriklorid som et mere følsomt reagens i stedet for ferriammoniumsulfat, dels at bruge aminosyren tryptofan i stedet for fenylalanin, fordi den røde farve, som indolpyrodruesyren danner, er mere stabil end den grønne farve, som dannes med fenylpyrodruesyre. Også Henriksen har senere været inde på tryptofanets fordel (Bøvre et al. 1974).

Allerede Henriksen & Closs havde fremhævet betydningen af god iltilgang til suspensionen og anbefalet at lægge prøveglasset horizontalt; Singer & Volcani anbefalede af samme grund at sætte glassene i en rystemaskine.

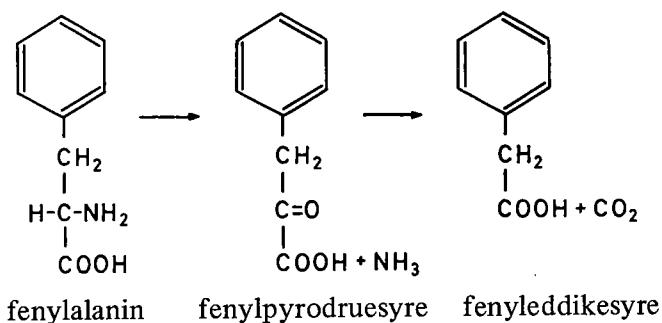
I Frankrig indførtes prøven af Buttiaux et al. (1954) og af Ben Hamida & Le Minor (1956); i England blev den først anvendt af Clarke & Shaw (1954) og Shaw & Clarke (1955). De anvendte fenylalanintesten kombineret med Leifson's malonattest og udformede den som en mikrometode. Ewing et al. (1957 citeret efter Ewing 1962) indførte prøven i USA og anbefalede at bruge en skråagar med tilsat fenylalanin og at flyde kulturen med reagenset.

Senere modifikationer skyldes Vassiliadis & Politi (1968) og Ederer et al. (1971), som kombinerede fenylalanin-prøven med en ureaseprøve.

Mikrometoder er foreslået af Stewart (1961) og af Bergquist & Searcy (1963) og paper-strip metoder ("Phenestix") af Smith & Free (1962) og Goldin & Glenn (1962).

2. Biokemisk baggrund

I den menneskelige organisme er det første trin i den oxidative nedbrydning af fenylalanin normalt en omdannelse til tyrosin ved hjælp af en hydroxylase. (Medfødt mangel på evne til at danne denne hydroxylase giver anledning til fenylketonuri, en stofskiftesygdom som medfører åndssvaghed). Denne hydroxylase er også påvist hos enkelte bakterier (Letendre et al. 1975), men det første trin i den oxidative nedbrydning af fenylalanin hos bakterier er normalt en deaminering til fenylpyrodruesyre. Næste trin kan være en decarboxylering, der fører til dannelse af fenyleddikesyre.



De fleste bakterier indeholder aminosyreoxidaser, som er i stand til at udføre den indledende deaminering til den tilsvarende ketosyre; det videre forløb af oxideringen af de forskellige aminosyrer kan arte sig meget forskelligt. Nogle aminosyreoxidaser udviser en tydelig substratspecificitet, andre kun en ringe. Bernheim et al. (1935) påviste, at suspensioner af *Proteus*-bakterier oxiderer en lang række aminosyrer; i nogle tilfælde skete der både en deaminering og en decarboxylering, i andre tilfælde kun en deaminering. Det sidste var bl.a. tilfældet med fenylalanin. Følgelig måtte man forvente en ophobning af fenyldrodruesyre, og at dette var tilfældet viste Stumpf & Green (1944). Det har senere vist sig, at *Proteus*-bakterier er de eneste *Enterobacteriaceae*, der giver anledning til ophobning af fenyldrodruesyre ved nedbrydning af fenylalanin, men om det skyldes mangel på en substrat-specifik decarboxylase eller en auto-intoksikation af suspensionen (Seidenberg et al. 1962) er ikke kendt.

Den dannede fenyldrodruesyre påvises med ferrijoner som reagens ved fremkomst af en grøn farve ved sur reaktion. Reaktionen for denne proces er ikke med sikkerhed kendt. Ferrijoner danner også med visse andre ketosyrer forskellige farvede forbindelser, således en kirsebærrød farve med indolpyrodruesyre dannet af tryptofan (Singer & Volcani 1955). Farvereaktionen angives at være afhængig af, at carbonylgruppen i ketosyren opræder i enolform, og det er vist, at farvedannelsen er korreleret med suspensionernes mulighed for at danne de til ketosyren svarende hydrazoner. Nogen umiddelbar praktisk betydning for prøvens udførelse har disse konstateringer vistnok ikke. Derimod er det af betydning, at det er vist, at fosfat hæmmer dannelsen af farvekomplekset (Smith & Free 1962).

Aminosyredeaminasers syntese stimuleres af alkalisk pH. Måske burde man derfor overveje at bruge suspensioner af kulturer dyrket på medier med pH omkring 8. Direkte induktion af enzymdannelsen med fenylalanin synes ikke at finde sted; tværtimod kan man vise, at suspensioner af kultur fra fenyl-

alaninholdigt medium viser nedsat aktivitet, muligvis fordi de dannede ammoniumjoner udøver repression på enzymdannelse og/eller -aktivitet. Glukose i vækstmediet nedsætter enzymaktiviteten. Rigelig ilttilførsel begunstiger den oxidative deaminering.

3. Valg af metode

Hvis fenylalanindeaminase-prøven alene bruges til at skille *Proteus*-stammer fra andre *Enterobacteriaceae*, opstår der ingen vanskeligheder, fordi den meget kraftige sortgrønne farve, som *Proteus* giver, uden vanskelighed skelnes fra de antydninger af grønfärvning, der kan forekomme med stammer af andre genera.

Hvis man derimod ønsker at anvende prøven inden for andre bakteriegrupper, fx. *Moraxella* og *Flavobacterium*, har det vist sig, at man kan komme til atstå overfor en skala af grønfärvning, hvor skellet mellem positive og negative reaktioner bliver ganske arbitraert.

Ifølge undersøgelser af Henriksen (Bøvre et al. 1974) kunne det se ud til, at en tryptofandeaminase-prøve vil være bedre egnet i disse tilfælde, da man med denne øjensynlig undgår de fleste af de reaktioner, som kun ytrer sig med en svag färvning i fenylalanindeaminase-prøven. Tryptofanprøven må dog først undersøges systematisk i flere laboratorier.

Den modifikation af Bergquist & Searcy's metode af fenylalanintesten, som har været anvendt i diagnoseafdelingen i de sidste 10 år, har fungeret tilfredsstillende, når talen er om *Proteus*, men det gør tilsyneladende de fleste udformninger af prøven. En større følsomhed, hvis det ønskes, kunne formentlig opnås ved en mere aktiv iltning af suspensionen, fx. ved at ryste glassene eller ved at reducere væskevolumen og lægge glassene horizontalt.

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Diagnoseafdelingens modifikation af Bergquist & Searcy's metode
Substrat

L-fenylalanin 0,5% i dest. vand

0,5 ml aftappet i Widalglas (70 x 10/11 mm)

Glas mærket: "Fenylal"

Reagens

FeCl ₃ ,6H ₂ O	2%
5N HCl	1%
i dest. vand.	

Udførelse: Fra en døngammel renkultur på bouillon- eller blodagar opslemes tæt i substratet. Suspensioner fra blodagar giver i nogle tilfælde stærkere reaktioner end suspensioner fra bouillonagar. Glasset henstilles i termostat ved 35°C i 2-4 timer, hvorefter et par dråber af reagenset tilsættes.

Aflæsning: Prøven aflæses umiddelbart efter reagenstilsætning. En positiv prøve viser sig ved, at der omgående indtræder en kraftig mørkegrøn farvning af hele glassesets indhold. Farven vil i nogle tilfælde hurtigt begynde at aftage i styrke, så glassene må ikke henstå til senere aflæsning.

Fortolkning: Kun glas der viser en kraftig mørkegrøn farve betragtes som sikkert positive. Svagere nuancer af grønt (grønlig farve) kan ses med visse bakterier, men tolkningen er her usikker og forudsætter kendskab til forholdene i den pågældende bakteriegruppe for at kunne udnyttes.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

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

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Oplysninger om fenyllalanindeaminase findes ikke systematisk i Bergey's Manual, 8. udg., undtagen for *Enterobacteriaceae*. Det skyldes, at mange grupper af bakterier aldrig har været undersøgt. De nedenaførte kommentarer er derfor stort set baseret på egne erfaringer.

Alcaligenes: A. faecalis (syn. *A. odorans*): grønlig farve.

Enterobacteriaceae: Proteus: alle species. Undtagelsesvis kan enkelte stammer være negative. *Erwinia herbicola*: en del stammer giver grønlig farve. Undtagelsesvis kan en grønlig farve også ses hos stammer af alle andre species.

Aeromonas: enkelte stammer kan give en grønlig farve.

Agrobacterium: A. radiobacter.

Flavobacterium: en del kan give en grønlig farve.

Moraxella: M. phenylpyruvica og *M. urethralis*: alle stammer.

Acinetobacter: typiske stammer er altid negative; psychrofile stammer som ligner *Acinetobacter*, men er oxidase-positive (= Thornley's phenon 3, (Thornley, 1967)), kan give en grønlig farve.

Bacillus: *B. sphaericus*, *B. apiarius*, *B. pantothenicus* og *B. cirroflagellosum* og nogle stammer af *B. firmus* er angivet som positive.

Mycobacterium: blandt hurtigvoksende arter angives *M. phlei* og *M. vaccae* at være positive.

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Til verifikation af diagnosen af alle *Proteus*-arter er prøven meget pålidelig, da kun meget få stammer (2-3%) er negative. Prøvens værdi i øvrigt er så dårligt undersøgt, at man ikke kan sige noget bestemt derom i øjeblikket.

8. Referencer

- Bergquist, L.M. & Searcy, R.L.: A micro method for detection of utilization of phenylalanine by microorganisms. Amer. J. clin. Path. 39: 544, 1963.
- Bernheim, F., Bernheim, M.L.C. & Webster, M.D.: Oxidation of certain amino acids by "resting" *Bacillus proteus*. J. biol. Chem. 110: 165, 1935.
- Butiaux, R., Osteux, R., Fresnoy, R. & Moriaméz, J.: Les propriétés biochimiques caractéristiques du genre *Proteus*. Inclusion souhaitable des *Providencia* dans celui-ci. Ann. Inst. Pasteur 87: 375, 1954.
- Bøvre, K., Fuglsang, J.E., Henriksen, S.D., Lapage, S.P., Lautrop, H. & Snell, J.J.S.: Studies on a collection of Gram-negative bacterial strains showing resemblance to *Moraxellae*: Examination by conventional bacteriological methods. Int. J. system. Bact. 24: 438, 1974.
- Clarke, P.H. & Shaw, C.: Biochemical tests for *Proteus* and *Providencia* cultures. J. gen. Microbiol. 10: 1, 1954.
- Ederer, G.M., Chu, J.H. & Blazevic, D.J.: Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production. Appl. Microbiol. 21: 545, 1971.
- Ewing, W.H., Davis, B.R. & Reavis, R.W.: Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. Publ. Hlth Lab. 15: 153, 1957.
- Ewing, W.H.: *Enterobacteriaceae*. Biochemical methods for group differentiation. U.S. Dept. Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Publ. no. 734, CDC, Atlanta, Georgia 1962.
- Fölling, A.: Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 227: 169, 1934.
- Goldin, M. & Glenn, A.: A simple phenylalanine paper strip method for identification of *Proteus* strains. J. Bact. 84: 870, 1962.
- Hamida, F.B. & Le Minor, L.: Une méthode rapide de recherche de la transformation de la L-phényl-alanine en acide phényl-pyruvique. Ann. Inst. Pasteur 90: 671, 1956.

- Henriksen, S.D. & Closs, K.: The production of phenylpyruvic acid by bacteria. *Acta path. microbiol. scand.* 15: 101, 1938.
- Henriksen, S.D.: A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of *Proteus* from other enteric organisms. *J. Bact.* 60: 225, 1950.
- Krebs, H.A.: Metabolism of amino-acids. III. Deamination of amino-acids. *Biochem. J.* 29: 1620, 1935.
- Letendre, C.H., Dickens, G. & Guroff, G.: Phenylalanine hydroxylase from *Pseudomonas* sp. (ATCC 11299 a) *J. biol. Chem.* 250: 6672, 1975.
- Seidenberg, M., Martinez, R.J. & Guthrie, R.: Phenylalanine metabolism: the production of phenylacetaldehyde by a *Proteus* species. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 470, 1962.
- Shaw, C. & Clarke, P.H.: Biochemical classification of *Proteus* and Providence cultures. *J. gen. Microbiol.* 13: 155, 1955.
- Singer, J. & Volcani, B.E.: An improved ferric chloride test for differentiating *Proteus*-Providence group from other *Enterobacteriaceae*. *J. Bact.* 69: 303, 1955.
- Smith, R.S. & Free, A.H.: A simplified chemical test for the differentiation of *Proteus*. *Amer. J. med. Techn.* 28: 24, 1962.
- Stewart, D.J.: A micro-method for performing the phenylalanine test on cultures from multi-carbohydrate media. *Nature (Lond.)* 191: 521, 1961.
- Stumpf, P.K. & Green, D.E.: L-amino acid oxidase of *Proteus vulgaris* *J. biol. Chem.* 153: 387, 1944.
- Thornley, M.J.: A taxonomic study of *Acinetobacter* and related genera. *J. gen. Microbiol.* 49: 211, 1967.
- Vassiliadis, P. & Politi, G.: Milieu combiné pour la recherche de l'uréase et la transformation de la L-phénylalanine en acid phénylpyruvique. *Ann. Inst. Pasteur* 114: 431, 1968.

Kapitel 33

Indolprøver

Prøver, der påviser tilstedeværelse af indol i bakteriekulturer. Påvist indol tages som udtryk for, at bakterierne har dannet enzymet tryptofanase, som spalter aminosyren L-tryptofan under dannelse af indol.

1. Historisk indledning

Virchow har beskrevet, at han under kolera-epidemien i Europa 1848-49 ved undersøgelse af koleralig iagttog en smuk rosarød farve, når der blev hældt salpetersyre over tarmindholdet, hvor han iøvrigt havde iagttaget "vibrioner og fimrende monader" (cit. fra Schuchardt 1887). Sandsynligvis skyldtes den røde farve indol i tarmindholdet fremkaldt af vibrionerne, men det vidste Virchow ikke, dog satte han den i forbindelse med en eller anden form for proteinnedbrydning under forrådnelse.

Kort efter at Robert Koch i 1883 havde påvist koleravibroner i Ægypten og Indien, blev der fundet en del andre vibroner, og problemet blev derefter at finde kriterier, som kunne skille den ægte koleravibron fra de uægte. Under dette arbejde opdagede flere forskere i 1886 og 1887 uafhængigt af hinanden og uafhængigt af Virchows iagttagelse, at hvis man satte svovlsyre til en kolera-kultur, fremkom der en rød farve – den såkaldte kolerarødt-reaktion. Prøven var ganske vist ikke til megen nytte i differentialdiagnosen, da de fleste vibrio-kulturer gav samme røde farve (Poehl 1886; Bujwid 1887; Dunham 1887).

En forklaring på kolerarødt-reaktionen gav kemikeren Salkowski i 1887. Han viste, at kemisk set er "kolerarødt" ikke noget særegent farvestof, men at der i kulturen foregår en nitrosoindolreaktion. Denne består i, at indol i nærvær af nitrit og ved stærk sur reaktion giver en rød farve. Reaktionen var angivet af kemikeren von Baeyer, der i 1870 brugte den til indolpåvisning under arbejde med farvestoffet indigo, som kemisk er nært beslægtet med indol. Det nødvendige nitrit til fremkalдelse af nitrosoindolreaktionen i kolera-kulturerne stammende fra bakteriernes reduktion af de små mængder nitrat, der som regel var til stede i medierne som forurening. Ved samme lejlighed viste Salkowski, at nogle af de såkaldte forrådnelsesbakterier også gav en nitrosoindolreaktion.

Kitasato (1889), der på det tidspunkt arbejdede i Robert Koch's laboratorium, så de muligheder, der lå i at udnytte indolpåvisning som et middel til at skelne mellem forskellige bakterier, og viste bl.a., at *E. coli* var indol-positiv, mens tyfus-paratyfus-gruppens bakterier var indol-negative. Hurtigt derefter vandt metoden indpas i de bakteriologiske laboratorier, idet man nu foruden svovlsyre satte nitrat eller nitrit til kulturerne (Salkowski's prøve).

En ny form for indolprøve indførtes efter at det var blevet vist, at en rød farvereaktion, som Ehrlich havde opdaget i 1900 ved tilsetning af p-dimetylaminobenzaldehyd til urin, skyldtes indol. Max Neisser, der var elev af Ehrlich, prøvede reaktionen på bakteriekulturer og fik sin elev Böhme til at gennemarbejde metoden. I en artikel fra 1905 viste Böhme, at denne Ehrlich's indolreaktion var mere følsom end Salkowski's prøve, og anbefalede den til almindelig bakteriologisk brug; reagenset bestod af paradimethylaminobenzaldehyd opløst i 96% ætylalkohol og koncentreret saltsyre. Böhme anbefalede sekundær tilsetning af et oxidationsmiddel (kaliumpersulfat), som dog vist hurtigt gik af brug. Böhme bekræftede den tidlige erfaring, at det røde farvestof, som dannes ved reaktionen, er opløseligt i amylalkohol.

Formentlig med udgangspunkt i denne observation foreslog Kovacs i 1928 (Kovacs 1928, 1931) et nyt indolreagens, hvor paradimethylaminobenzaldehyd var opløst i amylalkohol. Fordelen herved er ikke umiddelbart indlysende, men sandsynligvis beror den på, at reagenset lettere bliver liggende som et lag oven på kulturen, fordi amylalkohol er mindre vandopløselig end ætylalkohol. Der synes dog også at være tale om en primitiv form for ekstraktion ved at bruge amylalkohol. Reagenset er mere ustabilt end Ehrlich-Böhme's reagens, men Gadebusch & Gabriel (1956) har senere angivet at hvis man anvender isoamylalkohol, bliver det mere stabilt.

Ved de tre hidtil omtalte indolprøver, Salkowski's, Ehrlich's og Kovacs', sættes reagenset direkte til kulturen, men da der i bakteriekulturer kan dannes andre stoffer (forskellige indolderivater, glukosamin, hæm, osv.), som fremkalder samme røde farve med reagenset som indol, kan prøven udført på denne måde ikke entydigt tolkes som en prøve for tilstedeværelse af enzymet tryptofanase. En større specificitet af prøven har man derfor forsøgt at opnå ved isolation af indolet ved destillation eller ekstraktion, før reagenset tilsettes. Da indol er mere flygtigt end de andre stoffer, som giver samme farvereaktion, foreslog Goré i 1921 (Malone & Goré 1921, Goré 1921) at udføre prøven ved at fugte glassets vatprop med reagenset og sætte kulturerne i et 100°C vandbad, hvorefter indoldampene sætter sig i proppen, der farves rød. Samme princip kan praktiseres ved at placere et stykke filtrerpapir fugtet med reagenset i låget over en pladekultur under inkubationen. Allerede tidligt blev der peget på muligheden for at anvende forskellige organiske opløsningsmidler til eks-

traktion af indolet før reagenstilsætningen, og i 1958 anbefalede Isenberg & Sundheim en metode baseret på ekstraktion med toluen, og Elisabeth O. King anvendte i 1959 en forudgående xylenekstraktion til påvisning af indoldannelse i kulturer af *Flavobacterium meningosepticum*. Det kan nævnes, at allerede i 1922 havde Martin Kristensen i diagnoseafdelingen, ved indolundersøgelse af *Haemophilus influenzae* foretaget udrystning med kloroform eller amyalkohol før reagenstilsætning. Ved en forudgående ekstraktion opnår man ikke blot en mere specifik reaktion, men ved at anvende et forholdsvis lille volumen ekstraktionsmiddel i forhold til kulturens volumen opnår man også en koncentrering af indolet og derved en moderat forøgelse af følsomheden i sammenligning med prøver, hvor reagenset tilsættes direkte.

For en fuldstændigheds skyld skal anføres to indolprøver baseret på andre kemiske reaktioner end de hidtil nævnte. Det er dels Gnezda's prøve (Gnezda 1899; Holman & Gonzales 1923), hvor reagenset er oxalsyre, dels en prøve anbefalet af Isenberg & Sundheim (1958), hvor reagenset er hydroxylamin. Den kemiske reaktion bag fremkomsten af den røde farve ved disse reaktioner kendes ikke. Efter litteraturen at dømme anvendes disse metoder ikke idag.

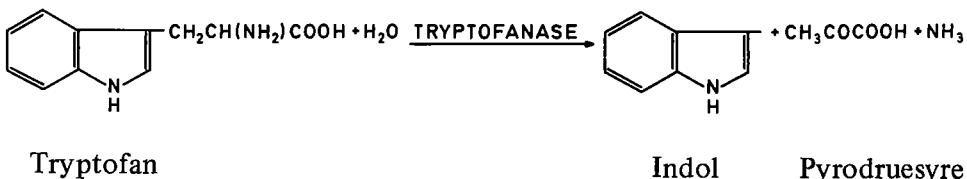
En direkte enzymprøve, hvor det præformerede enzym (tryptofanase) i en bakteriesuspension bringes i kontakt med det specifikke substrat (L-tryptofan) under optimale reaktionsbetingelser, er først beskrevet af Clarke & Cowan (1952) og her i landet anvendt af Bülow (upubliceret).

Angående forskellige mikrotests, spottests og striptests til indolpåvisning, som alle er tillæmpninger baseret på en af de ovennævnte metoder, henvises til Weaver et al. (1968), Blazevic et al. (1970), Sutter & Carter (1972) og Fung & Miller (1972).

2. Biokemisk baggrund

Dannelse af indol

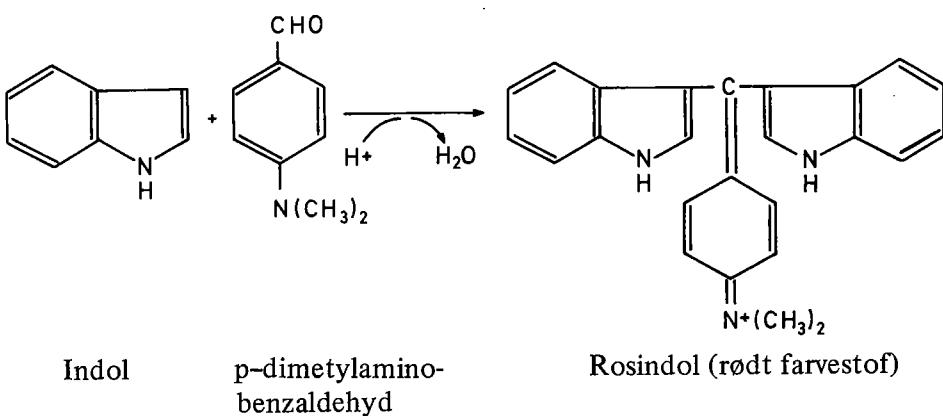
En af de måder, hvorpå aminosyren tryptofan kan omdannes af bakterier, er en spaltning ved hjælp af enzymet tryptofanase, hvorved der dannes frit indol, pyrodruesyre og ammoniak. Pyrodruesyen virker som repressor for tryptofanase.



Processen kræver tilstedeværelse af ilt, men muligvis bruges ilten kun ved den samtidige trinvise oxidation af sidekæden (Gale 1947; Wilson & Miles 1955). Dannelsel af tryptofanase kræver induktion med tryptofan (Newton & Snell 1965), mens glukose i substratet medfører repression af enzymdannelsen, i hvert fald i mængder over 0,25%. Enzymets pH optimum er 7,4–7,8, og samtidig glukoseomsætning førende til syredannelse vil derfor hæmme enzymaktiviteten (Logie 1920; Suassuna et al. 1962a, b). Pyridoxalfosfat (vitamin B₆) er prostetisk gruppe i co-enzymet, og i mutanter, som ikke kan syntetisere vitamin B₆, er enzymet ude af stand til at fungere.

Påvisning af indol

Indolmolekylet danner ved kondensation med reagenset paradimethylamino-benzaldehyd en farveløs forbindelse, som ved opvarmning eller syretilsætning omdannes til et rødt kinonagtigt stof.



Videre omdannelse af indol

Indol kan nedbrydes videre af nogle bakterier, bl.a. *Clostridium tetani* (Reed 1942), og det kan under særlige omstændigheder resyntetiseres til tryptofan (Logie 1920; Newton & Snell 1965). Følgen er, at undertiden vil indol kun være til stede i kulturen over en vis periode, hvad der får betydning for valg af det rette tidspunkt til prøvens udførelse.

3. Valg af metode

Diagnoseafdelingen har i mange år brugt Ehrlich's indolprøve som standard-metode; i de senere år er denne prøve i særlige tilfælde suppleret med den af King anvendte xylenekstraktionsmetode, og i fæceslaboratoriet anvendes

til undersøgelse af pladekulturer et stykke reagensvædet filterpapir anbragt i låget under inkubationen.

Der er grund til at overveje, om man som standardmetode ikke burde foretrække enten en ekstraktionsmetode, fx. med xylen, eller en metode til direkte enzympåvisning, fx. den af Bülow udarbejdede, for at arbejde med en metode, som på samme tid er mere specifik og mere følsom end den nu anvendte. I det følgende beskrives 4 metoder:

- a) Ehrlich's indolreaktion med direkte tilsætning af reagens
- b) Ehrlich's indolreaktion med ekstraktion før reagenstilsætning
- c) Ehrlich's indolreaktion under fordampning fra pladekultur
- d) Direkte enzymtest for tryptofanase

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

a) *Ehrlich's indolprøve med direkte tilsætning af reagens*

Substrat: Den såkaldte indolbouillon består af 0,26% trypsinbehandlet kasein (NZ-amin) i demineraliseret vand, pH 7,7. Man vælger kasein på grund af dettes relativt store tryptofanindhold, så ekstra tilsætning af tryptofan bliver unødvendig. Substratet aftappes i 5 cm høje lag i små glas (155 x 10/11 mm).

Reagens (Ehrlich-Böhme)

Paradimethylaminobenzaldehyd	10 g
Ætylalkohol 96–100%	950 ml
Saltsyre, konc., ren	200 ml

Reagenset, der er svagt gulligt, opbevares i brune pipetteflasker ved stuetemperatur og er her holdbart i månedsvis. Hvis reagenset er blevet brunligt, er det uanvendeligt.

Udførelse: Indolbouillonen inokuleres med stort inokulum og inkuberes rutinemæssigt ved 35°C, men ved lavere temperatur, hvis man ved, at bakterien har et lavere temperatur-optimum. Reaktionen udføres, når kulturen er udvokset; det vil hyppigst være efter 24 timer, men efter 48 timer eller endnu senere, hvis kulturen vokser langsomt. Hurtigt voksende kulturer bør ikke undersøges senere end efter 24 timer af hensyn til risikoen for sekundær nedbrydning af indolet eller resyntese til tryptofan. Reagenset tilsættes ved at lade 0,5–1,0 ml

fra pipetten løbe langsomt ned ad den indvendige side af glasset, som holdes næsten vandret. Glasset rejses derefter forsigtigt til lodret stilling, idet det gælder om, at reagenset kommer til at ligge som en skive oven over substratet, da man ikke kan se svage reaktioner, hvis reagenset blander sig med substratet.

Aflæsning: En positiv reaktion består i en rødviolet skive på grænsen mellem reagenslaget og kulturen. Selv den svageste røde farve regnes som positiv. Svage reaktioner ses tydeligere, hvis der holdes hvidt papir bag glasset. Stærke reaktioner optræder momentant, svagere reaktioner i løbet af få minutter. Reaktionen holder sig længe, men efter nogen tids henstand kan der i negative glas på grænselaget opstå en svagt brunfarvet skive, som kan give anledning til tvivl; derfor bør glassene så vidt muligt aflæses efter få minutters forløb.

Fortolkning: Traditionelt fortolker man fremkomsten af en rød farve som en positiv indolreaktion. I meget sjældne tilfælde er dette ikke rigtigt: en svagt rødpigmenteret *Serratia* kan give en indollignende reaktion, idet alkoholen i reagenset koncentrerer pigmentet, så det fra at have været næsten usynligt fremtræder som en tydelig rød skive. Pyocyanindannende stammer af *Pseudomonas aeruginosa* kan give falsk positiv reaktion, idet pyocyaninet ved den stærkt sure reaktion, som skyldes reagenset, bliver rødt.

I vores nuværende diagnoseskemaer betyder indol-positiv ikke blot en reaktion med det rene indol, men også med indolderivater og andre forbindelser, som reagerer ved Ehrlich's direkte test.

b) Ehrlich's indolprøve med ekstraktion før reagenstilsætning

Substrat og reagens som under a).

Udførelse: Inokulation og inkubation som under a). Før reagenstilsætningen tilskættes ca. 1,0 ml xylen, og kulturen rystes kraftigt, hvorefter den henstilles på bordet, til xylenen har samlet sig som et lag øverst i kulturen. Derefter tilskættes reagenset på samme måde som under a).

Aflæsning som under a).

Fortolkning: Ved fremkomst af en positiv reaktion kan man drage den slutning, at bakterierne danner enzymet tryptofanase. Det skyldes, at man med xylen kun ekstraherer indol, som derfor er det eneste stof, der får mulighed for at reagere.

c) Ehrlich's indolreaktion under fordampning fra pladekultur

Reaktionen kan anvendes, når man ønsker svar på indolreaktionen samtidig med, at den første subkultur er udviklet. Man bør i sådanne tilfælde tilskætte ekstra tryptofan til pladen. Man anbringer i låget af den tilskædte plade en strimmel filtrerpapir vædet med Ehrlich-Böhme's reagens, så den klæber til låget. Efterhånden som kulturen vokser frem, vil eventuelt dannet indol i et

vist omfang fordampe, og indoldampene vil reagere med reagenset på filterpapiret, som bliver rødt. Når pladen åbnes, kan man ved positiv reaktion også lugte indolet. Der er erfaring for, at kun bestemte slags filterpapir er egnede, men ethvert stykke kan gøres egnet efter kort neddyppning i syre og påfølgende tørring, før reagenset dryppes på. Også ved denne udførelse er man sikker på, at en positiv reaktion skyldes tryptofanase, da de øvrige stoffer, som kan give den røde farve med reagenset, ikke – eller ikke så let – fordamper ved inkubationstemperaturen. Følsomheden er ifølge Gaarslev omrent som ved ekstraktionsmetoderne.

d) Direkte enzymtest for tryptofanase

Substrat

L-tryptofan (1% i dest. vand)	50 ml
1/15 M KH_2PO_4	85 ml
1/15 M Na_2HPO_4	915 ml

Blandingen af fosfater svarer til Sørensens fosfatbuffer med pH 7,8.

Aftappet i en mængde på 1 ml i Widalglas (70 x 10/11 mm).

Reagenser

Ehrlich–Böhme's indolreagens

Toluen

Udførelse: Kulturen høstes fra en renkultur på agarplade tilsat tryptofan og opslemmes tæt i et Widalglas med L-tryptofan-substratet. Derefter tilsettes straks 3 dråber toluen og 5 dråber indolreagens.

Aflæsning: Glasset observeres for fremkomst af en rød farve, som angiver positiv reaktion, dvs. tilstedeværelse af indol. Hvis den røde farve ikke fremkommer straks, betragtes prøven som negativ.

5. Sikkerhedforanstaltninger

Ehrlich–Böhme's reagens er på grund af sit saltsyreindhold stærkt ætsende. Xylen, der anvendes til ekstraktion, er under mistanke som cancer-fremkalderende stof. Man kan i stedet anvende toluen. Både xylen og toluen er brandfarlige og må ikke komme i nærheden af åben ild.

6. Fortegnelse over de vigtigste indol-positive bakterier

Fortegnelsen er baseret på Bergey's Manual, 8. udg.

Escherichia

Edwardsiella

Citrobacter koseri (diversus)

Proteus, alle species undtagen *P. mirabilis*

Yersinia enterocolitica, nogle stammer

Shigella, flere serotyper

Klebsiella, biotypen *oxytoca* og enkelte andre stammer

Salmonella, ganske få stammer

Erwinia herbicola, nogle stammer

Vibrio, 3 species inklusive *V. cholerae*

Aeromonas

Lucibacterium

Flavobacterium meningosepticum

Haemophilus, nogle stammer af flere species

Pasteurella multocida og *P. pneumotropica*

Cardiobacterium hominis

Bacteroides, flere species

Fusobacterium, flere species

Peptococcus, flere species

Bacillus, enkelte sjældne species

Clostridium, mange species

7. Prøvens diagnostiske værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven er pålidelig, da den er let at aflæse og har stor følsomhed. Den direkte Ehrlich-prøve giver ifølge litteraturen falsk positive reaktioner, men hvor hyppigt ved vi ikke. Man må gøre sig klart – især hvis man bruger andre metoder – at i de fleste af vores diagnoseskemaer er disse falske positive medtaget som sandt positive. Prøvens differentieringsevne er god i familien *Enterobacteriaceae* og i flere genera som *Flavobacterium*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptococcus* og *Clostridium*. I mange andre taxa har den ingen diagnostisk betydning; det gælder fx. alle genera af strikt aerobe bakterier, alle gramnegative kokker, grampositive kokker som *Micrococcus*, *Staphylococcus* og *Streptococcus*, og endvidere *Lactobacillus* og coryneforme bakterier fordi reaktionen – muligvis med ganske enkelte undtagelser – altid er negativ i disse taxa.

Blandt de gramnegative, fakultative stave forekommer en positiv indolreaktion og en positiv Voges-Proskauer reaktion relativt sjældent samtidig. Samtidig forekomst kan derfor blive en genvej til en diagnose. Samtidig forekomst træffes blandt oxidase-negative hos *Klebsiella oxytoca*, enkelte *Yersinia enterocolitica* og nogle *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*), og blandt oxidase-positive hos *Aeromonas hydrophila*, nogle stammer af *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* og *Vibrio anguillarum*.

8. Referencer

- Baeyer, A.: Ueber das Indol. Annalen der Chemie und Pharmacie, VIII. Supplementband: 56, 1870.
- Blazevic, D.J., Ederer, G.M. & Matsen, J.M.: Evaluation of a new incubation-type indole strip test. Appl. Microbiol. 19: 547, 1970.
- Bujwid, O.: Eine chemische Reaction für die Cholerabacterien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 2: 52, 1887.
- Böhme, A.: Die Anwendung der Ehrlichschen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 40: 129, 1905.
- Clarke, P.H. & Cowan, S.T.: Biochemical methods for bacteriology. J. gen. Microbiol. 6: 187, 1952.
- Dunham, E.K.: Zur chemischen Reaction der Cholerabacterien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 2: 337, 1887.
- Epps, H.M.R. & Gale, E.F.: The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of *Escherichia coli*: Comparison of the effect with that produced by fermentation acids. Biochem. J. 36: 619, 1942.
- Fung, D.Y.C. & Miller, R.D.: Miniaturized techniques for imvic tests. J. Milk Food Technol. 35: 328, 1972.
- Gadebusch, H.H. & Gabriel, S.: Modified stable Kovacs' reagent for the detection of indole. Amer. J. clin. Path. 26: 1373, 1956.
- Gale, E.F.: The Chemical Activities of Bacteria. Univ. Tutorial Press Ltd., London 1947, p. 117.
- Gnezda, J.: Sur des réactions nouvelles des bases indoliques et des corps albuminoides. C.R. Acad. Sci. (Paris) 128: 1584, 1899.
- Goré, S.N.: The cotton wool plug test for indole. A new technique of applying Ehrlich's reaction for detecting indole in bacterial cultures. Indian J. med. Res. 8: 505, 1921.
- Holman, W.L. & Gonzales, F.L.: A test for indole based on the oxalic acid reaction of Gnezda. J. Bact. 8: 577, 1923.
- Isenberg, H.D. & Sundheim, L.H.: Indole reactions in bacteria. J. Bact. 75: 682, 1958.
- King, E.O.: Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. Amer. J. clin. Path. 31: 241, 1959.
- Kitasato, S.: Die negative Indol-Reaktion der Typhusbacillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bacillenarten. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 7: 515, 1889.
- Kovacs, N.: Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. Z. Immunforsch. 55: 311, 1928.

- Kovacs, N.: Weitere Untersuchungen über den Indolnachweis in Bakterienkulturen. Die Indolbildung auf festen Nährböden. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 123: 391, 1931.
- Kristensen, M.: Investigations into the occurrence and classification of the haemoglobinophilic bacteria. Disputats, Levin & Munksgaard 1922, p. 164.
- Logie, W.J.: On the synthesis of tryptophane by certain bacteria and on the nature of indole formation. J. Path. Bact. 23: 224, 1920.
- Malone, R.H. & Goré, S.N.: The detection of indole in bacterial cultures. A criticism of various methods of applying the nitroso-indole and rosindole reactions, based on a comparative study of their delicacy and specificity. Indian J. med. Res. 8: 490, 1921.
- Newton, W.A. & Snell, E.E.: Formation and interrelationships of tryptophanase and tryptophan synthetases in *Escherichia coli*. J. Bact. 89: 355, 1965.
- Poehl, A.: Ueber einige biologisch-chemische Eigenschaften der Mikroorganismen im Allgemeinen und über die Bildung der Ptomaine durch die Cholerabacillen im Speciellen. Ber. dtsch. chem. Ges. 19: 1159, 1886.
- Reed, R.W.: Nitrate, nitrite and indole reactions of gas gangrene anaerobes. J. Bact. 44: 425, 1942.
- Salkowski, E.: Ueber das "Choleraroth" und das Zustandekommen der Cholerareaction. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie 110: 366, 1887.
- Schuchardt, K.: Bemerkung über das "Choleraroth". Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie 110: 373, 1887.
- Suassuna, I., Lacombe, S.C., Barreto, M.A. & Suassuna, I.R.: The indole reactions of Enterobacteriaceae. I. A comparison of reagents for qualitative tests. An. Microbiol. (Rio de J.) 10: 99, 1962.
- Suassuna, I. & Suassuna, I.R.: The indole reactions of Enterobacteriaceae. II. Cultural conditions affecting indole production. An. Microbiol. (Rio de J.) 10: 123, 1962.
- Sutter, V.L. & Carter, W.T.: Evaluation of media and reagents for indole-spot tests in anaerobic bacteriology. Amer. J. clin. Path. 58: 335, 1972.
- Weaver, D.K., Lee, E.K.H. & Leahy, M.S.: Comparison of reagent-impregnated paper strips and conventional methods for identification of Enterobacteriaceae. Amer. J. clin. Path. 49: 494, 1968.
- Wilson, G.S. & Miles, A.A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Edward Arnold & Co., London 1955, 4. ed. vol. 1, p. 64.

Kapitel 34

Svovlbrinteprøver

Prøver som påviser bakteriers evne til at danne svovlbrinte (H_2S) af svovlholdige organiske og/eller uorganiske forbindelser.

1. Historisk indledning

Svovlbrintes karakteristiske lugt har fra gammel tid være forbundet med forestillingen om forrådnelse især i æg. Pasteurs elev Gayon undersøgte mikroorganismers betydning for processerne i rådne æg, og til påvisning af svovlbrinte anvendte han filterpapir vædet med blyacetat, som bliver sort, hvis luftarten er til stede (Gayon 1875). Carl Julius Salomonsen anvendte samme teknik i sin disputats: "Studier over Blodets Forraadnelse" fra 1877. Da hønseæg på et lidt senere tidspunkt blev anvendt til dyrkning af bakterier, fandt Hueppe (1888), at koleravibrioner dannede H_2S , og Schrank (1888) fandt *Proteus* i rådne æg og viste, at de dannede H_2S . En anden teknik til påvisning af H_2S blev angivet af Fromme (1892). Den var også baseret på princippet, at H_2S med metalsalte danner mørkfarvede uopløselige metalsulfider, men han brugte jerntartrat eller jernsakkarat sat til gelatineplader, hvorved han opnåede at H_2S -dannende bakterier voksede med sorte kolonier, og han kunne bl.a. vise, at tyfusbakterier er kraftige H_2S -dannere.

Der var i disse år megen diskussion om betydningen af de forskellige mediers indhold af svovlholdige bestanddele og om hvordan svovlbrintefrigørelsen foregik (se fx. Holschewnikoff 1889), men Rubner (1893a, b) bragte en vis afklaring, idet han bl.a. viste, at det var svovl fra de organiske forbindelser i medierne, som omdannes til H_2S , og at processen var specifik og ikke udelukkende betinget af de almindelige reduktionsprocesser, der altid foregår i en voksende kultur. Lidt senere viste Beijerinck (1901) imidlertid, at nogle af de medicinske vigtige bakterier også kan danne H_2S af uorganiske svovlforbindelser som thiosulfat og sulfit som eneste svovlkilde. Påvisning af den særlige gruppe bakterier, som i naturen fremkalder sulfatreduktion og store svovlaflejringer, skyldes også Beijerinck, men det er strikt anaerobe, autotrofe bakterier, som falder uden for den medicinske bakteriologi.

De første arbejder, hvor et større antal forskellige bakterier blev karakteriseret efter deres evne til H_2S -dannelse, skyldes Petri & Maassen (1892, 1893a, b), Stagnitta-Balistreri (1893) og Morris (1897). De to sidstnævnte arbejdede hos Rubner, og Morris indførte den teknik, som derefter anvendtes af de fleste til ind i 1930'erne, dvs. tilsætning af blysalt direkte til mediet. Eksempler på medier af denne slags er angivet af Kligler (1917) og Jordan & Victorson (1917), som særligt fremhævede H_2S -reaktionens betydning i *Salmonella*-diagnostik. I litteraturen nævnes det ofte, at Orlowski i St. Petersborg (1897) var den første som brugte blyacetat i medierne, og at han som den første fremhævede forskellen mellem H_2S -negative *E. coli* og H_2S -positive *Salmonella*. Ingen af disse påstande er efter vore undersøgelser rigtige. Det uheldige i at sætte giftige metalsalte til vækstmedierne, som også tidligere undersøgere tildels havde erkendt, blev særligt fremhævet af ZoBell & Feltham (1934), og derefter gik man gradvis over til at anvende jernsalte, som er mindre giftige end bly- og vismutsaltene.

Foruden Fromme (1892) var dog enkelte andre tidligere slået ind på denne vej. Nikolaus Kovács fra Wien angav i 1925 en teknik baseret på tilsætning af ferrosulfat. Hans metode var specielt udarbejdet med henblik på undersøgelse af anaerobe bakterier, og til dyrkningen anvendte han 20% kalvebouillongelatine i høje lag i smalle glas, da det viste sig, at dette sejtflydende medium – han dyrkede ved 37°C – gav tilstrækkelig anaerobe forhold. Tilsat 0,05% ferrosulfat markerede mediet H_2S -dannelse ved en kraftig sort farve, og han opnåede derved i samme kultur at kunne påvise gelatinemelting og H_2S -dannelse. Denne teknik i modificeret form optog Martin Kristensen kort efter i diagnoseafdelingen. Han anvendte 10% gelatine, brugte ferriklorid (0,25%) i stedet for ferrosulfat og gik over til at bruge mediet ved 22°C af hensyn til gelatinemeltingen og anvendte metoden til alle slags bakterier og ikke specielt til anaerobe. Selv beskrev Martin Kristensen et al. først denne modifikation ganske kort i 1935, men Moltke, der skrev disputats om *Proteus vulgaris* i diagnoseafdelingen, anvendte metoden med udmærket resultat og angiver i disputatsen (1927), at Martin Kristensen allerede da brugte den i stor udstrækning ved *Salmonella*-diagnostik.

I de forskellige medier anvendt til H_2S -påvisning siden århundredeskiftet var det de svovlholdige aminosyrer i det tilsatte pepton, der var basis for den dannede H_2S . Tilley (1923) viste, at forskellige peptoner gav varierende resultater og anbefalede derfor at tilsætte thiosulfat for at opnå konstante resultater. Samtidig foreslog Wilson (1923) tilsætning af sulfit. Den første anbefaling har navnlig været fulgt i USA, hvor det meget anvendte medium triple-sugar iron (TSI) og et moderniseret Kligler's medium (som indeholder jernsalt i stedet for det oprindelige blysalt) begge indeholder thiosulfat. Pollock &

Knox (1943) viste, at man også kunne anvende tetrathionat, hvilket bl.a. Pichinoty & Bigliardi-Rouvier (1963) har udnyttet. I forbindelse med indførelse af direkte enzymtest forsøgte Clarke (1953) og Olitzki (1954) at anvende de svovlholdige aminosyrer cystin og cystein direkte som substrat. Det viste sig, at under disse betingelser dannede så mange forskellige bakterier H₂S, at prøvens differentierende værdi praktisk talt gik tabt. Morse & Weaver (1950) anvendte en særlig slags pepton i en direkte enzymtest og fandt også, at for mange stammer var positive, men ved en semikvantivering på grundlag af aflæsningstidspunkt kunne man opnå resultater, som var i overensstemmelse med de gængse prøver. Senest har Padron & Dockstader (1972) anbefalet et medium, der som svovlkilde foruden pepton indeholder sulfit, specielt beregnet til påvisning af *Salmonella*, *Arizona* og *Edwardsiella*.

Sideløbende med udformning af H₂S-prøver baseret på anvendelse af forskellige organiske og uorganiske svovlforbindelser har der været udført undersøgelser, som forsøgte at klarlægge de enzymatiske processer, der fandt sted ved brug af den ene eller den anden svovlkilde. Som det vil fremgå af næste afsnit, er der ikke opnået definitive resultater, og man er derfor endnu ikke nået til, at man ved brug af en bestemt H₂S-prøve med sikkerhed kan angive, hvilke enzymer der er ansvarlige for den positive prøve. Da der sikkert er forskelle, som også ville kunne udnyttes i praktisk diagnostik, er der her et område, hvor yderligere undersøgelser – både biokemiske og bakteriologiske – er meget ønskelige.

2. Biokemisk baggrund

Da der ved dannelsen af H₂S ofte bliver talt om reduktionsprocesser, er det praktisk at have rede på svovlforbindelsernes iltningstrin. De er anført i følgende skema, hvor svovlforbindelserne er skrevet i jonform:

Svovlets iltningstrin

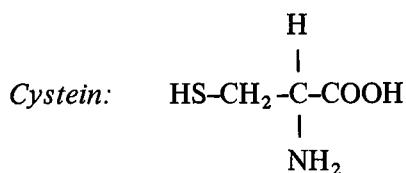
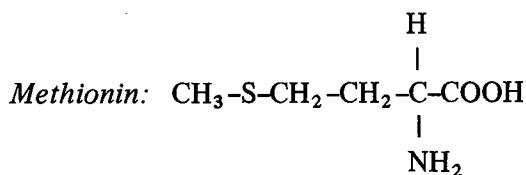
+6	sulfat: SO ₄ ⁻⁻	
+4	sulfit: SO ₃ ⁻⁻	
+2,5	tetrathionat: S ₄ O ₆ ⁻⁻	
+2	thiosulfat: S ₂ O ₃ ⁻⁻	
0	svovl: S ₈	
-2	sulfid: S ⁻⁻	$\left\{ \begin{array}{l} \text{H}_2\text{S: svovlbrinte} \\ \text{FeS: jernsulfid} \\ \text{PbS: blysulfid} \end{array} \right.$

Påvisning af svovlbrinte

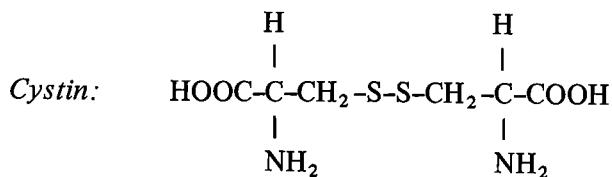
Når der i en kultur dannes sulfid, vil stoffet delvis afgives i luftform som svovlbrinte (H_2S), let erkendeligt ved sin lugt, delvis vil det i ionform reagere med andre forhåndenværende joner. Er det fx. metaljoner som Pb^{++} eller Fe^{++} , vil der dannes tungtopløselige, mørkfarvede metalsulfider (PbS eller FeS). Dissocieringsgraden af H_2S er pH-afhængig, og da sur reaktion nedsætter dissocieringen, hvorved der bliver færre sulfidjoner til at reagere med metaljonerne søger man at undgå, at kulturen bliver for sur ved helt at undlade til sætning af forgærbare kulhydrater eller ved at holde mængden så lav som muligt. Frigjort svovlbrinte vil ved opsugning i fugtigt filtrerpapir efter dissocieres, og de frigjorte sulfidjoner kan så reagere med metaljoner fra den opløsning af metalsalt papiret er fugtet med, og der vil derefter i papiret udfældes brune eller sorte metalsulfider. Ved at anbringe en papirstrimmel fugtet med en metalsaltopløsning oven over substratet i et kulturglas undgår man naturligvis helt, at bakterierne udsættes for metalsaltenes toksiske virkning. Derfor er det en fremgangsmåde, der er velegnet ved undersøgelse af "sarte" eller dårligt voksende bakterier som fx. *Brucella*. Det er en fejlkilde ved denne fremgangsmåde, at blyacetatpapir reagerer med mercaptan, som kan dannes i nogle kulturer.

Dannelse af H_2S fra organiske svovlforbindelser

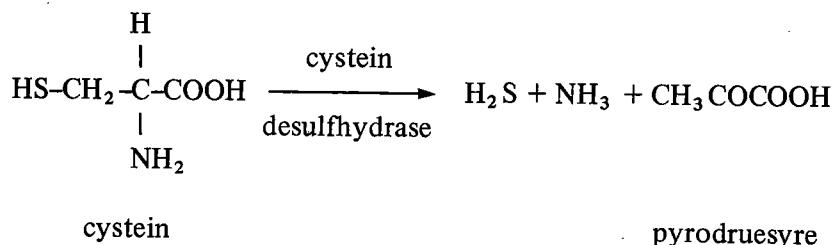
Med organiske svovlforbindelser menes i denne sammenhæng proteiner og mere specielt peptoner, som indeholder de svovlholdige aminosyrer methionin og cystein med følgende formler:



Desuden forekommer cystin, som dannes af 2 molekyler cystein:

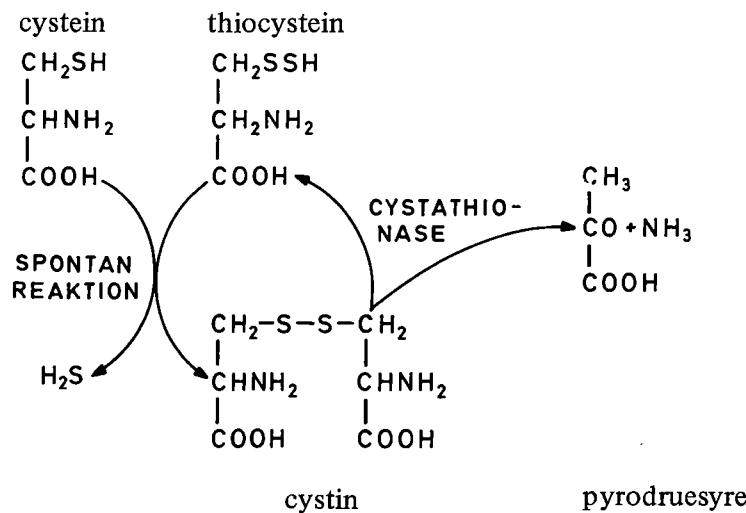


Efter den tidligste opfattelse (Kallio & Porter 1950) frigøres H₂S fra cystein ved hjælp af enzymet cysteindesulphydrase efter følgende formel:



Cystin kan omdannes på samme måde efter at det er reduceret til cystein.

Efter en senere opfattelse (Flavin 1962; Cavallini et al. 1963) er det muligt, at H₂S-dannelsen sker ved en cyklisk proces ved hjælp af enzymet cystathionase og med thiocystein som mellemprodukt. Reaktionen er vist i følgende skema.



Cystathionase er påvist i bakterier, men efter de foreliggende undersøgelser kan man ikke afgøre, hvilken rolle enzymet faktisk spiller, eller om der samtidig er andre muligheder.

Gaarslev (Lautrop et al. 1971) antager, at selv om en vis ringe mængde H₂S dannes direkte ved reduktion af cystein på en eller anden måde, vil en mere massiv H₂S-dannelse altid skyldes, at der først sker en oxidation af H₂S til uorganiske, oxiderede svovlforbindelser som fx. thiosulfat eller tetrathionat, og derefter vil der hos de bakterier, som har de nødvendige reduktaser, ske en sekundær reduktion af de uorganiske svovlforbindelser til H₂S. Denne opfattelse stemmer med, at de fleste bakterier kan danne små mængder H₂S i direkte enzymtest med cystein (Clarke 1953; Olitzki 1954) og med påvisning af, at det er forskellige enzymer som er involveret i H₂S-dannelse fra organiske svovlforbindelser og fra fx. thiosulfat (Tarr 1933, 1934), og med den kendsgerning at H₂S under visse betingelser nemt oxideres til thiosulfat (Kaji & McElroy 1959). Efter denne hypotese har altså alle bakterier, som er H₂S-positive i et ferrikloridgelatinestik, reduktase-enzymer som kan danne H₂S af oxiderede, uorganiske svovlforbindelser, og det er specielt tilstede værelsen af disse enzymer, som gør dem "H₂S-positive" og ikke det ukendte enzym, som direkte kan danne H₂S af cystein, selv om det indgår i den samlede proces.

Dannelse af H₂S fra uorganiske svovlforbindelser, dvs. thiosulfat, tetrathionat og sulfit

H₂S-dannelse fra sulfat er ikke medtaget her, da det som tidligere nævnt er en egenskab, der kun forekommer i en meget specialiseret bakteriegruppe (*Desulfovibrio*), der udfører en såkaldt dissimilatorisk sulfatreduktion, dvs. en energigivende anaerob respiration med sulfat som elektronacceptor. Foruden den dissimilatoriske sulfatreduktion forekommer en assimilatorisk sulfatreduktion, hvorved flertallet af alle bakterier skaffer sig det svovl, som er nødvendigt for cellernes opbygning (Cowie et al. 1950, 1951; Bolton et al. 1953). Enzymatisk er de to reduktionsprocesser forskellige, idet svovlet ved den dissimilatoriske proces ender som frie sulfidjoner, der sekundært omdannes til svovlbrinte og svovl og ved den assimilatoriske proces ender som organisk bundne SH-grupper i aminosyrer.

De processer, der finder sted i en svovlbrinteprové, når man anvender oxiderede svovlforbindelser (tetrathionat, thiosulfat, sulfit) som udgangsmateriale, består også i en reduktion af svovl fra et højere til et lavere tiltningsstrin, men enzymerne er næppe de samme som dem der indgår i en assimilatorisk sulfatreduktion. Forholdene i en H₂S-prøve er ufysiologiske, fordi svovlkilden er til stede i forholdsvis stor mængde, og en anden vanskelighed ved analysen af de enzymatiske processer er de forskellige svovlforbindelser store tilbøjelighed til indbyrdes spontan omdannelse.

Processen ved anvendelse af tetrathionat som udgangsmateriale er omtalt af Pollock & Knox (1943) og Pichinoty & Bigliardi-Rouvier (1963). Resultater af en tetrathionatprøve er omtalt af Le Minor (1967) og Le Minor et al. (1970). De to enzymer, der fungerer, er en "tetrathionatreduktase", som omdanner tetrathionat til thiosulfat, og en "thiosulfatreduktase", som omdanner thiosulfat til sulfid. Disse to enzymer induceres kun og fungerer kun i iltfrit miljø. Da processerne medfører frigørelse af frie brintjoner og derfor en forskydning af pH til sur side, kan enzymaktiviteten påvises med en syrebaseindikator (Le Minor 1970).

Processerne ved anvendelse af thiosulfat som udgangsmateriale i en svovlbrinteprøve er omtalt af Artman (1956), Kaji & McElroy (1959) og Pichinoty (1962).

Anvendelse af sulfit som udgangsmateriale er først omtalt af Wilson (1923); senere har Wilson & Blair (1924), Skovgaard (1958, 1964) og Padron & Dockstader (1972) brugt H₂S-medier suppleret med sulfit. Den biokemiske baggrund for omdannelse af sulfit til sulfid i disse prøver er ikke kendt. Man kender fra den assimilatoriske sulfatreduktion en særlig "sulfitreduktase", et af de mest kompliceret byggede enzymer, som bl.a. er påvist i *E. coli* (Mager 1960; Kemp et al. 1963), men dettes funktion er øjensynlig kun at skaffe sulfidjoner til cysteinsyntesen (White et al. 1973).

3. Valg af metode

Erfaringen viser, at direkte enzymtests med cystein eller cystin som substrat er så følsomme, at næsten alle bakterier giver en positiv reaktion, og de er derfor uden praktisk værdi til differentiering. Anderledes er det med de metoder, hvor sulfit, thiosulfat eller tetrathionat er substrat; de giver en god differentiering, ligesom den oprindelige vækstmetode, hvor pepton samtidig er næringssubstrat og svovlkilde. Forklaringen herpå er sandsynligvis – som tidligere omtalt – at man i begge tilfælde kun får positive reaktioner med de bakterier, som har enzymer der kan reducere oxiderede, uorganiske svovlforbindelser. Der er øjensynlig forskel på de resultater, man opnår ved anvendelse af de forskellige uorganiske svovlforbindelser, og det antyder, at man med fordel ville kunne anvende metoder, der skelner mellem bakterier, som har sulfit-, thiosulfat- og tetrathionatreduktaser, men foreløbig mangler man de nødvendige sammenlignende undersøgelser. Indtil videre mener vi, at man bør anvende den klassiske prøve med pepton som eneste svovlkilde. Måske burde man dog sætte thiosulfat til mediet for at undgå variationer som følge af vekslende peptonkvalitet.

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

a) *Stik i ferroklorid-pepton-gelatine medium (Kristensen et al. 1935) modificeret efter Kovács (1925)*

Substrat

Pepton (Bacto)	2,5%
Kødeksstrakt (Difco)	0,75%
NaCl	0,5%
Gelatine	12,0%
FeCl ₂ ,4H ₂ O	0,05%

pH indstillet til 7,3–7,4.

Aftappet i 6 cm høj søjle i smalle (155 x 10/11 mm) reagensglas lukket med paraffineret korkprop.

Udførelse: Fra en renkultur på et af standardmedierne tages et rigeligt inoculum på en lige platinståltråd, som føres helt til bunds midt igennem substratsøjlen i glasset. Efter tilsåningen skal glasset omhyggeligt lukkes med den paraffinerede korkprop, dels for at undgå fordampning af H₂S, dels for at forhindre at fri ilttilgang medfører re-oxidation af svovlbrinte eller det dannede jernsulfid. Inkubering sker ved 22°C, som ikke er optimalt for H₂S-dannelsen (her ville ca. 30–34°C være bedst), men nødvendigt af hensyn til gelatinens varmesmelting.

Aflæsningen foretages dagligt i indtil 4 dage. En positiv reaktion viser sig som en sortfarvning af substratet langs stikkanalen; som regel mest intens i bunden af glasset og ofte manglende svarende til de øverste mm af substratsøjlen. Sortfarvningens intensitet varierer fra helt kulsort til en svag grå farve, som ses tydeligst, hvis man holder glasset op mod et stykke hvidt papir.

Fortolkning: Som et positivt prøveudfald registreres både kulsorte og grå farver langs stikkanalen. De kulsorte kan registreres som stærkt positive (+++); dem ser man med *Proteus vulgaris* og *P. mirabilis*, *Salmonella* og *Citrobacter freundii*; dog skal man huske at *S. typhi* giver en svagere positiv reaktion end de andre *Salmonella*. De grå kan registreres som svagt positive (+); det vil ofte vise sig at være *Proteus morganii*, *Hafnia alvei* eller *Citrobacter koseri*. Men i mange substratportioner optræder de svagt positive (grå) som helt negative.

En mere eller mindre udtalt brunfarvning i substratsøjlets øverste 4–5 mm er ikke ualmindelig; denne ændring skyldes ikke svovlbrintedannelse og registreres som negativt udfald.

Hvis der er tale om en stærkt gelatinesmeltende bakterie som fx. *Proteus* eller *Aeromonas*, kan en samtidig positiv H₂S-reaktion være vanskeligere at konstatere, fordi det dannede ferrosulfid ikke vil være koncentreret omkring stikkanalen, men vil være jævnt fordelt i hele den smelte substratsøje, som antager en diffus grålig farve. Ved sammenligning med et tilslæt H₂S-negativt glas, som man smelter under varmtvandshanen, kan man lettere afgøre, om farven er ændret.

Forskellige portioner af H₂S-mediet kan vise variationer i graden af sværtning. Normalt afprøves en ny substratportion, før den sendes i laboratorierne, men konstaterer man, at en forventet stærkt positiv reaktion er svagere end sædvanligt, er der grund til at kontakte substratafdelingen.

b) Halvflydende blyacetatmedium med ascites til anaerobe bakterier
Substrat

Ascites	30%
Blyacetat	0,1%
Agar	0,28%
Filtreret bouillon	

Aftappet i ca. 8 cm høje sørjer (10 ml) i alm. reagensglas (155 x 14/15mm) tilproppt med paraffineret vatprop.

Udførelse: Tilsås fra standardmedier med rigeligt inoculum ved stik til bunden af glasset. Inkuberes ved 35°C under aerobe eller anaerobe forhold.

Aflæsning: Aflæses dagligt indtil 7 dage. Ethvert tegn på grå eller sort farve i mediet tages som udtryk for en positiv reaktion.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ud over de sædvanlige sikkerhedsforanstaltninger ved omgang med patogene bakterier kræves intet særligt. Dog er det værd at huske at indånding af større mængder H₂S er farligt.

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Af det foregående kan man se, at spørgsmålet om hvorvidt en bakterie karakteriseres som H₂S-positiv eller H₂S-negativ for en stor del er et spørgsmål om, hvilken metode der er anvendt. Da karakteristikkerne i Bergey's Manual ofte intet oplyser om de anvendte metoder, vil en fuldstændig komplilation

af resultaterne angående evne til H₂S-produktion være af begrænset værdi. Vi har valgt stort set kun at anføre de resultater fra Bergey's Manual, som er i overensstemmelse med egne erfaringer baseret på de to her beskrevne metoder, som i mange år har været anvendt i diagnoseafdelingen.

Pseudomonas putrefaciens (som egentlig ikke er en *Pseudomonas* og nylig er overført til slægten *Alteromonas*) er stærkt positiv.

Xanthomonas: flere species.

Brucella: med vore metoder negativ, men med mere følsomme metoder er nogle biotyper positive, andre negative, og dette bruges i biotypeindelingen.

Edwardsiella tarda: alle stammer.

Citrobacter: *C. freundii*, alle stammer stærkt positive; *C. koseri*, alle stammer svagt positive.

Salmonella: de fleste serotyper stærkt positive dog er *S. paratyphi A* altid negativ. I serotyperne *S. typhi*, *S. paratyphi B* og *S. cholerae suis* forekommer nogle negative stammer; i enkelte sjældnere serotyper er alle stammer negative.

Proteus: *P. vulgaris* og *P. mirabilis* stærkt positive; *P. morganii* svagt positiv.

Aeromonas: de fleste subspecies.

Fusobacterium: de fleste stammer.

Veillonella: alle species.

Peptococcus: alle species.

Peptostreptococcus: 1 species.

Clostridium: ca. $\frac{1}{3}$ af alle species og nogle stammer i andre species.

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Reproducerbarheden i en forud kontrolleret portion af diagnoseafdelingens standardmedium må anses for at være god.

Kun i familien *Enterobacteriaceae* og i genus *Clostridium* er fordelingen mellem H₂S-positive og H₂S-negative taxa således, at prøven bliver af stor differentialdiagnostisk værdi. Begge disse grupper indeholder også sulfitreduktase-positive stammer.

Ser man bort fra *Edwardsiella*, som vi hidtil ikke er stødt på, og de H₂S-positive *Proteus*-arter, som er lette at diagnosticere, er blandt tarmbakterierne *Salmonella* (inklusive *Arizona*) og *Citrobacter freundii* de H₂S-positive, og på denne reaktion kan der i almindelighed lægges stor vægt, selv om nogle enkelte *Salmonella* serotyper og stammer er H₂S-negative. Indtil for få år siden regnedes *E. coli* for undtagelsesfrit at være H₂S-negativ, men stammer, der er blevet H₂S-positive på grund af et overførbart plasmid, træffes nu med

en hypsighed på 1-2 % blandt *E. coli* isolater (Lautrop et al. 1971).

I fæcesdiagnostik udnytter man *Salmonella* typernes evne til H₂S-dannelse, idet man ved at inkludere thiosulfat og ferricitrat i pladerne opnår, at alle H₂S-positive bakterier danner kolonier med et sort centrum på grund af udfældet jernsulfid; hervedlettes pladeaflæsningen overordentlig meget.

8. Referencer

- Artman, M.: The production of hydrogen sulphide from thiosulphate by *Escherichia coli*. J. gen. Microbiol. 14: 315, 1956.
- Beijerinck, M.W.: Sur la formation de l'hydrogène sulfuré dans les canaux, et le genre nouveau Aërobacter. Arch. néerl. Sci. exactes et nat. Serie II, Tome IV: 1, 1901.
- Bolton, E.T., Cowie, D.B. & Sands, M.K.: Sulfur metabolism in *Escherichia coli*. III. The metabolic fate of sulfate sulfur. J. Bact. 63: 309, 1952.
- Cavallini, D., Mondovi, B. & Marco, C. de: The identity of cysteine desulphydrase with cystathionase and mechanism of cysteine-cystine desulphydrase. In: Snell, E.E., Fasella, P.M., Braunstein, A. & Favelli Rossi, A. (eds.): Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis. Pergamon Press, London 1963 (Proceedings fra Symposium 1962 i Rom), p. 361.
- Clarke, P.H.: Hydrogen sulphide production by bacteria. J. gen. Microbiol. 8: 397, 1953.
- Cowie, D.B., Bolton, E.T. & Sands, M.K.: Sulfur metabolism in *Escherichia coli*. I. Sulfate metabolism of normal and mutant cells. J. Bact. 60: 233, 1950.
- Cowie, D.B., Bolton, E.T. & Sands, M.K.: Sulfur metabolism in *Escherichia coli*. II. Competitive utilization of labeled and nonlabeled sulfur compounds. J. Bact. 62: 63, 1951.
- Flavin, M.: Microbial transsulfuration: the mechanism of an enzymatic disulfide elimination reaction. J. biol. Chem. 237: 768, 1962.
- Fromme, A.: Ueber die Beziehung des metallischen Eisens zu den Bakterien und über den Werth des Eisens zur Wasserreinigung. Centralbl. Bakt. 12: 274, 1892.
- Gayon, U.: Recherches sur les altérations spontanées des oeufs. Thesis, Gauthier-Villars, Paris 1875, p. 23.
- Gayon, U.: Sur les altérations des oeufs, à l'occasion d'une Note de MM A. Béchamp et G. Eustache. C.R. Acad. Sci. (Paris) 85: 1074, 1877.
- Holschewnikoff: Ueber die Bildung von Schwefelwasserstoff durch Bacterien. Fortschr. Med. 7: 201, 1889.
- Hueppe, F.: Ueber die Verwendung von Eiern zu Kulturzwecken. Centralbl. Bakt. 4: 80, 1888.
- Jordan, E.O. & Victorson, R.: Differentiation of the paratyphoid-enteritidis group, II. Lead acetate agar. J. infect. Dis. 21: 554, 1917.
- Kaji, A. & McElroy, W.D.: Mechanism of hydrogen sulfide formation from thiosulfate. J. Bact. 77: 630, 1959.
- Kallio, R.E. & Porter, J.R.: The metabolism of cystine and cysteine by *Proteus vulgaris* and *Proteus morganii*. J. Bact. 60: 607, 1950.
- Kemp, J.D., Atkinson, D.E., Ehret, A. & Lazzarini, R.A.: Evidence for the identity of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific sulfite and nitrite reductases of *Escherichia coli*. J. biol. Chem. 238: 3466, 1963.

- Kligler, I.J.: A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Amer. J. publ. Hlth 7: 1042, 1917.
- Kovács, N.: Einige Neuerungen in der Technik der Anaerobenzüchtung. Wien. med. Wschr. 75: 1887, 1925.
- Kristensen, M., Bojlén, K. & Kjær, T.: Systematische Untersuchungen über colähnliche Bakterien. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 134: 318, 1935.
- Lautrop, H., Ørskov, I. & Gaarslev, K.: Hydrogensulphide producing variants of *Escherichia coli*. Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 79: 641, 1971.
- Mager, J.: A TPNH-linked sulfite reductase and its relation to hydroxylamine reductase in enterobacteriaceae. Biochim. biophys. acta 41: 553, 1960.
- Minor, L. le: Distribution de la tétrathionate-réductase chez divers sérotypes de *Salmonella*. Ann. Inst. Pasteur 113: 117, 1967.
- Minor, L. le, Chippaux, M., Pichinoty, F., Coynault, C. & Piéchaud, M.: Méthodes simples permettant de rechercher la tétrathionate-réductase en cultures liquides ou sur colonies isolées. Ann. Inst. Pasteur 119: 733, 1970.
- Moltke, O.: Contribution to the characterization and systematic classification of Bac. proteus vulgaris (Hauser). Disputats, København 1927.
- Morris, M.: Studien über die Production von Schwefelwasserstoff, Indol und Merkaptan bei Bacterien. Arch. Hyg. (Berl.) 30: 304, 1897.
- Morse, M.L. & Weaver, R.H.: Rapid microtechnics for identification of cultures. III. Hydrogen sulfide production. Amer. J. clin. Path. 20: 481, 1950.
- Olitzki, A.L.: Hydrogen sulphide production by non-multiplying organisms and its inhibition by antibiotics. J. gen. Microbiol. 11: 160, 1954.
- Orłowski, A.A.: Beitrag zur Kenntnis der biologischen und pathogenen Eigenschaften des Bacterium coli commune. Centralbl. Bakt. 1. Abt. 22: 134, 1897.
- Padron, A.P. & Dockstader, W.B.: Selective medium for hydrogen sulfide production by salmonellae. Appl. Microbiol. 23: 1107, 1972.
- Petri, R.J. & Maassen, A.: Ueber die Bildung von Schwefelwasserstoff durch die krankheitserregenden Bakterien unter besonderer Berücksichtigung des Schweinerothlaufes. Centralbl. Bakt. 11: 289, 1892.
- Petri, R.J. & Maassen, A.: Beiträge zur Biologie der krankheitserregenden Bakterien insbesondere über die Bildung von Schwefelwasserstoff durch dieselben unter vornehmlicher Berücksichtigung des Schweinerothlaufes. Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.) 8: 318, 338, 1893a.
- Petri, R.J. & Maassen, A.: Weitere Beiträge zur Schwefelwasserstoffbildung aërobe Bakterien und kurze Angaben über Merkaptanbildung derselben. Arb. Kaiserl. Gesundh.-Amte (Berl.) 8: 490, 1893b.
- Pichinoty, F.: Répression par l'oxygène de la biosynthèse de la thiosulfate-réductase de *Proteus vulgaris*. Experimentia 18: 501, 1962.
- Pichinoty, F. & Bigliardi-Rouvier, J.: Recherches sur la tétrathionate-réductase d'une bactérie anaérobie facultative. Biochem. biophys. acta 67: 366, 1963.
- Pollock, M.R., Knox, R. & Gell, P.G.H.: Bacterial reduction of tetrathionate, Nature 150: 94, 1942.
- Pollock, M.R. & Knox, R.: Bacterial reduction of tetrathionate. Biochem. J. 37: 476, 1943.
- Rubner, M.: Ueber den Modus der Schwefelwasserstoffbildung bei Bacterien. Arch. Hyg. 16: 53, 1893a.

- Rubner, M.: Die Wanderungen des Schwefels im Stoffwechsel der Bakterien. Arch. Hyg. 16: 78, 1893b.
- Salomonsen, C.J.: Studier over Blodets Forraadnelse. Disputats, G. Torsts Boghandel, København 1877.
- Schrank, J.: Untersuchungen über den im Hühnerei die stinkende Fäulniss hervorrufenden Bacillus. Wiener Med. Jahrbücher 1888, p. 313.
- Skovgaard, N.: Om specifik tælling af clostridier i levnedsmidler. VIII Nordiska veterinär-mötet – Sektion E, rapport 2. 1958.
- Skovgaard, N.: Salmonellafund i levnedsmidler. Nord. Vet.-Med. 16: 206, 1964.
- Stagnitta-Balistreri: Die Verbreitung der Schwefelwasserstoffbildung unter den Bacterien. Arch. Hyg. 16: 10, 1893.
- Tarr, H.L.A.: The enzymic formation of hydrogen sulphide by certain heterotrophic bacteria. Biochem. J. 27: 1869, 1933.
- Tarr, H.L.A.: The enzymic formation of hydrogen sulphide by certain heterotrophic bacteria. II. Biochem. J. 28: 192, 1934.
- Tilley, F.W.: The relation between chemical composition of peptones and hydrogen sulphide production by bacteria. J. Bact. 8: 287, 1923.
- White, A., Handler, P. & Smith, E.L.: Principles of Biochemistry, 5. ed. McGraw Hill, London 1973, p. 398.
- Wilson, W.J.: Reduction of sulphites by certain bacteria in media containing a fermentable carbohydrate and metallic salts. J. Hyg. (Lond.) 21: 392, 1923.
- Wilson, W.J. & Blair, E.M.M'v.: The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. J. Path. Bact. 27: 119, 1924.
- ZoBell, C.E. & Feltham, C.B.: A comparison of lead, bismuth, and iron as detectors of hydrogen sulphide produced by bacteria. J. Bact. 28: 169, 1934.

Kapitel 35

Ureaseprøver

Med ureaseprøver påvises tilstedeværelse af enzymet urease, som spalter urinstof til ammoniak og kuldioxyd.

1. Historisk indledning

Pasteur's klassiske gæringsundersøgelser omfattede også den fra gammel tid kendte urinstofgæring. I 1862 så han mikroorganismer i ammoniakalsk dekomponeret urin, og i 1864 dyrkede hans elev van Tieghem fra en sådan urin en bakterie, som han videreførte i kulturer i steril urin. Bakterien fremkaldte dekomposition med ammoniakk dannelse både af urin og af kunstigt fremstillede urinstofopløsninger.

I 1872 beskrev Ferdinand Cohn en urinstofspaltende *Micrococcus ureae* (muligvis *Staphylococcus saprophyticus* efter nugældende nomenklatur), og andre urinstofspaltere blev beskrevet af von Jaksch (1881) og af Leube & Graser (1885). Indgående undersøgelser over bakteriel urinstofspaltung foretog Miquel (1898) og Beijerinck (1901). Hvornår man mere målbevidst begyndte at anvende urinstofspaltende evne til karakteristik af forskellige bakterier står ikke klart, men Brodmeier (1895) bekræftede en tidligere fremsat påstand om, at *Proteus* hørte til urinstofspalsterne, og Thorkild Rovsing viste i sin disputats om blærebetændelse (1889), at de fleste fra urinen isolerede bakterier i hans materiale spaltede urinstof. I et senere arbejde (1897) udtalte Rovsing: ” — jeg tror at Manglen på urinstofdekomponerende Evne er en ligeså constant Karakter for *B. coli* som dens Mangel på Evne til at farves efter den Gramske Methode”. Her er det i hvert fald tydeligt, at evnen til urinstofspaltung erkendes som en diagnostisk værdifuld egenskab.

Fra omkring århundredeskiftet og indtil 1940'erne blev undersøgelsen for urease især foretaget som led i identifikationen af *Proteus*. Man anvendte steril urin med neutral pH eller en urinstofopløsning og konstaterede omslag til basisk reaktion ved hjælp af en indikator; som et eksempel kan nævnes Moltkes disputats (1927) fra diagnoseafdelingen om *Proteus vulgaris*.

I 1941 kritiserede White & Hill med rette den hidtil anvendte fremgangsmåde ved at fremhæve, at reaktionsomslaget kunne skyldes andre basiske stoffer end ammoniak, og at ammoniakdannelsen kunne stamme fra andre stoffer end urinstof. De udarbejdede en mere fejlfri metode, som dog var ret besværlig, men kunne med denne metode vise, at en del andre bakterier end *Proteus* dannede urease, selv om der i kvantitativ henseende var stor variation.

Samme år angav Rustigan & Stuart (1941) en ny metode, som ved til-sætning af gærestrakt skulle sikre, at der altid var rimelige vækstbetingelser for de undersøgte stammer. Mængden af gærestrakt – 0,01% – var dog så lille, at man kan være i tvivl om, at det tilsigtede resultat blev opnået. De indførte også kontrolundersøgelser i urinstoffri substrater, som skulle sikre mod de af White & Hill påviste fejlkilder. Mens deres undersøgelser stadig især stilede mod en sikker identifikation af *Proteus*, anvendte Ferguson & Hook (1943) metoden til at vise, at *Salmonella*-stammer var urease-negative, og anbefalede derfor ureaseprøven til differentiering mellem *Proteus* og *Salmonella* i diagnostik af tamptogene bakterier.

I et senere arbejde af Stuart et al. (1945) blev de nærmere betingelser for at bruge ureaseprøven som en pålidelig *Proteus*-test fastlagt, og herunder kom forfatterne ind på, at man ved at reducere mængden af stødpude i mediet dels kunne opnå et hurtigere resultat med *Proteus*, dels kunne udnytte svagere (senere) reaktioner ved diagnostik af andre arter af *Enterobacteriaceae*. Da det er tvivlsomt, hvor meget bakterierne vokser i det anvendte medium, og da forfatterne anbefalede brug af stort inoculum (3 "loops" til 1,5 ml substrat), må prøven opfattes som en hurtig, direkte enzymtest baseret på præformeret enzym, selv om den ikke blev betegnet som sådan. I modificeret form med udeladelse af gærestrakttillsætning blev prøven indført som en direkte enzymtest i diagnoseafdelingen i slutningen af 40'erne, hvor den siden – fejlagtigt – har gået under betegnelsen modificeret Ferguson & Hook's ureaseprøve.

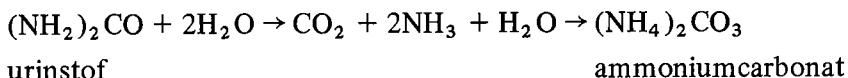
Blake Christensen (1946) mente, at man burde udføre en ureaseprøve under betingelser, hvor bakterierne i deres vækst ikke var afhængige af ammoniak fra urinstofspaltningen som kvælstofskilde, og komponerede derfor et fast medium (skråagar) baseret på et lavt peptonindhold (0,1%). Dermed forøges muligheden for falsk positive reaktioner (White & Hill 1941), men det mente han at kunne modarbejde ved at inkludere 0,1% glukose, som under væksten omdannes til syre. Kontrolforsøg med en række *Enterobacteriaceae*-stammer syntes at vise, at falsk positive reaktioner ikke forekom, og at den hastighed hvormed den alkaliske reaktion forplantede sig til skråglassesets klump kunne bruges til at graduere reaktionsstyrken. Christensen anbefalede

sit medium til "screening" ved rutineundersøgelse af fæcesprøver. Mediet har siden fundet stor anvendelse i diagnostikken af *Enterobacteriaceae*, især i USA. Mens man formodentlig kan stole på resultatet, når det drejer sig om undersøgelse af glukoseforgærende bakterier, er det mere end tvivlsomt, om det samme gælder for ikke-forgærende bakterier.

Af nyere arbejder om ureaseprøven foreligger et af Ederer et al. (1971), som anbefaler en hurtigprøve til samtidig undersøgelse for urease og fenylalanindeaminase; et af Vuye & Pijck (1973) hvor forskellige ureaseprøver sammenlignes, og den bedst egnede til bestemte formål udpeges; og et af Murphy & Hawkins (1975) som behandler ureaseprøver ved identifikationen af myco-bakterier. Ingen af dem indeholder afgørende fornyelser.

2. Biokemisk baggrund

Det neutralt reagerende urinstof hydrolyses af enzymet urease til ammoniak og kuldioxyd. I vandig opløsning dannes derfor ammoniumhydroxyd og kulsyre, der reagerer sammen og danner opløseligt ammoniumcarbonat. Skematisk er processen vist i følgende skema:



Reaktionen medfører en forskydning i pH fra neutral til basisk, og i klinisk bakteriologi er en påvisning af pH forskydningen ved hjælp af en indikator den almindeligst anvendte metode til at påvise urease-aktivitet. Som nævnt i den historiske indledning er det under visse forsøgsbetegnelser nødvendigt ved kontrolforsøg at sikre sig, at pH forskydningen ikke skyldes andre processer (White & Hill 1941).

Urease er meget udbredt i planteverdenen, men sjældent hos dyr. Det er også hyppigt blandt bakterier; Seneca et al. (1962) har hævdet, at det forekom i alle bakterier, men Jeffries (1964) viste, at det ikke var rigtigt.

Urease var det første enzym, som blev isoleret i fuldstændig ren form. Summer (1926) fremstillede det af bønner og kunne af en renset opløsning udkrystallisere det aktive stof, som viste sig at være et protein. Siden da har man erkendt, at alle enzymer er proteiner. Molekylvægten er ca. 480.000. Virkningen er strengt specifik, ingen andre stoffer end urinstof spaltes. Enzymet er konstitutivt, og påvisningen af en såkaldt adaptiv urease i *Pseudomonas aeruginosa* skyldes vist en fortolkningsfejl (DeTurk 1955). Enzymdannelsen er stærkt pH afhængig: ved faldende pH stiger ureaseproduktionen, ved stigende pH falder den. Det betyder, at enzymproduktionen stimuleres i sub-

strater indeholdende glukose og andre forgærbare kulhydrater, forudsat at bakterien danner syre af kulhydraterne (Ishikawa 1928; Richard 1975). I peptonholdige medier, hvor der frigøres ammoniak, sker der omvendt en undertrykkelse af ureasedannelsen. Enzymets aktivitet er til gengæld ret uafhængigt af pH; man udfører som regel prøverne ved en pH mellem 7,0 og 7,5. Enzymet grupperes blandt hydrolaserne, da substratspaltningen sker under vandoptagelse.

Enzymet findes kun intracellulært, og da cellemembranen er en delvis barriere for urinstofs indtrængen i cellen, kan aktiviteten i en bakteriesuspension forøges ved forudgående behandling med toluen, som forøger membranpermeabiliteten.

3. Valg af metode

Man har mulighed for at vælge en prøve og en aflæsningstid, som medfører, at kun de kraftigste ureasedannende bakterier som fx. *Proteus* vil blive registreret som positive, men man kan også vælge en mere følsom prøve, hvor desuden alle svagt ureasedannende bakterier vil give positiv reaktion, og ved en semikvantitering af resultaterne udnytte dem efter den forhåndenværende viden om de stærke, moderate og svage reaktioners differentierende værdi i forskellige diagnostiske situationer. Den første mulighed svarer til den ældre brug af ureaseprøven væsentligst som en "Proteus-prøve", men der er idag ingen grund til ikke at vælge den mest følsomme prøve, selv om man ved, at de svage reaktioner oftest er uden værdi i praksis. Men naturligvis forudsætter det, at man ret strengt holder sig til de givne regler for semikvantitering af resultaterne.

I diagnoseafdelingen anvendte man tidligere til ureaseprøven et flydende vækstmedium med samme sammensætning som Christensens urinstofagar (1946) og et kontrolglas uden urinstoftilsætning. Sidst i 1940'erne indførte Martin Kristensen en direkte enzymtest baseret på Stuart et al.'s (1945) såkaldte "rapid test" med små modifikationer, derunder et kontrolglas med substrat uden tilsat urinstof. Denne direkte enzymtest for ureasepåvisning beskrives i det følgende. Hvis man fx. til *Enterobacteriaceae* skulle foretrække et vækstmedium, vil vi anbefale at bruge Christensens urinstofagar, men fremhæve at prøven kun er egnet til kulhydratforgærende bakterier.

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Direkte enzymtest anvendt i diagnoseafdelingen

a) Urinstofopløsning (i substratafdelingens opskrifter betegnet som urea til ureaseprøve)

Urinstof	1,0%
Primært kaliumfosfat (KH_2PO_4)	0,1%
Sekundært kaliumfosfat (K_2HPO_4)	0,1%
NaCl	0,5%
Fenolrødt (1:500)	5 ml/liter
pH indstillet til 7,0	
Ca. 0,5 ml aftappet i Widalglas (70 x 10/11 mm) som er mærket urea+	

b) Kontrolopløsning

Som a) uden urinstof, glasset mærket urea-

Udførelse

Som inoculum anvendes celler fra en døgngammel renkultur på en bouillonagarplade eller en anden standardplade. Indholdet af to middelstore øskner – maximalt fyldt med kultur – overføres til Widalglasset og fordeles jævnt ved forsigtig rotation af platinøskenen i væskeren. På samme måde laves en suspension i kontrolglasset, og man sikrer sig ved sammenligning, at farven er ens i de to glas. Før glassene anbringes i 35°C termostat, sættes gummipropær på, dels for at undgå fordampning og optagelse af ammoniakdampe fra termostatluften, dels for at nedsætte risikoen, hvis et stativ tabes eller vælter. Henstand ved 35°C anvendes som standardmetode, men henstand ved stuetemperatur giver praktisk talt samme resultat.

Aflæsning og fortolkning

Ved pH 7,0 er fenolrødt svagt gulligbrunlig, mens det ved pH over 8,5 viser en klar rosarød farve. Ved aflæsningen sammenlignes farven i de to glas, og hvis den er mere rød i urinstofopløsningen end i kontrolopløsningen, betegnes prøven som positiv.

Aflæsning skal ske 15 minutter, 2 timer og ca. 20 timer efter suspenderingen. Rød farve efter 15 minutter betegnes som stærkt (+++) positiv, efter 2 timer som middelstærk (++) positiv og efter ca. 20 timer som svagt (+)

positiv. Er der ingen rød farve i urinstofglasset efter 20 timer, betegnes prøven som negativ.

Hvis kontrolglasset er lige så rødt som urinstofglasset, er prøven uaflæselig; som regel skyldes dette resultat, at kulturen i sig selv har været stærkt alkalisk, hvilket angiver, at betingelserne for produktion af en evt. tilstedevarende urease har været ugunstige,

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Arbejdet med at fremstille tætte suspensioner af bakterier i små, snævre glas rummer risiko både for aerosoldannelse og for at efterlade bakterier på kanten af glasset. Kraftig afsluttende flambering af glassets kant skal altid udføres.

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

Genet, der koder for urease-enzymet, findes som regel placeret på kromosomet, men i de senere år er der i sjældne tilfælde fundet ekstrakromosomale DNA elementer (plasmider), som kan føre til ureasedannelse. Da sådanne ekstrakromosomale elementer kan overføres mellem mange mere eller mindre beslægtede bakterier, vil man i sjældne tilfælde træffe stammer hørende til en urease-negativ taxon, som overraskende viser sig at danne urease, fordi den bærer et sådant overført plasmid. Der er fx. fundet enkelte urease-positive stammer af *E. coli* og *Streptococcus faecium* (Cook 1976; Reanney 1976).

a) Taxa med stammer der som regel giver stærk (+++) positiv reaktion

Proteus: alle species undtagen *P. inconstans*, som kun sjældent er positiv

Yersinia: alle species undtagen *Y. pestis*

Actinobacillus: alle species undtagen *A. actinomycetemcomitans*

Pasteurella: *P. ureae* og *P. pneumotropica*

Bordetella undtagen *Bord. pertussis*

Sporosarcina ureae

Eubacterium ureolyticum

b) Taxa med stammer der som regel giver middelstærk (++) eller svagt (+) positiv reaktion

Klebsiella: de fleste stammer

Enterobacter: nogle stammer

Haemophilus: de fleste biotyper af *H. influenzae* og *H. parainfluenzae*
samt *H. pleuropneumoniae*

Brucella: nogle stammer

- Moraxella phenylpyruvica*: de fleste stammer
Acinetobacter: nogle stammer
Streptococcus salivarius: de fleste stammer
Bacillus: nogle stammer i flere species
Clostridium: en enkelt species: *Cl. sordelli*
Corynebacterium: en del species
Nocardia: mange species
Bacterionema: ca. halvdelen af stammerne
Mycobacterium: mange species

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

De kraftige ureasereaktioner (+++ reaktioner) er nyttige ved differentiering mellem arterne inden for slægterne *Proteus* (inklusive *Providencia*), *Yersinia*, *Actinobacillus*, *Pasteurella* og *Bordetella*.

De moderat kraftige reaktioner (++) kan bruges som et positivt bidrag til diagnosen af stammer inden for de arter, hvor de vides at forekomme, men de er sjældent så konstant til stede i en given art, at manglende forekomst af urease kan tillægges afgørende betydning.

De svage reaktioner (+) har i øjeblikket som regel ingen praktisk diagnostisk værdi, men bør udnyttes ved systematisk undersøgelse for at skaffe et erfaringsmateriale med henblik på evt. fremtidig udnyttelse.

8. Referencer

- Beijerinck, M.W.: Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus. Centralbl. Bakt. 2. Abt. 7: 33, 1901.
 Brodmeier, A.: Ueber die Beziehung des *Proteus vulgaris* Hsr. zur ammoniakalischen Harnstoffzersetzung. Centralbl. Bakt. I Abt. 18: 380, 1895.
 Cohn, F.: Untersuchungen über Bacterien. In: Cohn, F. (ed.): Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. I, Heft 2, p. 158, J.U. Kern's Verlag, Breslau 1872.
 Cook, A.R.: The elimination of urease activity in *Streptococcus faecium* as evidence for plasmid-coded urease. J. gen. Microbiol. 92: 49, 1976.
 Christensen, W.B.: Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and Paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bact. 52: 461, 1946.
 DeTurk, W.E.: The adaptive formation of urease by washed suspensions of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 70: 187, 1955.
 Ederer, G.M., Chu, J.H. & Blazeviz, D.J.: Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production. Appl. Microbiol. 21: 545, 1971.
 Ferguson, W.W. & Hook, A.E.: Urease activity of *Proteus* and *Salmonella* organisms. J. Lab. clin. Med. 28: 1715, 1943.

- Ishikawa, M.: Influence of carbohydrates on bacterial decomposition of urea. *J. infect. Dis.* 43: 67, 1928.
- Jaksch, R.v.: Studien über den Harnstoffpilz. *Z. physiol. Chemie* 5: 395, 1881.
- Jeffries, C.D.: Intracellular microbial urease. *Nature (Lond.)* 202: 930, 1964.
- Leube, W. & Graser, E.: Ueber die harnstoffzersetzenden Pilze im Urin. *Virchows Arch. path. Anat.* 100: 555, 1885.
- Miquel, P.: Etude sur la fermentation ammoniacale et les fermentes de l'urée. Georges Carré et C. Naud, Paris, 1898.
- Moltke, O.: Contribution to the characterization and systematic classification of *Bac. proteus vulgaris* (Hauser). *Disputats*, København 1927.
- Murphy, D.B. & Hawkins, J.E.: Use of urease test disks in the identification of mycobacteria. *J. clin. Microbiol.* 1: 465, 1975.
- Reanney, D.: Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bact. Rev.* 40: 552, 1976.
- Richard, C.: Intérêt des cultures sur les milieux contenant des sucres fermentescibles pour la mise en évidence de l'uréase de *Klebsiella*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 126 B: 201, 1975.
- Roberts, D.H., Little, T.W.A. & Forbes, D.: An unusual outbreak of bovine mastitis caused by a streptococcus. *Brit. vet. J.* 125: 128, 1969.
- Rovsing, T.: Om Blærebændernes Åetiologi, Pathogenese og Behandling. *Disputats, P. Hauberg & Comp.*, København 1889.
- Rovsing, T.: Kliniske og experimentelle Studier over Urinorganernes infektiøse Sygdomme. Det Schubotheske Forlag, København 1897, p. 232.
- Rustigian, R. & Stuart, C.A.: Decomposition of urea by *Proteus*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* 47: 108, 1941.
- Seneca, H., Lattimer, J.K. & Peer, P.: Bacterial urease in pathogenic bacteria. Comparison of urea-splitting and non-urea-splitting bacteria. *Arch. Path.* 74: 489, 1962.
- Stuart, C.A. Stratum, E. van & Rustigian, R.: Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms. *J. Bact.* 49: 437, 1945.
- Summer, J.B.: Urease. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology*, 3. ed., vol. 2, p. 379. Acad. Press, New York 1963.
- Tieghem, M. van: Sur la fermentation ammoniacale. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 58: 210, 1864.
- White, E.C. & Hill, J.H.: Bacterial urease. I. A critique of methods heretofore used for demonstrating bacterial urease and presentation of a valid and more sensitive test. II. A study of the ureolytic action of bacteria of significance in genito-urinary infection. *J. Urol. (Baltimore)* 45: 744, 1941.
- Vuyé, A. & Pijck, J.: Urease activity of Enterobacteriaceae: which medium to choose? *Appl. Microbiol.* 26: 850, 1973.