

Toleransprøver

Kapitel 10

Galdeopløselighedsprøver

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

1. Historisk indledning

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Biokemisk baggrund

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

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

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

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

Galdeopløselighedsprøven foregår bedst og er lettest aflæselig ved pH 6,8-7,6, hvorfor pneumokokkerne teoretisk set ikke bør dyrkes i tilstedeværelse af forgærbart kulhydrat. Dette sidste betyder dog næppe ret meget i praksis ifølge Kelly & Gussin (1924), da pH ikke kommer under 5-5,5 ved vækst af pneumokokker i et glukoseglas, og ved dette pH kan galdetesten godt gennemføres. Reaktionen foregår bedst ved 37°C og med unge, levende kulturer, da døde celler ikke lyserer. Reaktionen kan dog foregå ved lavere temperaturer. Klorid med monovalente katjoner, fx. NaCl, hæmmer reaktionen i små koncentrationer (0,004-1%), men fremmer reaktionen i højere koncentrationer (2-4%); klorid med divalente katjoner, fx. CaCl₂, virker lige omvendt (Falk & Yang 1926a, b).

3. Valg af metode

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

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

A. Reagensglasmetoden (Lund 1959, 1960)

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

Reagens: 10% Na-taurocholat i filteret oksebouillon.

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

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

B. Plademetoden (Hawn & Beebe 1965)

Substrat: 10% eller 5% blodagarplade

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

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

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

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

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion

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

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

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

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

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

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

8. Referencer

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

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

Kapitel 11

Optokinprøven

Optokinprøven undersøger bakteriers følsomhed over for kininderivatet optokin.

1. Historisk indledning

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

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

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

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

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

I 1971 viste Ragsdale & Sanford, at inkubering i en 5% CO₂-atmosfære i stedet for atmosfærisk luft giver hæmningszonediametre, der for både pneumokokkers og andre streptokokkers vedkommende er 5 mm mindre.

2. Biokemisk baggrund

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

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

3. Valg af metode

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

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Substrat: 5% eller 10% blodagarplade.

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

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

Udførelse: Blodpladen tilsås med tætte strøg, optokinoplate'en påsættes og pladen inkuberes i atmosfærisk luft ved 35°C i 1 døgn. Dyrkes pneumokokkerne i CO₂-atmosfære, vil hæmningszonen omkring optokinoplate'en blive mindre, ifølge litteraturen ca. 5 mm (Ragsdale & Sanford 1971). Man bør derfor normalt ikke inkubere pneumokokker i CO₂-atmosfære, når der prøves for optokinfølsomhed. Kan pneumokokkerne ikke vokse uden CO₂, bør man inkludere kontrolplader med en pneumokok og en streptokok.

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

5. Sikkerhedsforanstaltninger

De sædvanlige ved omgang med potentiel patogene bakterier.

6. Fortegnelse over de vigtigste optokinfølsomme bakterier

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

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

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

8. Referencer

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

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

Kapitel 12

Tellurresistensprøven

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

1. Historisk indledning

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Biokemisk baggrund

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

3. Valg af metode

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

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

McLeod's medium

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

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

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

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige.

6. Fortegnelse over de vigtigste tellurresistente bakterier

Streptobacillus moniliformis

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

Erysipelothrix rhusiopathiae

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

Mycobacterium: Nogle species.

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

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

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

Her ud over har tellurprøven i dag ikke større betydning.

8. Referencer

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

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

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

Kapitel 13

KCN-prøver

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

1. Historisk indledning

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

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

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

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

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

Braun's prøve havde den væsentlige ulempe, at der skulle fremstilles frisk substrat umiddelbart før hver undersøgelse, og det var en af grundene til, at Møller (1954) tog prøven op til kritisk revision. Møller fandt ud af, at hvis man brugte tætluttende propper (fx. paraffinerede korkpropper) i stedet for vatpropper, brugte et flydende i stedet for et fast medium og samtidig nedsatte KCN-koncentrationen til 0,075 g pr. liter, svarende til en fortynding på 1:13300, så opnåede man samme differentiering som med Braun's medium og desuden at substratet var holdbart i 14 dage i køleskab ved 4°C. Møller fastlagde også regler for inkubering og aflæsning af glassene og bemærkede betydningen af at udvælge en egnet pepton. I et næsten samtidigt arbejde af Kauffmann & Møller (1955) blev prøvens egnethed til differentiering mellem *Citrobacter* og *Salmonella* bekræftet.

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

2. Biokemisk baggrund

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

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

3. Valg af metode

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

4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

Substrat

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

Na ₂ HPO ₄ ,2H ₂ O	5,64 g
Dest H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,4	

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

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

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

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

5. Sikkerhedsforanstaltninger

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

i en lille autoklave, kan man før autoklaveringen destruere KCN ved til hvert glas at sætte et krystal af FeSO_4 og ca. 0,1 ml 40% KOH. Det er dog simpletere i et sådant tilfælde at lade glassene gå til autoklavering i portioner på ca. 100 glas om dagen; så vil man altid være på den sikre side.

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

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

Pseudomonas: *P. aeruginosa*: alle; *P. pseudomallei*: alle; *P. mallei*: en del;
P. maltophilia: alle og *P. fluorescens*: en del.
Alcaligenes faecalis: de fleste.
Bordetella bronchiseptica: alle
Citrobacter freundii: næsten alle
Salmonella (inklusive *Arizona*): kun meget få stammer
Klebsiella pneumoniae: næsten alle
Enterobacter: *E. cloacae* og *E. aerogenes*: næsten alle
Hafnia: alle
Serratia: *S. marcescens* og *S. liquefaciens*: næsten alle; *S. rubidaea*: nogle stammer.
Proteus (inklusive *Providencia*): alle
Vibrio cholerae: de fleste
Aeromonas: de fleste
Pasteurella: enkelte stammer
Haemophilus vaginalis: alle
Gemella: alle

7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

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

8. Referencer

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

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