

# **ANAEROBE BAKTERIER**

**Specielt med henblik på dyrkning og identifikation i det  
klinisk mikrobiologiske laboratorium**

**Tage Justesen**

## **FORORD – og vigtigste litteraturhenvisninger.**

Dette kompendium i anaerob bakteriologi er en kort beskrivelse af hvad anaerobt bakterielt liv er, og hvilken rolle anaerobe bakterier spiller, som normalflora og i forbindelse med sygdom hos mennesker.

De beskrevne metoder til påvisning og identifikation af anaerobe bakterier i det klinisk mikrobiologiske laboratorium er baseret på metoder beskrevet i litteraturen, og alle de væsentlige og grundlæggende principper stammer herfra (1, 2). Der skal især lægges vægt på at anvendelse af disks til identifikation er helt afhængig af at de angivne retningslinjer følges (typer og koncentrationer).

Efter at have arbejdet i en del år med de "klassiske" metoder i dyrknings og identifikationssammenhæng kombineret med gaskromatografi, forsøgte nærværende forfatter at anvende "de forhåndenværende søms princip" til anaerob identifikation dvs. de substrater, som rutinemæssigt fremstilles på Statens Seruminstitut til aerob identifikation. Begrundelsen herfor var, at det var relativt arbejdskrævende og dermed kostbart at fremstille medier og substrater under idelle anaerobe forhold (3).

De stammer som blev identificeret på den klassiske "korrekte" måde blev derfor også søgt identificeret med SSI's rutinesubstrater. Det drejer sig hovedsagelig om sukkerarterne, men også gelatinesmeltning og halvflydende nitrat indgik. Co-kulturprincippet til forgæring af anaerobe bakterier under aerobe forhold viste sig ved afprøvning at fungere så godt, at besværet med at inkubere under anaerobe forhold blev undgået ved identifikation af de almindeligst forekommende anaerobe bakterier (4).

SSI's direkte enzymtests som ONPG, Urease og Tryptofanasetesten blev også afprøvet, og senere har det vist sig at mange andre direkte enzymtests kan udføres under aerobe forhold bl.a. "Roscotabletter" (5)

Den foreliggende manuals identifikationssystemer bygger også på disse erfaringer.

I de senere år er identifikation af mikroorganismer og liv i det hele taget blevet baseret på DNA-sekventering. Antallet af nye slægter og arter er steget eksplosivt og området er nu næsten uoverskueligt.

Ved hjælp af simple fænotypiske karakteristika er det dog stadig muligt på kort tid at karakterisere anaerobe bakterier som har klinisk relevans – men fremtiden lurer lige om hjørnet.

- 1) Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (ed.) Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> ed. Spec. kapitel 55, 56, 57 og 58
- 2) Josimies-Sommer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. 2002. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 6<sup>th</sup> ed. Star Publishing Co., Belmont, Calif.
- 3) Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC (ed.) 1977. Anaerobe laboratory manual. 4<sup>th</sup> ed. Anaerobe Laboratory, Virginia polytechnic institute and State university, Blacksburg.
- 4) Hussain Z, Lannigan R, Burger H, Groves D. 1984. Development and evaluation of a coculture technique for identification of anaerobic organisms. J. Clin. Microbiol. 19:215 – 217.
- 5) ROSCO. Diatabs diagnostic tablets, 2007, 7<sup>th</sup> ed. (findes på internet)

## Anaerobe bakterier - definitioner

Anaerobt liv er efter alt at dømme den tidligste form for liv på jorden. Anaerobt liv er opstået for knapt 4 milliarder år siden, da iltmolekyler ikke fandtes i fri tilstand. Fri ilt i atmosfæren er kommet til langt senere, med opståen af celler med evnen til at danne ilt fra kuldioxid ved hjælp af klorofyl. Organismer, der kan bruge ilt til forbrænding, er opstået endnu senere, men har fået en fordel, da energiproduktion med iltforbrænding af et glucosemolekyle med ilt er 15-20 gange så stor, som ved anaerob forbrænding.

Ved anaerob forbrænding (fermentering) nedbrydes organisk materiale (sukkerarter, proteiner osv.) med frigivelse af energi (ATP). Nedbrydningen er ufuldstændig og der efterlades affaldsstoffer oftest i form af forbindelser af flygtige fede syrer (edikesyre, propionsyre, smørsyre m.fl.) og forskellige alkoholer. (Ved en aerob iltforbrænding ville disse stoffer kunne omsættes videre med den nævnte ekstra energigevinst)

Anaerobe bakterier kan ikke bruge ilt til forbrænding, nogle kan tolerere tilstedeværelse af ilt, men ofte er ilt så giftigt at organismene dør. Ilt er meget reaktivt og giftigt hvis dets omsætning ikke reguleres. Kontakt med ilt giver via reaktion med bl.a. flavoprotein anledning til dannelse af superoxidradikaler ( $O_2^{\cdot-}$ ) og hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ). De to nævnte kan reagere og danne hydroxylradikaler ( $OH^{\cdot}$ ) samt andre toksiske forbindelser. I humane celler og mange aerob voksende bakterier findes der både superoxid-dismutase og katalase som omdanner hhv.  $O_2^{\cdot-}$  og  $H_2O_2$  til mindre toksiske forbindelser som  $O_2$  og  $H_2O$  så cellerne beskyttes (interessen for såkaldte antioxidanter stammer fra denne viden). De nævnte enzymer mangler i vid udstrækning hos anaerobe bakterier, som så dræbes af de toksiske iltforbindelser.

### Der er forskellige opfattelser af hvordan anaerobe bakterier bør defineres:

#### 1. Efter stofskifte

Bakterier som kun har et anaerobt stofskifte dvs. ikke kan udnytte ilt til forbrænding. Denne definition er meget bred, da den også omfatter fx alle Streptokokslægtens arter hvoraf mange er ilttolerante og ikke sædvanligvis betragtes som anaerobe.

#### 2. Efter slægtstilhørsforhold

Nogle bakterieslægter opfattes traditionelt som anaerobe, fordi de første eksemplarer som isoleredes under anaerobe forhold har været grundlaget for valg af et slægtsnavn (genus) og man har betragtet den anaerobe vækstmåde, som noget særligt karakteristisk.

I de senere år er der sket en betydelig ændring, hvor bakterieslægter nu i højere grad er defineret ud fra DNA lighed, hvor samme slægt kan omfatte både anaerobt og aerobt voksende arter.

*Propionibacterium avidum* og især mange af de nyere beskrevne *Actinomyces* spp. vokser oftest udmærket aerobt, ligesom *Clostridium tertium* og *C. histolyticum*.

Nogle bakterieslægter der traditionelt ikke opfattes som anaerobe rummer arter, som kun med sikkerhed findes ved anaerob dyrkning er fx *Staphylococcus asaccharolyticus*, samt en række *Streptococcus* sp. (*S. hansenii*, *S. pleomorphus*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*). Undertiden vokser defekte fakultative bakterier kun anaerobt.

Visse "ægte" mikroaerofile bakterier er iltkrævende ("*B. ureolyticus*", *Campylobacter*- og *Helicobacter* spp.) men kan ikke vokse i atmosfæriske iltkoncentrationer, og vokser dårligt eller slet ikke strikt anaerobt. "*Bacteroides ureolyticus*" som tidligere ofte fandtes (pga. inkomplet iltfjernelse) er nu blevet meget sjælden i prøver (pga. den effektive iltfjernelse i moderne systemer).

#### 3. Praktiske forhold

**Fra et praktisk synspunkt er anaerobe bakterier, de bakterier, som ikke kan forventes at vokse ved primær udsåning (relativt lille inoculum) f.eks. fra prøvemateriale, hvis der er ilt tilstede.**

Foruden de egentlige anaerobe bakterier gælder det mange af de nævnte arter under punkt 2. En del af disse arter kan blive mere ilttolerante ved omsåning, delvis fordi der efter omsåninger nu kan anvendes et stort koncentreret inoculum, hvor bakterierne gensidigt "beskytter hinanden".

Ilttolerante arter er i øvrigt overvejende metronidazolresistente, medens bakterier som ikke bliver ilttolerante efter omsåning langt overvejende er metronidazolfølsomme ("ægte anaerobe bakterier")

Metronidazol er i sig selv uvirksomt. Det omdannes (reduceres) kun til en aktiv baktericid forbindelse under ekstremt anaerobe forhold. Disse forhold findes kun inden i anaerobe bakterier, hvor enzym- og co-enzymssystemer som reducerer metronidazol findes.

# Generelt om mikroorganismers forhold til ilt

## 1) Vækstbetingelser til rådighed i laboratoriet (det fysiske miljø):

**Anaerobt:** iltfrit

**Aerobt:** ilt i atmosfærisk koncentration (uden CO<sub>2</sub>)

**Mikroaerobt ell. mikroaerofilt:** ilt i subatmosfærisk koncentration (~ 5% O<sub>2</sub> med CO<sub>2</sub>)

**CO<sub>2</sub>-atmosfære:** Ca. 5 -10% CO<sub>2</sub> i atmosfærisk luft.

## 2) Mikroorganismernes stofskifte (det genotypiske):

**Anaerobt stofskifte:** Mikroorganismen kan ikke udnytte ilt til vækst og formering, men får energi ved fermentering. Væksten er maximal under iltfri forhold.

**Fakultativt anaerobt stofskifte:** Mikroorganismen kræver ikke ilt til vækst og formering, men kan udnytte ilt selv i atmosfæriske koncentrationer - har både fermentativt og oxidativt potentiale.

**Aerobt stofskifte:** Mikroorganismen kræver ilt til vækst og formering - oxidativt stofskifte.

**Mikroaerofilt stofskifte:** Mikroorganismen kræver ilt til vækst og formering, men tåler ikke ilt i atmosfæriske koncentrationer (optimum 2 - 10% ilt).

Fakultativt mikroaerofile organismer kan også vokse under anaerobe forhold.

## 3) Mikroorganismens præsentation (det fænotypiske):

**Obligat anaerobe:** Organismer som kun gror under anaerobe forhold (< 4 % ilt), ikke mikroaerofilt, i CO<sub>2</sub>-atmosfære eller aerobt.

*Kan underinddeles i:*

Strikt obligat anaerobe: Organismer som kun gror i < 0,5% ilt.

Moderat obligat anaerobe: Organismer som kan gro i op til ca. 2 - 4 % ilt.

**Aerotolerant eller iltolerant anaerobe:** Organisme som har anaerobt stofskifte, men som kan vokse i atmosfæriske iltkoncentrationer evt. + CO<sub>2</sub>.

**Mikroaerotolerant:** Organisme som vokser bedst anaerobt, men kan tolerere en vis mængde ilt (ca. 5 - 15% O<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>).

**Fakultative:** Organisme som ikke kræver ilt, men kan udnytte ilt (vokser lige godt med eller uden ilt).

**Obligat aerobe:** Organisme som kræver > 10-15% ilt for maksimal vækst.

**Capnofile:** Organismer som kræver eller stimuleres i væksten af kuldioxid.

**Hydrogenofile:** Organismer som kræver eller stimuleres af hydrogen (visse *Campylobacter* sp.).

# Naturlig forekomst af anaerobe bakterier af betydning for humane infektioner

(Se i øvrigt noter om de enkelte bakteriearters forekomst under identifikationskemaerne)

| Lokalitet   | Forekomst   | Anaerob bakterie   |
|---|---|--|
| Huden   | Normalt forekommende .....▶<br>Ved apokrine kirtler i armhule og omkring genitalia .....▶ | <i>Propionibacterium acnes</i><br><br><i>Propionibacterium granulosum</i>  |
| Mundhulen   | Normalt forekommende.....▶<br><br>Sjældnere.....▶<br><br>Unormal forekomst.....▶          | <i>Streptococcus</i> sp.<br><i>Prevotella</i><br><i>Porphyromonas</i><br><i>Fusobacterium</i> :<br><i>F. nucleatum</i><br><i>F. necrophorum</i><br><i>Veillonella</i><br><i>Campylobacter</i><br><i>Actinomyces</i><br><br><i>Lactobacillus</i> -<br><i>Peptostreptococcus</i> -<br><i>Leptotrichia</i> -<br><i>Eubacterium</i> spp.<br><br><i>Bacteroides fragilis</i><br><i>Clostridium</i> spp. |
| Gastrointestinalkanalen                             | Dominerende.....▶<br>Andre forekommende.....▶   | <i>Bacteroides fragilis</i> gruppen<br><br>Øvrige <i>Fusobacterium</i> spp.<br><i>Bifidobacterium</i><br><i>Lactobacillus</i><br>Anaerobe gram positive kokker<br><i>Clostridium</i><br><i>Eubacterium</i>   |
| Genitalia og urinvejene (vagina, cervix og urethra) | Fertile kvinder.....▶   | <i>Lactobacillus</i><br><i>Bifidobacterium</i><br><i>Prevotella</i><br>Anaerobe gram positive kokker   |
| Omgivelserne  | Ved forurening med dyregødning..▶   | <i>Clostridium</i> spp:<br><i>C. tetani</i> ,<br><i>C. novyii</i><br><i>C. botulinum</i>   |

## Huden

Anaerobe bakterier er en del af den normale humane bakterieflora på hud og slimhinder. Hudens anaerobe flora består dog hovedsagelig af *Propionibacterium acnes*, som findes på hele den normale hudoverflade knyttet til hårsækkene. *Propionibacterium granulosum* forekommer i forbindelse med apokrine kirtler i armhulen og omkring genitalia.

## Mundhulen

Florasammensætningen afhænger især af hygiejne og tandstatus. Ved god hygiejne er der få ofte relativt ilttolerante arter og ved dårlig hygiejne og tandstatus er der tiltagende mængder af strikt anaerobe arter ofte med tilsvarende øget dannelse af ildelugtede flygtige fede syrer (smørsyre, isosmørsyre mm.)

Anaerobt voksende *Streptococcus* sp. af anginosusgruppen, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*

(*F. nucleatum* og *F. necrophorum*), *Veillonella*, *Campylobacter*.

### **Alle de actinomycose-forårsagende Actinomyceter findes her.**

Sjældnere er *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Leptotrichia* og *Eubacterium* spp.

*Bacteroides fragilis* gruppen og *Clostridium* spp. forekommer ikke normalt i mundhulen.

## Gastrointestinalkanalen

I ventriklen og den øverste del af tyndtarmen (duodenum og jejunum) findes bakterier som er ført med fra mundhulen og øvre luftveje (transient flora). Først i den nederste del af tyndtarmen (ileum) og i tyktarmen (colon) findes en egentlig permanent flora med et totalantal tiltagende fra  $10^{11}$  -  $10^{12}$  bakterier/g, hvilket betyder, at mindst halvdelen af normal fæces består af levende bakterier. I alt findes der omkring 500 forskellige bakteriearter. Den dominerende bakterieslægt er *Bacteroides*.

Desuden forekommer *Fusobacterium* (andre end de mundhulederivede), *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, Anaerobe gram positive kokker, *Clostridium* samt *Eubacterium* spp. Anaerobe bakterier dominerer over andre bakterier fx *E. coli* med en faktor 1000 - 10000.

I tarmen findes galde, derfor er mange af bakterierne herfra galderesistente.

## Genitalia og urinveje (vagina, cervix og urethra)

Normal vaginalflora hos kvinder i den fertile alder (østrogenproduktion) er ofte domineret af *Lactobacillus* spp. Desuden findes en varierende forekomst af *Bifidobacterium*, Anaerobe gram positive kokker og *Prevotella* spp. (*P. bivia*, *P. disiens*) undertiden *Fusobacterium* og andre gram negative stave samt *Mycoplasma* spp.

Hos kvinder udenfor den østrogenproducerende periode (præpubertet og efter klimakteriet) er floraen meget varierende evt. også præget af colibakterier og blandet anaerob flora.

*Clostridium* spp. eller medlemmer af *Bacteroides fragilis* gruppen er ikke normal vaginalflora.

## Omgivelserne

Dyr har tilsvarende deres egen anaerobe flora. Hunde- og kattebid kan give infektion med anaerobe bakterier fra disse dyrs mundhuler, og disse arter er ikke identiske med de humane, men kan tilhøre de samme slægter.

I omgivelserne hvor forurening med dyregødning evt. forekommer findes f.eks. *Clostridium* spp. (*C. tetani*, *C. novyii* og *C. botulinum*).

# Infektioner med anaerobe bakterier

De fleste anaerobe arter som isoleres fra humane infektioner, stammer oprindeligt fra et af normalfloraområderne.

Anaerobe bakterier findes med stigende hyppighed i bloddyrkninger bl.a. fordi kvaliteten af denne undersøgelse er væsentlig forbedret de senere år, men også fordi patientklientellet ændres.

Lokaliserede infektioner med anaerobe bakterier findes oftest i blandingsinfektioner sammen med fakultativt voksende bakterier, som forbruger ilten og dermed "beskytter" de anaerobe bakterier.

Undertiden findes blandingsinfektioner med rent anaerobt indhold i abscesser, og renkultur kan også ses især med *B. fragilis*.

## Nogle anaerobe bakterier giver anledning til særlige sygdomsbilleder:

*F. necrophorum* kan forårsage nekrobacillose eller postanginøs sepsis med abscesdannelse i forskellige organer og kan i forbindelse hermed findes i bloddyrkninger ("Lemierres syndrom"). Rammer oftest yngre mennesker som efter en halsbetændelse får sepsissymptomer.

Blandt Clostridierne giver nogle af de toxinogene arter, hyppigst *C. perfringens*, anledning til nekrotiserende infektioner (gasgangræn o.l.) og toxindannende *C. difficile* stammer kan undertiden medføre pseudomembranøs enterocolitis.

Disse og andre clostridier isoleres dog oftest fra andre prøvetyper i blandingsinfektioner, hvor de ikke kan tillægges nogen specifik betydning. Fund af clostridier i bloddyrkninger kan give mistanke om et fokus i tarmen.

*C. tetani* og *C. botulinum* er årsager til karakteristiske kliniske sygdomsbilleder, som skyldes deres toxinproduktion, men er omgivelsesbakterier og isoleres næsten aldrig fra klinisk prøvemateriale.

Visse *Actinomyces* spp. især *A. israelii*, *A. gerensceriae*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, og måske *A. odontolyticus* kan forårsage sygdommen actinomybose udgående fra tænderne (tandrosbetændelser - cervicofascial actinomybose) men også som lungeactinomybose (sjælden), tarmactinomybose (meget sjælden) og parametrieactinomybose = omkring livmoderen (spiraler som har ligget i flere år). *Propionibacterium propionicum* (tidl.

*Arachnia*) kan også forårsage actinomybose og kendes især fra dacryocystitis (fråførende tåreveje). Actinomycosetilfældene her i landet er aftagende og a. tidlig behandling af til grundliggende lidelser.

**Actinomycesarterne kommer alle fra normalfloraen, og giver kun infektion i beskadiget væv og i forbindelse med fremmedlegemer, men kan herfra brede sig videre gennem sundt væv.**

## Resistensbestemmelse og antibiotikabehandling ved anaerobe infektioner

De fleste "ægte" anaerobe bakterier er metronidazolfølsomme og der udvikles kun sjældent resistens. Undertiden findes resistente *B. fragilis* stammer d.v.s. med MIC > 8 mg/l. Hurtigt voksende relativt ilttolerante anaerobe bakterier (*B. fragilis* gruppen, *C. perfringens* m.fl.) kan tilsyneladende være nedsat følsomme for metronidazol ved alm. disktest. Ved tvivl brug E-test.

Bortset fra *Bacteroides* er mange anaerobe gram negative stave også følsomme for penicillin. Dette gælder også *Clostridium* spp. og de anaerobe kokker.

En del anaerobe ikke-sporerdannende Gram positive stave specielt de aerotolerante er ikke følsomme for metronidazol men ofte for penicillin. Clindamycin har været rutinemæssigt anvendt i mange år spec. i USA og har oprindeligt været aktivt overfor alle grupper af anaerobe bakterier, men efterhånden er omfattende resistensudvikling iagttaget i kølvandet på forbruget. Det samme gælder erytromycin.

### Prøvemateriale og dyrkning

#### Prøvetagning og transport af klinisk materiale

Generelt må der altid opfordres til at tage rigeligt materiale fra til bakteriologisk undersøgelse. Jo mere materiale desto bedre beskyttelse af alle slags bakterier.

De fleste klinisk betydningsfulde anaerobe bakterier (og andre bakterier for den sags skyld) vil overleve i mange timer i  $\geq 1$  ml pus i et almindeligt tilproppet sterilt prøverør, som opbevares og transporteres ved omgivelsestemperatur.

Anvendelse af podedepinde er en nødløsning, idet primær mikroskopi ikke kan anvendes. Podedepinde skal under alle omstændigheder transporteres i Stuarts transportmedium.

#### Prøvekvalitet

Generelt skal bakteriefund vurderes i sammenhæng med den kliniske tilstand og findestedet.

Fund af anaerobe bakterier i præsterile områder som blod, spinalvæske, ledvæske, pleuraexsudat og renkulturer fra infektiøse processer eller dominerende i blandingsflora må betragtes som væsentlige. Podninger fra slimhinder i mundhule, øvre luftveje, vagina, cervix, urethra, anus og hudoverflade bør ikke dyrkes anaerobt. Prøvemateriale fra disse områder bør kun undersøges for anaerobe bakterier hvis der er sikre lokaliserede infektionstegn.

Urinprøver undersøges ikke rutinemæssigt anaerobt, men visse anaerobe/mikroaerofile kan give urinvejsinfektion og kan evt. ses ved mikroskopi af urin uden aerob vækst, hvorfor anaerob/mikroaerofil dyrkning kan være relevant i udvalgte tilfælde.

### SPECIELT

#### Bloddyrkinger.

En bloddyrkning bør bestå af 2 anaerobe og 2 aerobe kolber a 10 ml så der opnås en samlet mængde blod på 40 ml/bloddyrkning for at opnå det optimale udbytte mht. påvisning af bakterier i blodbanen med høj sikkerhed for at mistolke forureninger ( ).

Bloddyrkningsisolater bør "følges til dørs" med identifikation og har jo den fordel at de stort set repræsenterer renkulturer.

#### Actinomycose

Alle undersøgelser i forbindelse med mistanke om actinomycose skal foretages fra **relevant** materiale, dvs. infektionsprocesser. *Actinomyces* arter som findes i forbindelse med infektioner stammer oprindeligt alle fra normalfloraen på slimhinder !

**Podninger fra overflader feks. Cervix er derfor meningsløse.**

**Ægte actinomycose er oftest karakteriseret ved at være faste knuder og derfor sendes prøver herfra oftest til patologisk afdeling hvor de mikroskoperes efter at være steriliseret med formalin. Gramfarvning af dette materiale vil dog kunne give diagnosen.**

Et eksempel hvor mikrobiologien kan være til hjælp: Ved infektion i de fraførende tåreveje (dacryocystitis) skal øjenlægen lave et udstrykningspræparat fra infektionen til gramfarvning.

Actinomyces (eller *P. Propionicum*) er så karakteristiske at diagnosen er sikker i den forstand at behandlingen er fastlagt: Kirurgi + penicillin.

**Hvis dyrkning overhovedet lykkes - og det gør den ikke altid - varer det ofte 5 – 10 dage før der er vækst.**

***Cl. difficile*** dyrkning af fra fæces er en specialdyrkning og omtales ikke her, men husk at bakterien sagtens kan være et tilfældigt fund i enhver prøve.

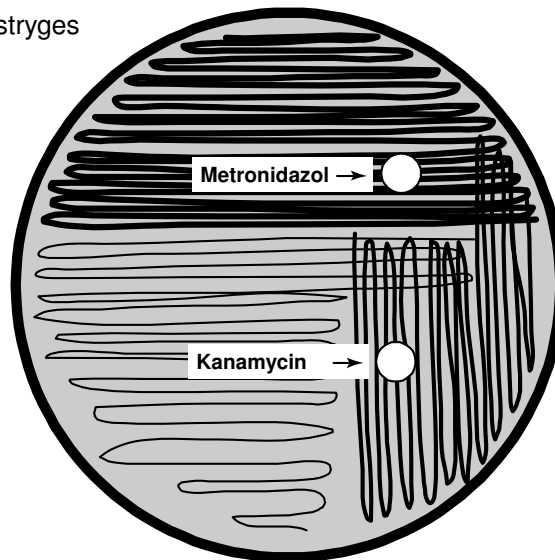
OBS ! Med de sædvanlige rutinedyrkinger, hvor der bortset fra bloddyrkinger kun primærdyrkes i maksimalt 2 døgn (40 - 48 timer) vil langsomt voksende anaerobe bakterier ikke blive påvist. Dette er måske ikke afgørende, da de bedst kendte patogener (*Bacteroides*, *Clostridier* og *Fusobacterier*) vil blive påvist. Overbvisningen om at mange anaerobe bakterier er følsomme for metronidazol, som næsten altid indgår i kombinationsbehandlingen af alvorlige infektioner, forhindrer måske ændringen af rutinerne.

## Udsåning af prøvemateriale

(For detaljer om medier og substrater se "Undersøgelles- og identifikationsmetoder")

Denne fremgangsmåde giver mulighed for hurtigt at se om der er "ægte" anaerobe bakterier tilstede i en blanding (hæmningszone omkring metronidazoldisken) samtidig med, at der kommer god separation af kolonier. Omkring kanamycindisken vil mange fakultative bakterier (enterobakterier, stafylokokker) hæmmes medens hyppigt forekommende anaerobe bakterier fx *Bacteroides* er kanamycinresistente og derfor vil blive selekteret i zonen (se "Disktyper og deres anvendelse").

- 1) Materialet (en dråbe pus eller podedepind) udstryges i zig-zak på ca. 1/3 af pladen
- 2) Med en øsken spredes videre vinkelret på første strøg til pladens midtlinje.
- 3) Øskenen vendes, og resten af pladen tilsås nu vinkelret på 2.strøg så hele pladen udnyttes.
- 4) En metronidazoldisk på 5 µg og en kanamycindisk på 1000 µg (1 mg) anbringes som vist på figuren.



**Fig. 1.** Anaerobplade med primære selektions og identifikations-disks

## Inkubation

(For detaljer se "Dyrkningsbetingelser")

Inkuber ved 35 -37° under anaerobe forhold, sædvanligvis i 2 døgn. Langsomtvoksende gram negative stave, anaerobe kokker og *Actinomyces* sp. findes ikke efter 2 døgn ! Mikroskopi er en vigtig vejledning før udsåning, og evt. beslutning om længere tids inkubation.

Primærplader bør reinkuberes sammen med rendyrkninger og omsåninger, så evt. karakteristika udvikles yderligere (koloniudseende, pigment, fluorescens).

Særlig "kostbare" prøver bør altid stå i op til mindst 5-10 døgn (specielt for *Actinomyces* og *Porphyromonas*) og bør også primært udsås til anaerob dyrkning på blodplade dog uden discs, men også på en plade til mikroaerofil inkubering.

## AFLÆSNING AF PRIMÆRPLADE efter 1 – 2 døgn og viderebehandling af isolater.

Ved brug af anaerobt kammer kan aflæsning evt. allerede foretages i kammeret efter 1 døgn, men ellers aflæses efter 2 døgn sammen med primærpladerne. Hvis der er hæmning omkring metronidazoldisken, betyder det at der er anaerobe bakterier i prøven. Vækst i kanamycinzonen tyder på *Bacteroides*. Ubehagelig lugt af smørsyre mm., fluorescens i grønt eller rødt er andre sikre tegn. Hvis det drejer sig om kulturer med anaerobe bakterier, hvor enkeltkolonier er klart definerede kan adskillige undersøgelser så som mikroskopi, fluorescens, katalasereaktion, spotindoltest straks udføres.

## Følgende undersøgelser fra isolerede kolonier forberedes:

1. MeKaGaVaCo-plade: Anaerobplade tilsået som til resistensbestemmelse med en Metronidazol, Kanamycin, Galde, Vancomycin, Colistin disk. Ga, Va, Co anbringes i den ene side af pladen med et par centimeters mellemrum. Kanamycin og metronidazol anbringes i modsatte side af pladen.
2. 5% blodplade (alm. spredning til rendyrkning).
3. Evt. stik i thiogluccolatglas og/eller halvflydende fra en renkultur kan inkuberes under aerobe forhold i 1 - 2 døgn og herefter anbringes ved stuetp. Glasset tjener dels til vurdering af vækst i forhold til ilt, og som opbevaring for stammen.
4. Evt. EYA-plade. Ved mistanke om clostridier og *Fusobacterium necrophorum* (tæt spredning med stort inoculum på ½ plade og to punktino-culationer på den anden halvdel) til anaerob inkubation.

## Foreløbig identifikation på grundlag af direkte metoder, primærplader og følsomhed for discs.

De hyppigst isolerede anaerobe bakterier i relevant prøvemateriale er *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium* spp. og visse *Peptostreptococcus* som også tilhører gruppen af moderat anaerobe bakterier, med fremvækst af synlige kolonier indenfor 2 døgn.

### 1. Mikroskopi af Grampræparat:

Hos nogle arter er det mikroskopiske billede næsten diagnostisk f.eks.

*F. nucleatum*, *C. perfringens*, *C. Clostridioforme-gruppen* (oftest gram negativ) og *Leptotrichia buccalis* (sjældent). Evt. spore tilstedeværelse og lokalisation noteres.

Medlemmer af *Bifidobacterium*- og *Lactobacillus*-slægterne er også relativt let genkendelige når væksten og mikroskopien sammenholdes.

*Propionibacterium acnes* er ofte forgrenet (actinomycesagtig) i flydende kultur f.eks. bloddyrkningskolben, men ligner ellers corynebakterier .

### 2. Fugtigt præparat (bevægelighed og sporer).

### 3. Katalase

### 4. Fluorescens i UV-lys spec. rubinrødt (*Prevotella* sp.) eller grøngult = chartreuse (*Fusobacterium* sp og nogle *Clostridium* sp.).

### 5. Smørsyrelugt (alle *Fusobacterium* sp og nogle *Clostridium* sp. og.)

### 6. "Indolspot test" (se under reagenser for ikke alle kan anvendes) eller Tryptofanase samt Urease og ONPG kan aflæses samme dag efter ca. 4 timer med kraftig opslemning af renkultur.

## Undersøgelser fra sekundærpladerne:

### 7. Metronidazolfølsomhed = S = Ægte anaerobe bakterier.

### 8. Kanamycinfølsomheden registreres (S = sensitiv og R = resistent)

*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* er som hovedregel resistente

### 9. Gram negative bakterier som er Vancomycin S og Colistin R, er affarvede gram positive stave og skal registreres som gram positive !!

### 10. Galderesistens er diagnostisk for *B. fragilis*-gruppen, men kan i øvrigt generelt tolkes som et udtryk for at bakterien har sit normale levested i tarmen medens galdefølsomhed tyder på et andet naturligt levested. Feks. Er *Bifidobacterium* er generelt galderesistente medens *Actinomyces* er galdefølsomme.

## 5% blodagar

*F. necrophorum* har  $\beta$ -hæmolyse (skyldes lipasen) allerede efter 1 døgn - en hurtig hjælp ved bekræftelse af denne diagnose, da lipasereaktionen på EYA-pladen kan tage nogle dage.

*Prevotella*- og *Porphyromonas* spp. vil også ofte fluorescerer rødt på blodplade.

Anaerobe/Aerotolerante ikke-sporedannende gram positive stave vokser ofte mindst lige så godt og med mere karakteristiske kolonier på blodpladen (som indeholder katalase, der virker beskyttende), og hvor evt. hæmolysetype også kan ses. 10% blodplader har traditionelt været anvendt til dyrkning af Actinomyceter o.a. ikke-sporedannende gram positive stave. Dokumentation af fordelene mangler, men måske kan et højt katalaseindhold samt en vis toxinneutraliserende effekt (apropos de gamle kighosteplader som indeholdt 50% blod !) berettige valget.

## EYA-pladen ("Egg Yolk Agar" eller æggeblommeagar)

Undersøges for **lecitinase** og **lipasedannelse**. Opklaring omkring kolonier er et udtryk for **proteolyse** (= evnen til gelatinesmeltning, som man derfor ikke behøver at undersøge). Pladen er desuden velegnet til rendyrkning af sværmende arter f.eks. *C. septicum*, idet sværmen hindres.

Vigtig i clostridiediagnostikken og ved påvisning af *F. necrophorum* (lipase)

## Koloni

**Størrelse.** *Bacteroides* og en del clostridier har kolonier  $\geq 1$  mm efter 2 døgn.

Mange af de øvrige arter har kun "pin-point" kolonier efter 2 eller flere døgn og overses derfor ofte i blandingskultur.

**Spredning** omkring kolonien ses ofte hos clostridier afhængig af pladens fugtighed.

**Sværmer** ses hos *C. septicum*, men også ved *C. sporogenes*, *C. butyricum* og den sjældne *C. novyi* A.

Sværmer kan hæmmes ved anvendelse af EYA-plade til renkultur.

(Visse stammer af *Bacteroides corrodens/ureolyticus* gruppen laver undertiden, men langt fra altid, små fordybninger i agaroverfladen såkaldt "korrosion" eller "pitting" (pit = grube). Disse arter kan også undertiden lave en lille fin sværmer lige omkring selve kolonien - et slør eller "haze". Disse bakterier findes nu sjældent, da de er mikroaerofile og ikke vokser under strikt anaerobe forhold !!)

**Farve** kan angives som hvid, hvidlig, grålig, gullig, grønlig, brunlig, sort, rødlig ect. eller kolonien kan være vandklar. Gulbrun til sort **pigmentering** (kan kræve flere dages inkubering) er et vigtigt karakteristikum hos medlemmer af *Porphyromonas*- og nogle medlemmer af *Prevotella*-slægten.

En del andre anaerobe bakterier vil efter mere end to dages inkubation på anaerobpladen efterhånden også kunne antage mørke brunlige toner, Actinomyceter og Bifidobakterier er et eksempel herpå.

*A. odontolyticus* kan kendes på den okseblodsfarvede koloni efter nogle dages forløb.

Nogle anaerobe bakterier giver anledning til dannelsen af en tydelig diffus rødfarvning af chokoladeagaren omkring kolonierne især efter at pladerne lige er fjernet fra de anaerobe dyrkningsbetingelser. Dette skyldes formentlig dannelsen af hæmokromogen ved en reduktionsproces forårsaget af bakterievæksten. Farven har ingen diagnostisk betydning.

## Fluorescens i UV-lys

Undersøges bedst i helt mørkelagt rum med en UV-lampe med en bølgelængde på 365-366 nm.

Lampen holdes tæt ned til agaroverfladen, så den rører ved kanten af petriskålen i den ene side

Fluorescensen kan variere noget med agarmediet og kulturens alder, men fremmes af chokoladepladetyperne. Undersøg evt. også en blodplade og en Iso-sensiarplade for fluorescens.

**Husk at skifte lyskilden da lampens lys svækkes med tiden.**

I UV-lys antager mange bakteriekulturer svagere grønlig og rødlig farver som ikke er fluorescens.

Ikke-pigmenterede *Prevotella* spp. fluorescerer ofte rubinrødt på anaerob/chokoladep. men sjældent på blodplade.

Pigmenterede *Prevotella* sp. og *Porphyromonas* sp. fluorescerer på alle de nævnte pladetyper men før pigmenteringen indtræder. Ved pigmentering ophører fluorescensen i takt hermed.

Svagere rød fluorescens kan ses hos *C. ramosum* og *Eggerthella. lenta*.

*Fusobacterium* spp. fluorescerer kraftigt gul-grønt, "chartreuse". Visse *Clostridium* spp. bl.a. *C. difficile* og *C. innocuum* har en mere bleggryn fluorescens, oftest kun på anaerobpladen.

*Bacteroides fragilis*-gruppen har normalt ikke fluorescens, men svagere koralrøde eller grønlig farver forekommer undertiden.

## Mikroskopi af Grampræparat

Først kom gramfarvningen, senere fandt man ud af hvorfor nogle bakterier er gram positive og andre er gram negative. Forskellen findes i bakteriernes cellevæg.

Resultatet af en gram farvning er, foruden af teknikken, også afhængig af dyrkningsbetingelserne og kulturens alder. Anaerobe bakterier herudover også udsat for iltens ødelæggende virkning.

Hovedproblemet er at nogle anaerobe gram positive bakterier ses gram negative ved farvning.

**Selv om gramfarvningen "svigter", er det af klassifikationsgrunde nødvendigt at få fastslået om en bakterie er gram positiv eller gram negativ !**

Følgende retningslinjer kan være til hjælp i tvivlstilfælde:

- 1) Tydeligt gram positivt resultat = GRAM POSITIV
- 2) Gramvariabel dvs. blanding af gram positivt og gram negativt farvede bakterier = GRAM POSITIV
- 3) Clostridier er ofte gramvariable eller helt gram negative. Ses sporer = GRAM POSITIV
- 4) Gram negativt farvede bakterier som er **Vancomycin S og Colistin R** = GRAM POSITIV  
(Undtagelser: *C. innocuum* er ofte vancomycinresistent, men heldigvis oftest tydeligt gram positiv og sporer ses ofte, så her gælder både regel 1, 2 og 3 overordnet.  
Visse *Lactobacillus* er også vancomycin R men er tydeligt gram positive.

Nogle clostridier med subterminale sporer danner mange frie sporer, der ses som blåligrøde ringe med farveløst indhold i grampræparatet.

### Form.

Længden hos alle bakterier kan variere en del med kulturbetingelserne og i den enkelte kultur medens tykkelsen ofte er mere konstant.

### Hos de gram positive stave kan man skelne mellem uregelmæssige og regelmæssige stave:

**Regelmæssige stave:** Ensartet tykkelse eller form af bakterielegemet f.eks. *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Mobiluncus* og er evt. lejret i par eller kæder, men ikke forgrenede.

Tykke stave (ca.  $\geq 1 \mu\text{m}$ ), slanke stave (ca.  $\frac{1}{2} \mu\text{m}$ ), meget små stave (både i længde og bredde)

**Uregelmæssige stave:** har varierende tykkelse af bakterielegemet. Kølleformer (coryneforme), forgreninger, filamentdannelse og Y-former forekommer. *Actinomyces*, *Bifidobacterium* og *Propionibacterium*, *Eubacterium nodatum*, og *E. limosum* hører til denne gruppe.

## Mikroskopi af fugtigt præparat

**Formen** kan undertiden ses tydeligere i et fugtigt præparat end i grampræparatet, hvor der ofte sker en vis påvirkning af bakterielegemet under fikseringen.

Sporer ses ofte tydeligt i fugtigt præparat som stærkt lysbrydende legemer (se nærmere detaljer under sporeprøven)

### Bevægelighed

Husk at bevægelige arter kan fremstå ubevægelige, medens ubevægelige arter skal være ubevægelige. Bevægelighed ophører ofte indenfor minutter efter udsættelse for ilt og afkøling til stuetemperatur. Bevægelighed bevares længst under midten af dækglasset, hvor iltningen er mindst! (Pasteur iagttog dette og opdagede dermed det han kaldte "La vie sans air").

**Lav flere præparater ved mistanke om bevægelighed fra forskellige frisk udtagne agar-medier evt. serumbouillon og forgæringsglas.**

### Katalase

Udføres efter de samme retningslinjer som for aerobt voksende bakterie (Objektglas, kapillærrør med 3-5% brintoverilte). Som hovedregel er anaerobe bakterier katalase negative, med visse vigtige undtagelser (Bacteroidesgruppen). Anaerobpladen (som i sig selv er katalase negativ i modsætning til blodpladen !!) fremmer dannelsen af katalaseenzymet (porfyrinrinholdigt) hos de katalase positive arter. (visse "*B. fragilis*", Propionibakterier, *A. viscosus*, *Bilophila*). Anvendelse af 15% brintoverilte giver ofte anledning til falsk positive reaktioner. Alle Clostridier er katalase-negative i modsætning til *Bacillus* spp.

### Proteolyse

Kan ses anaerobpladen (chokoladepladetypen) og ses som en zone af opklaring i agaren omkring kolonien set i modlys. Proteolyse kan også ses som en opklaring omkring kolonien på EYA.

Denne reaktion er normalt ensbetydende med at stammen også er gelatinesmelter !

OBS! Erythrocytter i chokoladeplader er langt fra altid totalthæmolyserede og derfor kan en eventuel "resthæmolyse" forveksles med proteolyse.

### Hæmolyse

Hæmolyse er i få tilfælde en væsentlig diagnostisk egenskab hos anaerobe bakterier.

Beta-Hæmolyse er vigtig ved identifikation af *Fusobacterium necrophorum* da den ses allerede efter et døgn. Hæmolysen skyldes aktivitet af lipaseenzymet, som først giver lipasedannelse på EYA-pladen efter nogle dages forløb. *C. perfringens*' karakteristiske dobbelthæmolyse ses tydeligst på fåreblodsagar, men kan også anes på hestblodsagar.

Visse *Bacteroides* spp. kan være  $\beta$ -hæmolytiske og nogle ikke-sporedannende grampositive stave kan have  $\alpha$ - eller  $\beta$ -hæmolyse og *Lactobacillus* sp. kan have  $\alpha$ -hæmolyse.

## Lugt

Mange anaerobe bakterier producerer salte af flygtige fede syrer, som affaldsprodukter fra forgæringen. Lugten af en kultur afspejler bl.a. produktionen af disse flygtige fede syrer (se "Gaskromatografi").

Lugt til en frisk udtaget pladekultur da de flygtige fede syrer efterhånden fordamper.

Mælkesyre og ravsyre lugter ikke da det er faste stoffer !

Smørsyre kan lugtes selv i meget små mængder. Lugt til f.eks. *C. perfringens* og *Fusobacterium spp.* der lugter kraftigt af smørsyre.

*B. fragilis* gruppens medlemmer lugter ikke af smørsyre, men af en blanding af propionsyre, isosmørsyre og isovalerianesyre, som tilsammen lugter ubehageligt surt-sødt. Propionsyre har en stikkende lugt. Behagelig aromatisk lugt som af syrnede mælkeprodukter eller karamel findes især hos *Bifidobacterium spp.*

Den såkaldte lugten af "hestestald" skyldes dannelse af paracresol, og bruges ofte til at karakterisere *C. difficile*, men dannes også af andre *Clostridium spp.* samt bl.a. medlemmer af "*B. corrodens*-gruppen" ("*B. ureolyticus*" m. fl.). *Desulfovibrio* lugter gennemtrængende ubehageligt af "tisseble".

## Gaskromatografi (GLC - gas-liquid-chromatography)

En metode til at påvise bakteriernes slutprodukter i form af flygtige fede syrer og alkoholer efter fermentering sammen med glucose og pepton.

Mælkesyre og ravsyre er krystalinske og må gøres flygtige ved methylering før påvisning.

| Anvendte forkortelser | Engelsk navn     | Dansk navn        | LUGT                            |
|-----------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|
| F, f                  | Formic acid      | Myresyre          | -                               |
| A, a                  | Acetic acid      | Eddikesyre        | Svagt stikkende                 |
| P, p                  | Propionic acid   | Propionsyre       | Stikkende                       |
| iB, ib                | iso-butyric acid | Iso-smørsyre      | sur-sød, stikkende              |
| B, b                  | Butyric acid     | Smørsyre          | fækalt ( <i>Fusobacterium</i> ) |
| iV, iv                | Iso-valeric acid | Iso-valerianesyre | fad-sød, stikkende              |
| V, v                  | Valeric acid     | Valerianesyre     | fad-sur-sød                     |
| iC, ic                | Iso-caproic acid | Iso-capronsyre    | fad-sur-sød                     |
| C, c                  | Caproic acid     | Capronsyre        | svag sødlig lugt                |
| L, l                  | Lactic acid      | Mælkesyre         | lugtløs (ikke-flygtig)          |
| S, s                  | Succinic acid    | Ravsyre           | lugtløs (ikke-flygtig)          |

Gaskromatografi er en ret besværlig metode at anvende. Apparatet er dyrt, og kræver en del tid, øvelse og uddannelse at anvende.

Gaskromatografi er ikke en identifikationsmetode, men kun en test, som står ved siden af de øvrige tests. (Et godt hjælpemiddel i hænderne på specialister men uegnet til rutinebrug).

Kun indenfor gruppen af ikke-spordannende gram positive stave kan en slægtsdiagnose styrkes af gaskromatografiresultatet.

## Direkte enzymtests, aerotoleranstest, sporeprøve og forgæringsreaktioner

Ved påvisning af præformede enzymer ved direkte enzymtests bringes et stort bakterieinoculum direkte i forbindelse med en ren opløsning af det substrat som ønskes undersøgt. Aflæsning ved farvereaktion.

### Indolproduktion - tryptophanasetesten

1) Spottest: 1 dråbe indolreagens (Kovacs) på filtrerpapir. En synlig mængde fra en koloni afsættes straks herpå. Rødfarvning omkring pletten indenfor 5 min: POSITIV. En negativ reaktion bør bekræftes med tryptophanasetesten.

2) Tryptophanbuffer (SSI). Opslemning til synlig uklarhed. Inkubering v. 35°. Aflæsning tidligst efter 4 timer, men må gerne stå i flere døgn. Udstyrning med "Micro-Clear" (ca. ½ ml) før tilsætning af indolreagens. Positiv = rød. Negativ = farveløs.

### Ureasetest

Ureabuffer (SSI). Opslemning til synlig uklarhed.

Aflæsning efter 1-4 timer (maximalt 24 timer) efter inkubation v 35°. Positiv = kraftig rødviolet.

### ONPG

En  $\beta$ -galactosidase test med ONPG-substrat (o-nitro-phenyl- $\beta$ -D-galactopyranocid) (SSI). Fraspaltet o-nitrophenol er gult. Testen påviser både lactosespaltende enzym inden i bakterierne og enzymer udskilt til omgivelserne (exoenzymer) i modsætning til alm. lactoseforgæringstests som kun påviser exoenzymer. Testen er derfor mere sensitiv end alm. lactoseforgæring. (se mere om ONPG side 16) Opslemning til synlig uklarhed. Aflæsning tidligst efter 4 timer i op til maksimalt 24 timer efter inkubation v. 35°. Anaerob inkubation tilrådes ved tvivl om resultatet. Positiv = gul.

### Desulfovridintest

(*Desulfovibrio/Desulfomonas* spp. samt ofte *Bilophila*). Påvisning af sulfitreductase.

En enkelt dråbe 2 N NaOH afsættes direkte på en anaerob plade med tæt vækst og betragtes straks i UV-lys (365 nm). Positiv: Rød fluorescens sv.t. dråben. Negativ: Ingen fluorescens.

### Andre direkte enzymtests for præformede enzymer

Testene anvendes i forskellige sammenhænge. Se de enkelte skemaers anvisninger.

Direkte enzymtests:  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, alkalisk fosfatase m.fl. Samme princip som for ONPG testen.

Anvend Roscos tabletter efter forskriften (opslemning til synlig uklarhed i 1/4 ml saltvand. Tilsætning af tablet. Aflæsning efter højst 1 døgn v. 35° under alm. aerobe forhold.

Positiv = gul (N-acetylglucosaminidase: Kun stærk gul er positiv !)

Negativ = farveløs - svag gul.

Resultater ved anvendelsen af ROSCO "sukker-tabletter" OG NITRATDISK til anaerob identifikation har desværre ikke været entydige

**Katalasetesten** hører naturligvis også til de direkte enzymtests.

## Undersøgelse for ilttolerance

Denne undersøgelse bør laves på et tidligt tidspunkt, især hvis det drejer sig om metronidazolresistente ikke-sporedannende gram positive stave og kokker eller små/tynde gram negative stave.

### 4 blodplader tilsås med spredning, med med tæt inoculum i første strøg, til inkubering anaerobt, mikroaerofilt, i CO<sub>2</sub> og aerobt.

#### Aflæsning efter 2 døgn:

1) Kun vækst på anaerobplade og evt. svag vækst på mikroaerofilpladen. Ilttolerans = 0

Mikroaerofilt (ca. 5% ilt + CO<sub>2</sub>) Ægte mikroaerofile som *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp. og "*B. ureolyticus*" og evt. andre mikroaerofile gram negative stave vokser maksimalt her, dvs. vokser dårligere eller slet ikke under anaerobe forhold og i CO<sub>2</sub>

Ilttolerans = + eller egentlig mere korrekt : MIKROAEROFILE (se: Generelt om bakteriers forhold til ilt).

God vækst både anaerobt, mikroaerofilt og evt. vækst i CO<sub>2</sub> men ikke aerobt. Ilttolerans = ++

God vækst under alle forhold dvs. også aerobt. Ilttolerans = +++

*Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp., visse "ægte" streptokokker og *Lactobacillus* er metronidazolresistente og vokser oftest langsomt frem efter nogle dage i første og andet strøg aerobt.

*C. tertium* (og *C. carnis*) kan vokse i CO<sub>2</sub> inkubator og aerobt, men danner ikke sporer her - kun anaerobt.

## Sporer og Sporeprøve

Anaerobe sporedannere er identiske med *Clostridium* spp.

Visse clostridier *C. tertium* og *C. carnis* vokser aerobt, men danner ikke sporer under aerobe forhold ! (Visse Bacillus f.eks. *B. cereus* kan vokse under anaerobe forhold, men danner ikke sporer anaerobt !)

Nogle *Clostridium* spp. danner altid sporer tidligt, nogle danner først synlige sporer sent og nogle danner meget få sporer.

Sporedannelsen hos *Clostridium* spp. kan forsøgsvis fremmes ved at inkubere kulturen i ca. 3 - 5 døgn under anaerobe forhold, gerne på flere forskellige medier f.eks. EYA-plade.

Halvflydende agar og/eller thioglucollat kan evt. henstilles ved stuetemperatur, og der mikroskoperes fra disse medier med mellemrum.

I grampræparat er sporer typisk rød-blå farvede ringe med ufarvet indhold.

I fugtigt præparat ses sporer som stærkt lysbrydende legemer med kun én i hver celle, og bør kunne skelnes fra inklusionslegemer som er mindre, ofte flere i hver celle og ikke opsvulmer cellelegemet.

"Pseudosporer" kan ses når bakterierne ligger på tværs af hinanden eller "vender enden" til beskueren.

Sporeformen er ikke diagnostisk men lejringsen skal vurderes som TERMINAL eller SUBTERMINAL.

*C. perfringens* danner sporer, men de er næsten aldrig synlige i mikroskopi af kulturer !!

**Terminale sporer** ses i præparatet kun i den terminale position hos den undersøgte stamme.

Bakterier med terminale sporer er næsten altid slanke stave og sporen er tykkere end bakterielegemet (som en trommestik - til en stortromme eller en grydeske)

**Subterminale sporer** kan ses i alle positioner i bakterielegemet i den samme kultur og bakterier med denne type sporer er oftest tykkere stave og sporerne på tykkelse med eller kun lidt tykkere end bakterielegemet.

## Fremgangsmåde for sporeprøve:

Udføres på gram positive stave hvis der er mistanke om sporedannere. Sporeprøven udføres ved at der fremstilles en suspension (bedst fra en kultur der er ≥ 3dage gammel) med synlig uklarhed i 1/2 ml dest. vand eller saltvand. Det er vigtigt ikke at forurene glassets indside ovenover væsken med bakterier.

Tilså en halv anaerob plade herfra med en øsken.

Tilsæt herefter 1/2 ml ren etanol - den fra gramfarvningen. Bland forsigtigt ved at rotere øskenen og lad glassene stå ved stuetemperatur i 1 time. Tilså herefter den anden pladehalvdel fra etanolglasset (50% etanol). Inkuber i anaerobt og aflæs dagligt op til 3 døgn a.h.t. langsomt voksende evt. dårligt sporedannende clostridier)

Positiv sporeprøve: Vækst på begge udsåninger (oftest kraftigst på kontroldelen).

Negativ sporeprøve: Kun vækst på kontroludsåningen.

## SPS-følsomhed

(SPS er en forkortelse af Sodium Polyanethol Sulfonat, også kendt som LIQUOID der er tilsat bloddyrkningskolber som antikoagulan!).

En ROSCO tablet m. SPS anbringes på en tilsået plade. Følsom:  $S \geq 12$  mm. Af de ægte anaerobe gram positive kokker er kun *Peptostreptococcus anaerobius* og undertiden *Micromonas micros* følsomme.

Sukkerforgæring: se under "Forgæring i anaerob atmosfære"

Esculinhydrolyse: se under "Forgæring i anaerob atmosfære"

Gelatine smeltning: se under "Forgæring i anaerob atmosfære"

Nitrattest: se under "Forgæring i anaerob atmosfære"

## "Forgæringsreaktioner" i anaerob atmosfære

Ved forgæringsreaktioner forstås her den enzymatiske påvirkning af forskellige stoffer spec. forskellige sukkerarter men også esculin, gelatine og nitrat, oftest af bakterier i vækst.

Ved sukkerforgæring altid et glucoseglas og en sukkerfri KONTROL som minimum.

- 1) Direkte inkubering af de tilsåede forgæringsglas i anaerob atmosfære med eller uden tilsætning af hestecitratplasma (se ad 1).
- 2) Forgæring efter Co-kulturmetoden (se ad 2).
- 3) Alternativt kan påvisning af præformede enzymer forsøges anvendt med ROSCO-tabletter især ved manglende vækst (se ad 3).

### Ad 1.

SSI Sukker- esculin- nitrat- og gelatineglas kan anvendes ved denne metode.

Stort inoculum/glas, dvs. synligt på øsken.

- a) Kraftigt voksende *Clostridium*- og *Bacteroides fragilis*-gruppen behøver ikke yderligere tilsætning.
- b) Ikke sporedannende gram positive stave samt øvrige gram negative stave skal tilsættes hestecitratplasma (Co-kultur kan ikke anvendes her).

Tilsætning af hestecitratplasma/serum:

Foregår ved at tilsættes ca. en dråbe hestecitratplasma per ml forgæringssubstrat. Serumtilsætning ændrer bromthymolfarven mod gult !

### Ad 2.

*Co-kulturmetoden* (fordel: skal ikke inkuberes anaerobt)

Metoden er kun velegnet til de hurtigt voksende *Bacteroides*- og *Clostridium* spp.

Forgæringsglassene tilsås alle først med en bakteriestamme af typen *Acinetobacter* ("*B. anitratum*") som man har sikret sig ikke forgærer noget som helst. Den eneste positive reaktion der må være er en positiv katalase. (*A. Iwoffii* ST661/60 kan evt. anvendes)

Samme øsken kan dypes i alle glas. Herefter tilsås glassene med et stort inoculum dvs. synligt på øsken af stammen som skal undersøges.

*Acinetobacter* stammen kan sås om rutinemæssigt ca. en gang om ugen, og kan stå ved stuetp. f. eks. på blå plade så den altid er klar -vi kalder vores stamme for BANCO (B. ANitratum CO kultur).

Ved vækst af den iltkrævende *Acinetobacter* fjernes ilt i tilstrækkelig grad fra substratet til, at de fleste moderate anaerobe stammer kan vokse, selv om det pågældende substrat inkuberes i en almindelig aerob termostat

### Aflæsning:

Co-kulturglassene kan som regel aflæses direkte ved at sammenligne med kontrolglasset

Nogle *Clostridium* spp. er så kraftigt reducerende at de reducerer farven på bromthymolblåt-indikatoren i alle glassene til farveløs eller strågul.

Inkubering i kammer eller tilsætning af serum gør alle glassene gullige.

I begge tilfælde vil tilsætning af et par dråber 0,2% bromthymolblåt til glassene få farven til slå tilbage til grønblå i kontrollen, og i de glas hvor der ikke er sket en forgæring.

Bevaret gul farve = forgæring.

Ofte vil der kunne iagttages en kraftigere vækst i glas med en sukkerart som forgæres end i et glas uden forgæring eller i kontrolglasset.

### **ESCULIN**

Esculin fluorescerer kraftig gulgrønt i UV-lys. Spaltes af nogle bakterier ved en hydrolyse til esculetin og glucose og fluorescensen forsvinder, ved en fuldstændig spaltning.

Til esculinglasset tilsættes ca. 5 dråber ferriammoniumcitrat 1% i vandig opløsning. Sortfarvning = Esculinhydrolyse. Dannelsen af svovlforbindelser kan "forplumre" reaktionen (jernsulfid) og det tilrådes at UV-belyse glasset for at se om esculinfluorescensen er forsvundet. (Hvis den ikke er, er prøven NEGATIV).

### **Ad 3.**

Hvis en anaerob bakteriestamme overhovedet er i stand til at forgære en sukkerart, drejer det sig praktisk talt altid om glucose. Undertiden kan glucoseforgæringen i SSI forgæringsglas af ikke helt forklarlige grunde volde vanskeligheder. Det skyldes måske peptonindholdet, som hos samtidig proteolytiske stammer kan "overdøve" sukkerforgæringen ved at danne mere base end syre.

### **OBS ! Svinger glucoseforgæringen kan en ONPG positiv reaktion videretolkes som en positiv glucosereaktion !**

Forklaring: Spaltningen af ONPG af  $\beta$ -galactosidase er samme proces som spaltningen af lactose (disakkarid) til glucose og galactose. Bakterien har kun interesse i at spalte lactose, hvis den kan videreforgære glucose.

### **Proteolyse/Gelatinesmeltning (Evt. som co-kultur s.d.)**

Gelatinaseaktivitet er en undersøgelse for proteolytiske enzymer. Gelatinesmeltning kan være en noget omstændelig procedure så:

**HUSK at proteolyse evt. kan ses allerede både på anaerobpladen og EYA-pladen og en positiv reaktion kan viderefølkes som gelatinesmeltning !**

**Gælder især de stærke gelatinesmeltere (se nedenfor)**

Gelatinesmeltning er bla. vigtig ved skelnen mellem proteolytiske og non-proteolytiske *Clostridium* spp. To typer gelatinase kan påvises. Begge er et udtryk for proteolyse.

Den ene type gelatinase spalter gelatinekederne effektivt til aminosyrer og gelatinen er herefter flydende selv ved 4° - **de stærke gelatinesmeltere.**

En anden type gelatinase spalter kun til polypeptidkæder så gelatinen ikke flyder ved 4° - **de svage gelatinesmeltere.**

Der skal derfor altid anvendes et kontrolgelatineglas ved undersøgelse for gelatinesmeltning. Begge typer af gelatinesmeltning registreres som positive.

### **Fremgangsmåde:**

To gelatineglas (SSI) holdes under den varme hane til de bliver flydende. Det ene glas tilsås med den stamme der ønskes undersøgt og det andet tilsås ikke.

Glassene inkuberes i en anaerob atmosfære. v. 35°. Aflæsning daglig i op til en uge.

### **Aflæsning:**

1) Først afkøles glassene i køleskab v. 4° i ca. 15 min.

2) Testglasset vippes forsigtigt og en kraftig smeltning = ++ vil kunne ses umiddelbart ved at indholdet i testglasset er flydende – stærk gelatinesmelter. Kontrollen er stadig stiv.

Hvis indholdet i begge glas er stift, opvarmes glassene langsomt med håndvarme idet de med korte mellemrum holdes i skrå stilling. Gelatines naturlige smeltepunkt er ca. 25°. Hvis der iagttages begyndende flydning i testglasset før kontrolglasset er dette også gelatinesmeltning = + - svag gelatinesmelter. (F.eks. er *C. difficile* og *C. septicum* svage smeltere der evt. først bliver positive efter 3 døgn).

3) Hvis begge gelatiner bliver flydende på samme tid, bør glassene inkuberes påny og aflæses på samme måde som beskrevet i op til en uge, før gelatinesmeltningen aflæses som negativ.

### **Nitratreduktion (Evt.som co-kultur s.d.)**

Nitratreduktion er en proces hvor kvælstof-iltforbindelser reduceres dvs. ilt fjernes i stigende grad og hydrogen tilføjes evt. i stigende grad.  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3 \rightarrow \text{N}$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{NH}_2$ , og  $\text{NH}_3$ . Enzymerne (nitratreduktaser) fungerer kun optimalt under anaerobe forhold.

1) Nitratreduktionen kan udføres i halvflydende kaliumnitratsubstrat fra SSI. Substratet er beriget med serum, som derfor ikke skal tilsættes for vækst.  $\text{KNO}_3$  substratet har også den fordel at evt. mikroaerofil vækst kan påvises ved vækst lige under overfladen ved aerob inkubering. Netop nitratreduktion er en vigtig egenskab hos en række mikroaerofile gram negative stave og en del uregelmæssige gram positive ikke-spordannende stave. (Alm. flydende nitratglas kan ikke anvendes !)

### **AFLÆSNING VED SYNLIG VÆKST.**

Tilsætning af nitratreagenser (Sulfanilsyre og Cleve's syre)

2) Nitratreduktion som direkte enzymtest:

Roscos "Diagnostic tablet" til påvisning af nitratreduktion kan evt. forsøgt anvendt med nitrattabletten i en bakterieopslemning som beskrevet i Roscos "User's guide". "Inkubation" under anaerobe forhold da de relevante enzymer kun fungerer sikkert anaerobt.

3) Nitratreduktion med nitratdisk.

Nitratdisken lægges på en plade som er tæt tilsået. Efter synlig vækst tilsættes disken en dråbe af hver af de to nitratreagenser. Rød = positiv (+). Ingen ændring: Tilsætning af zinkpulver. Rød = negativ – ingen ændring = positiv (+++)

## Agarpladetyper og deres anvendelse

### Anaerobplade (SSI)

Anaerobpladen er en chokoladeplade ("laked blood agar") suppleret med K-vitamin og cystein. Denne plade kan anvendes som standardmedium.

Agarmediet bør være så friskt som muligt. Der sker efterhånden en irreversibel iltning af cystein (som er reducerende) til cystin (som er toksisk overfor bakterier) ved adgang af alm. atmosfærisk luft.

Pladerne bør derfor ideelt opbevares under anaerobe forhold indtil brug, og holdbarheden er her næsten ubegrænset, kun begrænset af evt. udtørring.

**Desværre er pladerne ofte en uge om at nå bestemmelsesstedet efter fremstillingen og har her initialt været opbevaret i køleskab hvilket er ødelæggende – øget iltabsorption og cysteiniltning til cystin.**

**Hvis pladeflow er tilstrækkeligt stort skal pladerne i det mindste opbevares ved stuetemperatur. Dette giver også den fordel at evt. aerob forurening kan afsløres før brug. Pladernes holdbarhed under disse forhold er maximalt en måned efter fremstillingsdagen dvs. at de skal tages i brug mindre end 3 uger efter fremstillingen.**

### VÆKST PÅ PLADEN.

På anaerobpladen vil de fleste almindelige klinisk relevante anaerobe bakterier vokse frem med synlige kolonier efter 1-2 dages inkubering. Anaerobpladen understøtter (i modsætning til blodpladen) udviklingen af pigment, fluorescens og katalaseproduktion. Pladen kan anvendes både som primærplade, rendyrkningsplade og resistensplade.

### Blodagarplade (5% hesteblood, SSI)

De hyppigst forekommende *Bacteroides* og *Clostridium* spp. vil vokse lige så godt på almindelig 5% blodagar, der dog ikke kan anbefales som standardmedium, men som supplement.

Grampositive ikke sporedannende metronidazolresistente stave som kan være *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* bør også på blodplade da kolonierne her ofte er mere karakteristiske og evt. hæmolyse kan iagttages.

Blodpladen er vigtig ved hurtig konfirmation af diagnosen *Fusobacterium necrophorum* som har  $\beta$ -hæmolyse (skyldes lipasen) efter et døgn anaerob inkubation.

10% blodagarplade er **ikke** dokumenteret bedre end 5% til dyrkning af bakterier i det hele taget (se også side 11 under 5% blodagar)

### BHIA-pladen (Brain heart infusion agar)

Den pladetype som er beskrevet tidligt som standardplade til anaerob dyrkning. Kan også anvendes i stedet for anaerobpladen.

### EYA (Egg Yolk Agar, SSI)

Tilså kun den ene pladehalvdelen med et stort inoculum (især vigtigt for *Fusobacterium* sp.) og lav et par punktinokulationer på den anden halvdel. Inkuberes i 1 døgn for lecitinase- evt. 2-3 døgn for lipasedannelse.

Lecitinaseaktivitet viser sig ved at agaren bliver hvid under og udenfor koloniens rand medens selve kolonien ikke ændres. Den diffusible lecitinase spalter lecitin så der sker en udfældning af uopløselige diglycerider i agaren.

Lipaseaktivitet er resultatet af en nedbrydning af triglycerider til glycerol og frie fedtsyrer. Fedtsyrer udfældes i agaroverfladen begrænset til selve kolonien, da fedtsyrer med smeltepunkt over 37° ikke kan diffundere i vand. Selve kolonien bliver hvid med et iridicerende/perlemorsagtige skær. Evt. opklaring i agaren omkring kolonierne skyldes proteolyse. Ved tvivl geninkuberes pladen så det karakteristiske perlemorsagtige skær kan udvikles og iagttages efter 3 - 5 døgn.

Fejlkilder:

Hvis pladen tilsås med alm. spredning vil en kraftig lecitinasedanner kunne gøre hele pladen ensartet positiv, så aflæsningen tolkes som negativ.

### **Sværmede bakterier**

EYA pladen fra SSI har med sin nuværende sammensætning vist sig at hæmme sværmen af visse clostridier: *C. septicum*, *C. sporogenes*, *C. tetani* m.fl., således at enkeltkolonier kan opnås på en EYA-plade ved rendyrkning af disse stammer.

### **CAMP-plade (5% fåreblod, SSI) Pladen er ikke essentiel**

Ved anvendelse af en gruppe B streptokok som testbakterie (i stedet for *S. aureus*) kan en diagnostisk CAMP-reaktion for *C. perfringens* ses som en afrundet ("Bullit") hæmolyseforstærkning ved streptokokstregen.

*C. perfringens* har dobbelthæmolyse på blodplader. En snæver komplet  $\beta$ -hæmolyse både på heste- og fåreblod som skyldes theta toxin ( $\theta$ -toxin) og en noget større delvis hæmolyse (skyldes  $\alpha$ -toxin = lecitinase) som er tydelig på fåreblod men kun svag på hesteblood.

## Disktyper og deres anvendelse (se også side 7 og 8)

**De anvendte typer af disks som er beskrevet her er de typer (filtrerpapirdisks med de nævnte koncentrationer) som er anvendt i den internationale litteratur i forbindelse med identifikation.**

(Oxoid er kun nævnt her fordi de fører alle de nævnte disktyper)

Spørgsmålet om man ikke godt kan anvende ROSCO tabletter eller andre koncentrationer er kort og godt: NEJ !!

Generelt om diffusionsmetoder:

Anvendelse af diffusionsmetoder på agarmedier indebærer fejlmuligheder. Ved anbringelse af et depot (disk) på en agaroverflade startes en hurtig udsivning af indholdet i agaren og disken tømmes efterhånden for indhold. I starten er koncentrationen meget høj lige udenfor disken, men aftager i princippet til diskindholdet er fordelt i hele agaren (som jo er ca. 98% vand).

Hvis tilsåningen har været meget tæt kan nogle bakterier evt. have overlevet selv ret tæt ved disken og de vil efterhånden som koncentrationen omkring disken aftager så begynde at vokse igen – genvækst i hæmningszonen, dog ofte som aftagende vækst ind imod disken.

Den oprindelige hæmningszone er den som skal registreres.

### **Metronidazol. (6 mm filtrerpapirdisk, 5 µg - Oxoid)**

#### **1) Selektivitet:**

Zone (som regel >25mm) = "ægte" anaerob bakterie.

#### **2) Identifikation:**

Zone (som regel >25mm) = "ægte" anaerob bakterie.

Aerotolerante anaerobe bakterier som *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* og *Streptococcus* er metronidazolresistente ved anvendelse af 5µg disk. I sjældne tilfælde kan der ses aftagende vækst af nogle af disse arter ind imod metronidazoldisken, under strikt anaerobe forhold. Dette gælder også for de "ægte" mikroaerofile bakterier.

#### **3) Resistensbestemmelse:**

Metronidazolfølsomhed (zone ≥ 10 mm sv.t. MIC ≤ 8mg/l) på primærpladen indikerer at dette stof kan overvejes til behandling. (Anvendes RAF disken på 10µg, anvendes gældende regler herfor).

### **Kanamycin. (6 mm filtrerpapirdisk, 1000 µg - Oxoid)**

Kanamycin Zone ≥10 mm = FØLSOM, zone < 10mm = R.

Kanamycinresistens er karakteristisk for følgende gram negative stave: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* (blandt sidstnævnte er der dog et par sjældnere undtagelser)

Øvrige anaerobe gram negative stave er kanamycinfølsomme.

Stafylokokker og Enterobacteriaceae er kanamycinfølsomme, så zonen kommer samtidig til at virke som selekterende område for de førstnævnte hyppigt forekommende anaerobe gram negative stave. *Clostridium* spp. er også følsomme men ofte med en lidt mindre zone en de følsomme gram neg. stave, ligesom mindre zoner også findes blandt ikke-sporedannende gram positive stave.

### **Vancomycin. (6 mm filtrerpapirdisk m. 5 µg - Oxoid)**

Vancomycin Zone ≥10 mm = FØLSOM, zone < 10mm = R.

Anaerobe gram positive bakterier er vancomycinfølsomme (undtagelse: Visse *C. innocuum* stammer og visse *Lactobacillus* spp.).

Anaerobe gram negative bakterier er vancomycinresistente (undtagelse: *Porphyromonas* sp.).

### **Colistin. (6 mm filtrerpapirdisk m. 10 µg - Oxoid)**

Colistin Zone ≥10 mm = S, men også delvis hæmning = S, zone < 10mm = R.

Anaerobe gram positive bakterier er colistinresistente.

Anaerobe gram negative bakterier er colistinfølsomme med undtagelse af egentlige *Bacteroides* i "fragilis gruppen" og visse *Prevotella* spp. og *Porphyromonas* samt *Desulfovibrio* og *Selenomonas*. Anvendes derfor til primær differentiering indenfor gruppen af Gram negative stave (sammen med kanamycinresultatet).

### **Galde. (Ox-gall tablet - ROSCO)**

Ikke hæmmet vækst helt ind til tabletten = R.

Zonedannelse samt tydeligt aftagende kolonistørrelse de sidste 5mm indtil tabletten = S,  
Aflæsningen omkring galdetabletten kræver evt. anvendelse af lup for at se på væksten helt ind imod tabletten, idet den koncentriske galdesyreudfældning omkring tabletten fejlagtigt kan tolkes som zonedannelse og dermed følsomhed. Efter ca 2 døgn begynder galdetabletten at "flyde ud" og aflæsningen vanskeliggøres.

Generelt gælder det at galderesistente arter/stammer er fra tarmkanalen, og de galdefølsomme fra andre oprindelsessteder.

### **Luftdannelse**

Aflæses sædvanligvis i glucoseglassets Durhamrør. Glucoseglasset skal helst være forvarmet i det mindste til stuetemperatur, så luft er uddrevet før tilsåningen. Herefter kan selv dannelse af små luftmængder regnes for ægte luftdannelse.

SSI's Halvflydende agar kan ikke bruges, da der spontant dannes luftbobler i agaren når den anbringes i termostat.

# Dyrkningsatmosfæren

## Tilstedeværelse af ilt

Fravær af molekylær ilt er den afgørende faktor for at anaerob vækst kan finde sted. Prøvetagning og transport af materiale er idligere omtalt. Hvis anaerobe bakterier er ankommet levende til laboratoriet kan det være gavnligt for dyrkningsresultatet at udså et stort inoculum.

Iltfjernelse er vigtig både i dyrkningsatmosfæren men også i medier og substrater. Efter anbringelse i en iltfri atmosfære går der afhængig af mediets tykkelse/højde og konsistens (agarindhold) en vis tid før ilten er bortdiffunderet.

Hvis medier og substrater har stået i længere tid specielt i køleskab vil iltoptagelsen fremmes således at der vil ske en oxidation af indholdsstofferne, i nogle tilfælde irreversibel. Det samme gælder for prøvematerialet. Prøvebehandling i laboratoriet bør derfor foregå uden unødigt forsinkelse med anvendelsen af egnede medier og udsåede plader bør bringes under anaerobe forhold umiddelbart efter tilsåningen .

(Se også indledningens teoretiske del).

## Iltfjernelse

Anaerobe betingelser kan opnås på forskellige måder.

Anaerobkammeret er velegnet, da pladerne løbende kan inspiceres uden at udsættes for ilt. Lufttætte krukke kan evakueres med en pumpe og efterfyldes med en gasblanding, som regel 80% N<sub>2</sub> + 10% H<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub>. Et automatisk system findes på markedet (Anoxomat).

En katalysator i krukken er nødvendig for at fjerne de sidste rester af ilt.

Forskellige typer af lufttætte foliepakninger indeholdende kemikalier, som udvikler H<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> eller er iltabsorberende efter tilsætning af vand, findes til anvendelse i anaerobkrukker, men er betydelig dyrere i anvendelse end de to førstnævnte metoder. Hertil kommer at anaerobe forhold opnås næsten med det samme med kammer og pumpemetoden medens betydelig længere tid kan forløbe inden de kemiske metoder er effektive. "Anaerogen" fra Oxoid er fundet bedst i en sammenlignende undersøgelse med adskillige andre fabrikater og har den fordel at den ikke kræver en katalysator (J Clin Microbiol 1996;34:1646).

## Iltindikatorer

Iltindholdet kan monitoreres kemisk eller biologisk. Methylenblåt er i stand til at afsløre utætheder i systemerne, ved farveskift fra farveløs til blå (BBL GasPak, Disposable Anaerobic indicator fra Becton Dickinson kan f.eks. anvendes). Væksten af en ægte anaerob bakterie er den sikreste indikator for at systemet fungerer. Flere arter er blevet foreslået, men nogle af disse viser sig at få en vis øget ilttolerans efter flere omsåninger.

En anden metode er at bruge en moderat anaerob bakterie f.eks. *C. perfringens* som kan vokse i op til 3 - 4% ilt og anbringe en metronidazoldisk m. 5µg på den tilsåede plade. Efter at have målt zonedannelsen under anaerobe betingelser kan denne zonestørrelse bruges som udgangspunkt for vurdering af de anaerobe forhold fremover. Hvis iltindholdet stiger vil den zone der dannes blive mindre i takt hermed og vil helt forsvinde, når bakterien lige netop stadig kan vokse trods ilttilstedeværelsen. Metoden er beskrevet separat på side 21.

Selv strikt aerobe bakterier (*Acinetobacter*, *Pseudomonas* o.l.) vil vokse efter nogle dage i et anaerobkammer, da der altid er ganske lidt ilt tilbage selv under ideelle betingelser og de er derfor uegnede som kontrolbakterier.

## Kontrol af anaerobe dyrkningbetingelser med *C. perfringens*

En relativt ilttolerant *Clostridium perfringens* stamme, som er metronidazolfølsom, vil danne maximal zonestørrelse ved den lavest mulige iltkoncentration. Hvis iltindholdet i atmosfæren stiger vil zonestørrelsen aftage proportionalt hermed.

En speciel *C. perfringens* stamme er fundet udtalt sporedannende og ilttolerant, så den er i stand til at vokse ved tilstedeværelsen af op til ca. 5% ilt.

### A. Fremstilling af sporesuspension

- 1) Stammen udsås i en alm. bouillon eller se-bouillon og inkuberes anaerobt v. 35°C i mindst 3 døgn (5 døgn er også afprøvet men giver ikke flere sporer). Tilså 3-4 glas så der opnås en kulturmængde på ca. 20 ml.
- 2) Efter fremvækst kan man af praktiske grunde vælge at hælde bouillonerne sammen i et passende sterilt rør med tæt skruelåg og ml angivelse.
- 3) Herefter tilsættes lige dele ren etanol (den til gramfarvningen) således at blandingen nu er 50% m.h.t. etanol.

Denne blanding bruges som inoculum og er ofte holdbar i op til ½ år ved stuetp. En ny kultur fremstilles og præpareres når aftagende væksttæthed iagttages,

### B. Kontrol af iltindhold under anaerobe dyrkningsbetingelser

Som agarplade anvendes ISO-sensi resistensplade med blod eller anaerobplade samt Oxoids metronidazoldisk på 5 µg.

En vatpind dyppes i den alkoholiserede kultur og pladen tilsås jævnt over hele overfladen med vatpinden.

En metronidazoldisk placeres midt på pladen og pladen inkuberes der, hvor iltindholdet ønskes kontrolleret f.eks. i anaerobkammeret.

### C. Aflæsning og tolkning

Næste dag vil zonedannelsen kunne vurderes, idet væksten bør være semikonfluerende (se billede)

Hvis de anaerobe forhold er tilfredsstillende vil zonen være

30 mm (28-32) på ISO-sensi pladen

eller

29 mm (27-31 mm) på anaerobpladen

Ved tilstedeværelsen af ca. 0,1% i dyrkningsatmosfæren ilt vil zonestørrelsen være reduceret til ca. 21 - 23 mm og ved 0,5% ilt ca. 9-12 mm.

Beskrivelsen af fremgangsmåden er resultatet af en lang række undersøgelser hvor varierende kulturalder, afpipeteret inoculum (1/4 og 1/2 ml) og spredning med glasstav har været anvendt. Det viser sig at spredningen med vatpinden både giver de mest reproducerbare zoner samtidig med at agaroverfladen er tør nok til at disken ikke falder af.

Stammen er døbt STANK selvfølgelig fordi det er en forkortelse af: Sporer Til ANaerob Kontrol.