

# SALMONELLA-KWEKINGS UIT BLOEDKLONTE MET DIE AANWENDING VAN 'N TETRATIONAAT-KWEEKBODEM

L. P. HEITMANN, *Departement van Mikrobiologie van die Karl Bremer-hospitaal, Bellville, Kp.*

Met Tetrationsaat as kweekbodem vir bloedklont-ondersoeke het ons goeie resultate behaal. Deur middel van hierdie publikasie wil ek graag ons metodes uiteensit.

Alhoewel oral in die literatuur net die gebruik van gewone beesgalbuisies vir die kwekings uit bloedklonte aangegee word, het ons besluit om tetrationsaat (in teenstelling met Kauffman se aanwysings) met beesgalsoute, sonder die byvoeging van briljantgroen, hier in ons laboratorium te gebruik.

## Bereiding van die Kweekbodem

*Bestanddele.* Proteose peptoon Difco, 5 G.; baktogalsoute, 1 G.; kalsiumkarbonaat, 10 G.; natriumtiosulfaat, 30 G.; water, 1,000 ml.

Die kalsiumkarbonate, proteose peptoon en baktogalsoute word in 'n groot fles met water geplaas en goed gemeng, en 'n halfuur lank in stoom gesteriliseer. Hierdie mengsel word dan in die yskas bewaar.

Die nodige hoeveelheid word daaglik in 'n geskikte fles gegooi, nadat die groot voorraaddfles deeglik geskud is. Die mengsel word warm gemaak tot 60°C. en die nodige hoeveelheid natriumtiosulfaat word bygevoeg terwyl daar gedurig geroer word. Ten laaste word 10 ml. van 'n vars bereide mengsel van 25 G. KJ en 20 G. J in 100 ml. water opgelos en by die mengsel gevoeg. Steriele buisies word dan gevul met die kweekbodem. Die mengsel moet elke keer opgeskud word, om te verseker dat in elke buisie 'n gelyke hoeveelheid van kalsiumkarbonaat kom.

Die bloedklont word in die bogenoemde buisies geplaas, nadat die Serologie-afdeling die serum afgepipeteer het vir hulle agglutinasietoetse. Na 3 dae in 'n 37°C. broeikas word die kweking uitgeplant op 'n MacConkey-agarplaat, en 'n SS-agarplaat. Die volgende dag word die Nielaktosefermenteerde kolonies op suikers uitgeplant. Indien 'n salmonella verkry word, word dit deur serologiese toetse bevestig. By negatiewe resultate word die bloedklont na 'n verdere 3 dae

in die broeikas, weer op plate uitgeplant. Na die tweede negatiewe uitplanting word die bloedklont as negatief aangege.

## RESULTATE

Hieronder word 'n paar bloedklontresultate met die Widaltoetse op dieselfde monsters vergelyk. Dit kom voor asof die metode goeie resultate oplewer. Dit maak vroegtydig die kweking van tifoïed-paratifoïed-basille, asook ander salmonellas, moontlik voordat die Widal-reaksie 'n goeie diagnostiese uitslag kan gee.

TABEL I. WIDAL- EN BLOEDKLONTKWEKINGS- RESULTATE\* VAN 18 PASIËNTE AAN DIE BEGIN VAN DIE SIEKTE

No.	Diagnose	Duur van siekte	Organismes uit bloedklont gekweek	Widal-resultate
2285	Koors van onbekende aard	8 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 200 TO 1 : 200
3034	Meningitis	4 dae	<i>S. typhimurium</i>	TH — TO —
3907	Koors van onbekende aard	4 dae	<i>S. typhi</i>	TH — TO —
4794	? Tifoïed ? Brusellose	8 dae	<i>S. virchow</i>	TH — TO —
95	? Tifoïed	4 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 50 TO 1 : 100
1026	? Tifoïed	8 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 100 TO 1 : 200
1424	? Tifoïed	14 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 800 TO 1 : 200
1815	? Tifoïed	14 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 200 TO 1 : 800
962	? Tifoïed	10 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 400 TO 1 : 200
1733	Koors van onbekende aard	5 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 400 TO 1 : 400
2223	Koors van onbekende aard	8 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 800 TO 1 : 400
3052	Koors van onbekende aard en diaree	4 dae	<i>S. minnesota</i>	TH — TO —

3450	?Tifoïed	4 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 100 TO 1 : 50
3558	Koors van onbekende aard	4 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 200 TO 1 : 100
3520	Tifoïed	6 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 400 TO 1 : 200
3578	Tifoïed	8 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 800 TO 1 : 400
3709	?Enteritis	3 dae	<i>S. typhimurium</i>	TH — TO —
3822	Koors van onbekende aard	5 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 200 TO 1 : 100

\* Al die bogenoemde resultate is klinies bevestig.

TABEL II. WIDAL- EN BLOEDKLONTKWEKINGS-RESULTATE VAN DIESELFDE PASIËNTE 14 DAE LATER

No.	Diagnose	Duur van siekte	Organismes uit bloedklont gekweek	Widal-resultate
2285	Tifoïed	3 weke	Negatief	TH 1 : 800 TO 1 : 1,600
3907	Tifoïed	3 weke	Negatief	TH 1 : 200 TO 1 : 400
95	Tifoïed	3 weke	Negatief	TH 1 : 200 TO 1 : 800
962	Tifoïed	3 weke	Negatief	TH 1 : 200 TO 1 : 800
1026	Tifoïed	3 weke	Geen bloedklont verkry nie	
1424	Tifoïed	3 weke	Negatief	TH 1 : 3,200 TO 1 : 800
1815	Tifoïed	3 weke	Geen bloedklont verkry nie	
1733	Tifoïed	3 weke	Geen bloedklont verkry nie	
2223	Tifoïed	3 weke	Geen bloedklont verkry nie	
3450	Tifoïed	3 weke	Negatief	TH 1 : 400 TO 1 : 400
3558	Tifoïed	10 dae	<i>S. typhi</i>	TH 1 : 400 TO 1 : 200

#### BESPREKING

Die volgende oorwegings in verband met die geskiedenis van bloed- en bloedklontkwekings is van belang:

Die eerste werk in hierdie verband is gelewer deur 'n Russiese navorser, Vilchur, in St. Petersburg in 1887, wat tifoïed-basille uit die bloed gekweek het. Castellani het 300 ml. vleiswater in 'n Erlenmeyers fles geplaas en die bloed daarin opgevang. Die bloed het hierin geklont en is in 'n broeikas teen 37°C. geplaas. Na 'n paar dae het hy dit uitgeplant op nutrient-agarplate. Schottmueller het die bloed opgevang in buisies wat gesmelte agar bevat, en afgekoel na 45°C. Die pasiënt se bloed is uit sy vena ulnaris getrek, 6 ml. is toe in die bogenoemde buisies gemeng en in steriele petribakkies uitgegiet. Daagliks is daar na verdagte kolonies gesoek. Maar al hierdie metodes het die nadeel gehad dat die bakteriedodende eienskappe van die bloed, asook die gevaar van kontaminasie, nie uitgesluit kon word nie.

Gedurende 1906 het baie navorsers na 'n maklike en doeltreffende metode gesoek, om tifoïed- en paratifoïed-basille vroegetydig in die bloed te isoleer. Kayser het 'n artikel gepubliseer waarin hy 'n tegniek beskrywe waar hy die bloedklont met 'n steriele mes of steriele glasstukkies in stukkies gesny het, en in vleiswater geplaas het. Conradie het vir die eerste keer 'n beesgalkweekbodem gebruik, bestaande uit die volgende bestanddele: 10% pepton, 10% gliserien, en beesgal. Dit het die bloedstolling vermy, en volgens hom dus kweking bevorder. Leon Muller het in 1925 vir die eerste keer 'n tetrationsaatkweekbodem in die salmonellabak-

teriologie ingevoer. Dit het bestaan uit vleiswater van 'n pH 7.4, 5% kalsiumkarbonaat en natriumhiposulfit, en 10 ml. van 'n mengsel van 25 G. J en 20 G. KJ. Schaefer het hierdie kweekbodem van Muller in 1934 gewysig. Hy het in plaas van vleiswater beesgal geneem, wat hy met 0.1% briljantgroen berei het.

Kauffmann het in 1935-1936 hierdie verrykings-kweekbodem nog verder gewysig soos volg: 22.5 G. kalsiumkarbonaat, 450 ml. vleiswater, pH 7.4, 10 ml. van 'n mengsel van 20 G. J en 20 G. KJ, 50 ml. van 'n 50% natriumtiosulfaat-oplossing, 5 ml. van 'n briljantgroen-oplossing van 1 : 1,000, en 25 ml. beesgal.

Leifson het in 1935 gevind dat Seleniet F 'n beter verrykings-kweekbodem is, aangesien dit veral by stoelondersoek nie 'n nadelige uitwerking teen shigellakieme het nie. Die tetrationsaatkweekbodem van Kauffman onderdruk die groei van shigella organismes.

Dawnie en Fairbrother het in 1934 vergelykings gemaak tussen bloedklontkwekings, Widal-agglutinasietoetse, stoelgangondersoek, en urine-ondersoek. Volgens hulle het 90% van die bloedklontkwekings van tifoïed-pasiënte in die eerste week van die siekte 'n positiewe resultaat getoon. Op hierdie tydstip is die Widal-toetse meestal nog negatief. Gedurende die tweede week van die siekte het hy van 60-70% positiewe bloedklontkwekings verkry. Daarna het sy syfers nog verder gedaal. Na hierdie tydperk het hy positiewe Widal-agglutinasietoetse en positiewe stoelgangkwekings verkry, en sy resultate grafies gestel. Die kweekbodem wat hy vir hierdie navorsingswerk gebruik het, was gewone beesgalbuisies.

Daar was later selfs navorsers wat op die bewerings van Kayser verder gebou het, naamlik om die kwekings uit bloedklont doeltreffender te maak deur die oplossing van bloedklont deur streptokinase en ander middels wat bloedklont oplos.

Preuss het in 1947 in Duitsland belangrike werk in hierdie verband gelewer. Na Wêreldoorlog II het daar 'n groot tekort aan jodium- en jodiumsoute ontstaan. Hy het toe 'n nuwe soort tetrationsaatkweekbodem ontwikkel. Muller het in 1925 bewys dat natriumtiosulfaat geoksideer moet word deur jodium na natriumtetrationsaatkweekbodem:  $2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{J} = \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 + 2\text{NaJ}$ . Preuss moes 'n plaasvervanger vir jodium kry, en het na 'n lang reeks eksperimente gevind dat  $\text{CuSO}_4$  sal voldoen. Die probleem het egter toe ontstaan dat die oorblywende  $\text{CuSO}_4$  weer uit die kweekbodem verwyder moes word, aangesien dit meer skadelik vir die basille is as die jodium. Chemies word dit voorgestel as volg:  $3\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 - 2\text{CuSO}_4 = \text{Cu}_2\text{S}_2\text{O}_6 + 2\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ . Hierna moes hy die soute, wat hinderlik kon wees vir die kweking van patogeeniese derm-organismes, verwyder:

1. Die moeilik-oplosbare kopertiosulfate is afgesuig.

2. Natriumsulfaat is verwyder deur uitkristallasie in die yskas oornag.

3. Die oorblywende kopersulfaat is verwyder deur byvoeging van kaliumasetaat (deur die vorming van koperasetaat). Terselfdertyd word natriumtetrationsaatkweekbodem verander, wat baie meer stabiel as die eersgenoemde is:  $\text{CuSO}_4 + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 + 2\text{CH}_3\text{COOK} = \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6 + (\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$ .

4. Die maklik-oplosbare koperasetaat word deur uitwasings met suiwer 96% alkohol, waarin kaliumtetrationsaatkweekbodem onoplosbaar is, verwyder.

5. Die alkohol word deur verdamping verwyder en die kaliumtetrataonaat word verder drooggemaak deur bewaring in 'n eksikator.

Op hierdie manier word 'n suiwer kaliumtetrataonaat geproduseer, wat geen spoor van koper- of van tiosulfaat bevat nie, behalwe 'n klein hoeveelheid van natriumsulfaat. Preuss het met hierdie geproduseerde kaliumtetrataonaat verskillende kweekbodems berei, en sy resultate vergelyk met die natriumtetrataonaat-kweekbodem van Kauffmann en ander navorsers, asook die Seleniet F van Leifson. Vergelykings is ook deur hom gemaak met die vaste kweekbodem van Drigalskie, Endo, SS, en MacConkey in roetine-ondersoeke van stoelgange en urine, saam met die met kaliumtetrataonaat-ontwikkelde vaste kweekbodems. In vloeistofkweekbodems het hy sy kaliumtetrataonaat vir die navorsingswerk getoets met byvoeging van briljantgroen, malachitgroen, kristalviolet, en metachromgeel, en dieselfde het hy ook met die vaste agar-kweekbodems gedoen. Sy bevindings was dat die natriumtetrataonaat-kweekbodem met jodium 'n kiembeskadigende uitwerking het. Die groei van 'n *B. proteus* word deur die pH van 7.4, wat deur die toevoeging van kalsiumkarbonaat nog verder alkalies gemaak word, nie voldoende onderdruk in Kaufmann, Schaefer, en Muller se tetrataonaat nie. Hy het ook beweer dat sy kanse vyfvoudig vermeerder het bo die van ander metodes om tifoïed te kweek. In 'n vloeistofkweekbodem van kaliumtetrataonaat het hy ook vasgestel dat die groei van shigellakieme onderdruk word, net soos in die natriumtetrataonaat-kweekbodems. Die volgende vaste kweekbodem het geen nadelige uitwerking op shigellabakterie gehad nie. Agar met 2% kaliumtetrataonaat in pankreasverteringsagar met 2 G. laktose, 3 G. saccharose, en 4 ml. van 'n 1% metachromgeel. Die pH van die kweekbodem is op 6.8-7.0 ingestel. In al die kweekbodems word kaliumtetrataonaat eers na die sterilisasie van die ander bestanddele bygevoeg, terwyl die agar nog warm is. Hy het twee ver-

skillende vloeistof-kweekbodems vir die roetienewerk, wat soos volg voorberei is: 'n 1 : 5% en 'n 2% kaliumtetrataonaatop. Vir die 1.5% mengsel gebruik hy pankreasverteringsop van Hottinger teen 'n pH van 6.5-6.8, waarby 'n 1 : 5,000 metachromgeel gevoeg is. Hy gebruik 'n 1 : 200,000 kristalviolet oplossing vir sy 2% mengsel.

Stoelgange word gekweek op 1.5% en 2% tetrataonaatagar asook op 1.5 en 2% vloeistof-kweekbodems. Daarvandaan word dit weer uitgeplant op MacConkeys, Drigalskie, Endo, SS, of tetrataonaatagarplate. Vir urinekweekings gebruik hy 'n 3% kaliumtetrataonaatvloeistof-kweekbodem met 1 : 200,000 kristalviolet daarin.

Heinrich en Pulverer, van die Universiteit van Köln, beskryf die tegniek van Preuss as die mees bevredigende vir salmonella-opsporing in hulle waterbakteriologiese navorsingswerk van die Ryn-rivierwater.

#### OPSOMMING

'n Metode word beskrywe vir salmonellakweekings van bloedklonte deur middel van tetrataonaat, wat dikwels positiewe resultate gee alvorens die Widalreaksie 'n bruikbare resultaat oplewer.

Ons is op die oomblik nog besig met navorsing oor die bruikbaarheid van die kaliumtetrataonaat-kweekbodem van Preuss vir die opsporing van shigella- en salmonella-organisme uit stoel-, urine en bloedkweekings. Ons sal later hieroor skryf.

#### BIBLIOGRAFIE

- Conradie, H. (1907): *Klin. Jb.*, 17, 273.  
 Downie, W. W. en Fairbrother, R. W. (1934): *Brit. Med. J.*, 1, 55.  
 Difco Manual (1948): p. 157.  
 Herrmann, W. (1947-48): *Z. Hyg. Infekt.-Kr.*, 127, 692.  
 Heinrich, S. en Pulverer, G. (1959): *Ibid.*, 145, 529.  
 Kahlfeld, F. (1948): *Nährbodentechnik*, p. 23. Leipzig: Thieme Verlag.  
 Muller, L. (1925): *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 93, 433.  
 Idem (1923): *Ibid.*, 89, 434.  
 Preuss, H. (1949): *Z. Hyg. Infekt.-Kr.*, 129, 187.  
 Idem (1949): *Klin. Wschr.*, 27, 543.  
 Idem (1951): *Z. ges. inn. Med.*, 6, 239.  
 Schaefer, W. (1934): *Zbl. Bakt.*, 1. Abt. Orig., 133, 458.  
 Wilson, G. S. en Miles, A. A., reds. (1955): *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, 4e uitg. Londen: Arnold.