Farvemetoder

Kapitel 1

Alment om bakteriefarvning

Farvestoffer anvendes inden for bakteriologien for at tydeliggøre bakteriecellens omrids med henblik på formdifferentiering, for at påvise organeller og andre specielle strukturer, fx. vægbygning, og for at påvise specielle makromolekyler, fx. inklusioner.

Blandt de mange forskellige metoder, der er udviklet til farvning af bakterier og bakteriebestanddele, skal kun omtales følgende, almindeligt anvendte metoder: generel farvning med metylenblåt, Gram-farvning, Ziehl-Neelsen-farvning og flagelfarvning. Indførelsen af fasekontrastmikroskopi har gjort, at metoder til fx. sporefarvning og kapselfarvning sjældent er nødvendige i det mikrobiologiske laboratorium, og har i øvrigt også til dels overflødiggjort generel farvning.

1. Fælles historisk indledning

Studiet af bakteriernes morfologi var i de første 200 år hæmmet af de ufuldkomne mikroskoper og af manglen på farvemetoder.

De billeder man så i mikroskoper som dem hollænderen Leeuwenhoek (1632–1723) og hans efterfølgere brugte, var kun svagt forstørrede (højst 300 x), og desuden var de lyssvage, uklare og mangefarvede på grund af kromatisk og sfærisk aberration. Disse ulemper fjernedes efterhånden. Bedre belysninger opnåedes ved hjælp af spejle, kondensorer og blændere. Kromatisk og sfærisk aberration forsvandt, og opløsningsevnen (forstørrelsen) blev forbedret, da man indførte sammensatte akromatiske linser (Amici 1824 og især Abbé 1883). Også indførelsen af immersionsvæsker var et fremskridt (vandimmersion indført af Amici ca. 1850, olieimmersion af Abbé i 1878). Fra begyndelsen af 1880'erne var mikrobiologerne derfor udstyret med lysmikroskoper, som i ydeevne ikke adskilte sig meget fra dem, der bruges i dag. De gradvise fremskridt i mikroskopets udvikling afspejler sig tydeligt i bakteriologiens historie. I 1830'erne, da de første akromatiske linser kom i brug, opdagedes de første parasitære sygdomme, nemlig dem som skyldes svampe (Bassi 1835; Schönlein 1839; Gruby 1841), og man opdagede gærsvampenes

tilstedeværelse ved alkoholiske forgæringer (Cagniard-Latour 1837; Swann 1837). Efter at yderligere forbedringer i linserne var nået i begyndelsen af 1880'erne, og farvemetoderne var taget i brug, fulgte slag i slag beskrivelserne af de patogene bakterier. (Cit. fra Lechevalier & Solotorovsky 1974 og Collard 1976).

Foruden af de ufuldkomne mikroskoper var udforskningen af bakterier vanskeliggjort af, at bakterierne i fugtige, ufarvede præparater viste for ringe kontrast i forhold til det omgivende medium, og af at der var så stærk uro i præparatet på grund af molekylarbevægelse og evt. flagelbevægelse, at præcise tegninger og målinger ikke kunne udføres (Koch 1877).

Naturlige farvestoffer, som udvindes af plante- og dyrematerialer, har i århundreder været brugt til farvning af tekstiler, og desuden har nogle få uorganiske stoffer været anvendt. Englænderen Grew synes at være den første, der anvendte et sådant farvet ekstrakt fra et insekt til plantehistologisk arbejde (1682). Leeuwenhoek anvendte i 1714 som den første plantefarvestoffet safran til farvning af dyrisk væv. Forskellige naturlige farvestoffer brugtes i den efterfølgende tid til histologisk arbejde, bl.a. indførte Goeppert & Cohn i 1849 karmin og Waldeyer i 1863 hæmatoxylin. Et stort fremskridt var introduktionen af de syntetiske anilinfarver i 1856 af Perkin, og Beneke var den første der benyttede et anilinfarvestof til histologisk arbejde (1862) (cit. fra Culling 1963, Jensen 1964 og Gurr 1965).

I 1862 farvede Hoffmann – formentlig som den første – bakterier i *fugtigt præparat* med en fuksin- eller karminopløsning (cit. fra Hoffmann 1869 og Loeffler 1887), og danskeren Salomonsen anvendte i 1877 en jodjodkaliumopløsning og senere svovlsur rosanilin til farvning af fugtige præparater. Weigert var den første, der i farvede *snitpræparater* af væv erkendte bakterier (1871), og han benyttede i 1875 med held hæmatoxylin- og siden anilinfarvning specielt til påvisning af bakterier i vævssnit. Denne metode blev ligeledes brugt af Billroth & Ehrlich (1875-77) (cit. fra Koch 1877, Loeffler 1887 og Salomonsen 1904).

Det var imidlertid Koch, der indførte principperne for farvning af *tørt præparat*. I 1877 angav han metoder til fremstilling, fiksering, farvning, fotografering og konservering af tørre præparater. Han viste, at anilinfarvestoffer, specielt vandige opløsninger af metylviolet eller fuksin, var de mest velegnede til farvning af bakterieceller, og at svingtråde kunne farves med en koncentreret vandig opløsning af Campeche-træekstrakt (indeholder hæmatoxylin og garvesyre). Med fremkomsten af Koch's arbejde var der åbnet muligheder for at sammenligne og dokumentere nøjagtige mikroskopiske observationer, hvilket tidligere havde været umuligt.

I løbet af 1880'erne udvikledes de første specielle farvemetoder. Koch offentliggjorde i 1882 en metode til farvning af tuberkelbakterier, som forbedredes af Ehrlich (1882), af Ziehl (1882) og af Neelsen (1883). Gram publicerede i 1884 sin metode til i vævssnit at skelne mellem cellekærner og bakterier, der senere fik særlig betydning ved også at adskille de to hovedgrupper af bakterier, grampositive og gramnegative, og Loeffler offentliggjorde i 1889–90 en metode til at farve bakteriers svingtråde. Omkring århundrededskiftet var der fremkommet et stort antal farvemetoder og varianter heraf, som bl.a. omtales i arbejder af Unna (1888), Neisser (1889), Salomonsen (1894) og Grimme (1902) samt af Friedberger & Reiter (1912).

2. Fysisk-kemisk baggrund

a) Farveopfattelsen

Almindeligt hvidt lys består af en blanding af alle spektrets forskellige farver. Fire er såkaldt rene farver eller urfarver: rødt, gult, grønt og blåt, og tre er grundfarver: rødt, grønt og blåt, hvoraf alle andre farver kan sammensættes. Tilsvarende har det menneskelige øjes nethinde lysfølsomme tappe med tre forskellige følsomhedsmaxima ved henholdsvis rødt, grønt og blåt (trikromatisk). Hvis en genstand i almindeligt hvidt lys har en farve, er det fordi genstanden absorberer nogle af spektrets farver, mens andre transmitteres eller reflekteres til øjets nethinde, og disse forhold bestemmer med hvilken farve genstanden opfattes. Sorte genstande absorberer alle spektrets farver; hvide absorberer enten ingen farver eller reflekterer to farver, som tilsammen opfattes som hvid (komplementærfarver). Mens det normale øje er trikromatisk, mangler farveblinde personer én eller flere af de tre farveopfattelseskomponenter (de kan altså være dikromate eller monokromate), hvorfor de vil fejlopfatte visse farver og dermed forveksle dem. Dette kan have stor betydning fx. ved mikroskopi af Ziehl-Neelsen farvede præparater, hvor de røde TB-bakterier af nogle farveblinde ikke kan skelnes fra en gul, grøn eller blå baggrundsfarve.

De fleste organiske forbindelser absorberer ikke lysbølger svarende til det synlige spektrum (400 nm (violet) – 750 nm (rødt)), men derimod lysbølger fra det ultraviolette område. Ved tilstedeværelse af såkaldte *kromofore grupper* (dvs. grupper med dobbeltbindinger eller tripelbindinger, fx. =C=N–, –N=N–, =C=C, =C=S), der indeholder løst bundne elektroner, rykker absorptionen ind mod eller ind i den synlige del af spektret. Denne virkning kan forstærkes væsentligt, når en kromofor gruppe er bestanddel af et konjugeret system, dvs. et system som indeholder vekslende enkelt- og dobbeltbindinger. Af væsentlig betydning for farven er også de såkaldte *auxokromer*, der er

atomgrupper med et disponibelt elektronpar (OH, NH_2 samt alkylsubstitutter af disse grupper), som kan inducere en elektronforskydning i det konjugerede system og derfor "fordybe" en allerede forhåndenværende farve, men ikke i sig selv gøre et farveløst stof farvet (cit. fra Jensen 1964 og Gurr 1965).

b) Farvestoffernes kemi

Alle farvestoffer til bakteriologisk brug er syntetiske, organiske produkter, såkaldte anilinfarver. Anilin, som industrielt fremstilles ved reduktion af nitrobenzen, er en farveløs væske med formlen $C_6H_5NH_2$, altså en primær amin af benzen.

I 1834 viste Runge, at anilin fra stenkulstjære danner mørkt farvede forbindelser med iltningsmidler, og den første egentlige anilinfarve (det violette mauvein) fremstilledes af Perkin i 1856 ved oxidation af anilin med kromsyre. I 1859 fremstilledes fuksin af Verguin ved iltning af en blanding af anilin og toluidiner, og i 1862 blev af Beneke for første gang et anilinfarvestof anvendt til mikroskopipræparater. Fra omkring 1870 er anilinfarvestofferne således til rådighed. Den videre udnyttelse af disse stoffer til biologisk farvning skyldes især Ehrlich (1877, 1878, 1886). På den tid startedes navnlig i Tyskland en fabrikation af anilinfarver, idet man hertil foruden anilinderivater regnede farvestoffer udvundet af tjæreprodukter. Farvestofferne benyttedes hovedsagelig til tekstilfarvning, men fandt som anført hurtigt anvendelse i histologiske og bakteriologiske laboratorier.

Et farvestofmolekyle består af en farvet jon og en ufarvet uorganisk eller alifatisk, organisk jon af modsat ladning og er således et salt. Gurr (1962) inddeler farvestoffer i sure, basiske, amfotere, neutrale og sammensatte. I sure farvestoffer er det den negativt ladede anjon, der er farvet, mens det i basiske farvestoffer er den positivt ladede katjon, som er farvet. Amfotere farvestoffer har både positivt og negativt ladede grupper; neutrale farvestoffer er ikke-joniserede, og sammensatte farvestoffer består af kemiske forbindelser mellem to forskelligt farvede farvestoffer.

Af betydning for farvestoffers kemiske binding til vævselementer eller til andre farvestoffer o.lign. er såkaldte kolligatorer. Sure kolligatorer er de negativt ladede carboxyl- og sulfonsyregrupper, som findes i sure og i nogle få basiske farvestoffer. De bindes til basiske elementer i væv eller basiske joner i andre farvestoffer. Basiske kolligatorer er de positivt ladede frie eller substituerede aminogrupper, som findes i basiske og i mange sure farvestoffer. De gør, at basiske farvestoffer kan bindes til sure vævselementer eller sure farvestoffers joner.

Basiske farvestoffer har stor affinitet til cellekærner, især til nukleinsyrernes fosfatgrupper, og mindre affinitet til proteiners carboxylgrupper i cytoplas-

maet. Sure farvestoffer har større tendens til at binde sig til cytoplasmaets bestanddele, især til proteiners aminogrupper. Til bakteriologisk brug anvendes mest basiske farvestoffer.

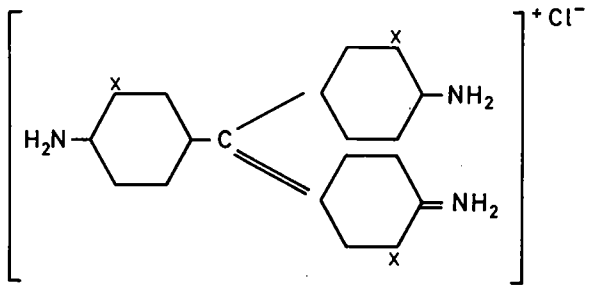
Fordelingen af farvestoffer i væv bestemmes foruden af den elektriske ladning af vævenes permeabilitet, og bestemmende for det visuelle indtryk er desuden den lokale mængde af farvbart materiale. Da bakterier ikke som eucaryoter har nogen opdelt indre cellestruktur, farves de ensartet med basiske farvestoffer, der bindes særligt fast til nukleinsyrernes fosfatgrupper. De bindinger, der forekommer, er først og fremmest jonbindinger, som formentlig forstærkes af bl.a. brintbindinger og kovalente bindinger (Baker 1960).

Heraf fremgår, at samme cellestruktur kan farves af mange forskellige farvestoffer, og at amfotere stoffer som fx. proteiner i nogen grad kan farves af både sure og basiske farvestoffer. Ved at variere farvetiden eller pH kan man opnå kontrol med, om et amfotert stof farves af sure eller af basiske farvestoffer. Et basisk farvestof kan fjerne og erstatte et andet, som allerede er bundet i vævet. Denne "replacement" følger massevirkningsloven for kemiske reaktioner (Bartholomew et al. 1950). Dette betyder, dels at kontrastfarvning (efterfarvning) ofte skal foretages med forsigtighed, dels at nogle modifikationer af farvemetoder direkte udnytter denne replacement-effekt, idet differentiering (affarvning) og kontrastfarvning foregår samtidigt.

c) Almindeligt anvendte farvestoffer

Basisk fuksin

Basisk fuksin er en blanding af p-rosanilin og to metyleringsprodukter heraf (basisk magenta og ny magenta), og det fås som klorid eller acetat eller frie baser. Det er et magentarødt basisk farvestof, hvis opløselighed ved 15°C er: 1% i H_2O, 8% i absolut (abs.) alkohol og 0 i xylen. Molekylvægten for de tre ingredienser er 329, 338 og 366, og den fælles formel er:

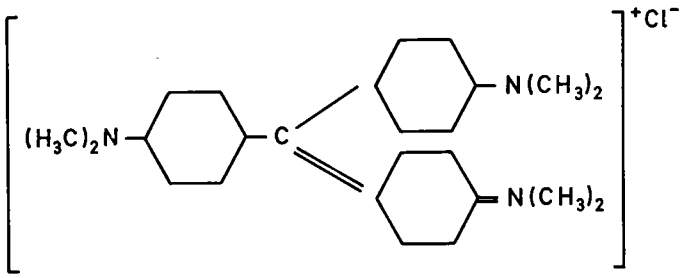


Basisk fuksin

Metyleringen finder sted ved +-erne. Absorptionsmaximum er 540 nm. pH af en vandig opløsning er 6,7. Det anvendes i en vandig opløsning indeholdende 1% fuksin, 10% alkohol og 5% fenol som "koncentreret" karbolfuksin til Ziehl-Neelsen-farvning og fortyndet 1:10 med destilleret vand til Gram-farvning. Det anvendes som en 1,2% opløsning af basisk fuksin i 95% alkohol til Leifson's flagelfarvning.

Krystalviolet

Krystalviolet er et blåviolet basisk farvestof med molekylvægten 408. Formlen er:

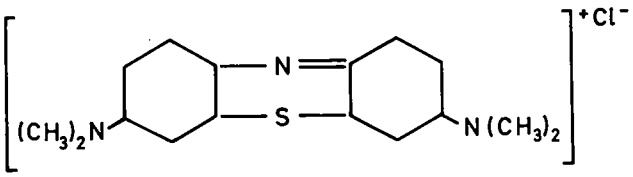


Krystalviolet

Opløseligheden ved 15°C er: 9% i H_2O, 8,75% i abs. alkohol og 0 i xylen. Absorptionsmaximum er 590 nm. pH af en vandig opløsning er 6,6. Det anvendes som en 0,2% vandig opløsning med 3% anilin og 10% ætanol til Gram-farvning.

Metylenblåt

Metylenblåt er et basisk farvestof, som i iltet tilstand er blåt, mens det i reduceret tilstand er farveløst, hvorfor det også bruges som oxidations-reduktionsindikator. Molekylvægten er 320 og formlen er:



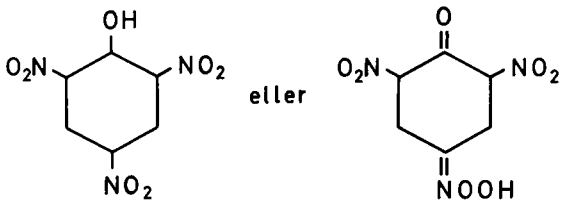
Metylenblåt

Karakteristisk for metylenblåt er, at det i opløsninger, som henstår, bliver delvis oxideret, så at disse opløsninger indeholder en del rødligt-violette farvestoffer af lavere metyleringsgrad end det originale metylenblåt. Disse polykromatiske egenskaber er værdifulde i mange tilfælde og søges ofte fremmet, fx. ved tilsætning af alkali som i Loeffler's metylenblåt.

Opløseligheden ved 15°C er: 1,3% i H_2O, 6% i abs. alkohol og 0 i xylen. Absorptionsmaximum er 665 nm. pH af en vandig opløsning er 2,5. Anvendes som en 1% vandig opløsning til simpel farvning.

Pikrinsyre

Pikrinsyre er et gult, surt (anjonisk) farvestof med molekylvægten 229. Formlen er:



Pikrinsyre

Opløseligheden ved 15°C er: 1,2% i H_2O, 9% i abs. alkohol og 10% i xylen. Absorptionsmaximum er 400 nm. pH af en vandig opløsning er 1,35. Det er et generelt cytoplasmafarvestof og derfor velegnet som baggrundsfarve til kontrast for farvestoffer, der farver kærner eller bakterier, og som sådan bruges det som en 0,75% vandig opløsning ved Ziehl-Neelsen-farvning.

d) Bejdser

Bejdser er stoffer, der danner uopløselige forbindelser med farvestoffer og fikserer dem til det materiale, som skal farves. De tilsættes i reglen før, sjældnere samtidig med og sjældent efter farvestoffet. Som bejdser anvendes fx. *let hydrolyserbare salte*, især sulfater og dobbeltsulfater (aluner), af trivalente metaller (fx. aluminium-, jern-, krom- og blysalte), der giver surt pH i vandig opløsning. Metaljonen er afgørende for bindingen, som formentlig finder sted til sure grupper i væv, især fosfat i nukleinsyrer og carboxylgrupper i proteiner (Baker 1960). Antagelig er det samme slags bindinger, der binder metaljonen komplekst til farvestoffet. En anden slags bejdse er *tannin* (garvesyre), som på grund af sine sure grupper bindes til proteiners basiske grupper

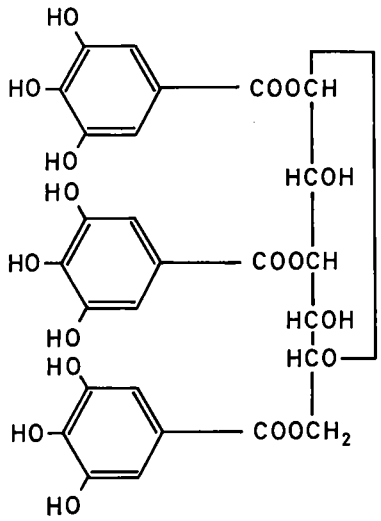
og til basiske farvestoffer. I Gram-farvningen anvendes jodjodkalium (IIK) som bejdse, idet det danner tungt opløselige komplekser med de anvendte basiske farvestoffer. Til en given opgave kan flere forskellige bejdser sommetider anvendes, men de giver ikke altid lige gode resultater. Stort overskud af bejdse i opløsning kan fjerne farvestof, der allerede ved bejdse er bundet til vævskomponenter (Baker 1960).

Jod

Jod anvendes som opløsninger i kaliumjodid (KI), da det er meget tungt opløseligt i H_2O. Ved tilstedeværelse af KI kan større mængder jod opløses, idet der indstiller sig en ligevægt: $I_2 + I^- \rightleftarrows I_3^-$. Jod er et meget brugt farvestof, fx. blandt parasitologer og histologer, men i det bakteriologiske laboratorium anvendes det først og fremmest som bejdse i Gram-farvningen, idet det danner tungt opløselige komplekser med krystalviolet i molekyleforholdet 2:1 og 1:1. Formlen er I_2. Atomvægten er 127. Opløseligheden ved 15°C er: 0 i H_2O, 15% i abs. alkohol og 20% i xylen. Anvendes som en vandig opløsning indeholdende 0,33% jod og 0,67% kaliumjodid til Gram-farvning.

Tannin

Tannin = gallusgarvesyre er et glykosid, som ved hydrolyse danner gallussyre (3,4,5-trihydroxybenzoesyre) og glukose. Det er meget let opløseligt i H_2O og i abs. alkohol. Den kemiske formel er kompleks, og nedenstående formel er for det specielle tannin corilagin:



Tanninet Corilagin

Tannin anvendes til flagelfarvning i en 3% vandig opløsning, som lige før brugen blandes med lige dele 1,2% basisk fuksin i 95% alkohol og 1,5% NaCl i vand. Herved dannes et tannin-fuksin kompleks, som præcipiterer og bindes til flagellerne, når alkoholen fordamper.

e) Differentieringsmidler (affarvningsmidler)
Differentieringsmidler er væsker, som opløser og fjerner overskud af farvestoffer, der ikke er bundet af de specifikt farvede strukturer i et præparat. I bakteriologiske laboratorier anvendes almindelige opløsningsmidler: H_2O, ætanol, metanol, acetone og syrer. Flere af dem kan erstatte hinanden, omend de ikke altid giver lige gode resultater. Basiske farvestoffer kan fjernes med syrer, og sure farvestoffer med baser. Ætanol og andre organiske opløsningsmidler nedsætter farvestoffernes joniseringstendens, og hvis farvestofferne samtidig er opløselige i ætanol, kan de derved lettere fjernes. I almindelighed er forskellen i affarvbarhed mellem forskellige celler og cellebestanddele derfor kvantitativ og altså bl.a. afhængig af affarvningsmidlets koncentration, affarvningstiden og pH (Bartholomew & Mittwer 1952; Baker 1960). Vaskeprocedurer med H_2O mellem de forskellige trin i en farvemetode skal i nogle tilfælde undgås eller være af kort varighed (5 sekunder), idet vand også er et affarvningsmiddel, hvis farvestoffet er vandopløseligt. Farvestofopløsninger, ja selv overskud af bejdser, kan som ovenfor anført også fungere som affarvningsmidler for farvestoffer, der tidligere er påført præparatet.

3) Fremstilling og fiksering af præparater til farvning

Objektglas og dækglas
Koch og senere andre bakteriologer fremstillede farvede præparater på dækglas. Neisser gik i 1878 over til at fremstille de farvede bakteriologiske præparater på objektglas (se Neisser 1889).

Det almindelige optiske udstyr på mikroskoper idag er beregnet til 0,8–1,0 mm tykke objektglas og 0,13–0,16 mm tykke dækglas. Standardstørrelse for objektglas er 76 x 26 mm og for dækglas 18 x 18 mm. Objektglas til ufarvede præparater og til præparater, der skal farves enten med metylenblåt eller med Grams eller Ziehl-Neelsens metode, kan som regel benyttes som de leveres fra fabrikken uden yderligere rensning, såfremt de opbevares i en lukket æske, og berøring med fingrene af overfladen undgås. En lettere rensning (affedtning) kan om nødvendigt foretages ved pudsning med 95% alkohol. Dækglassene behøver som regel ingen rensning, men kan bruges som de leveres fra fabrikken.

Objektglas, der skal anvendes til flagelfarvning, kræver en meget omhyggelig rensning. Først vaskes de med sulfosæbe, skylles i 95% alkohol og henstilles i kromsvovlsyre i mindst 4 dage. De skylles derefter godt under rindende vand og henstår mindst 1 time i destilleret eller dejoniseret vand (man skal være opmærksom på, at destilleret og især dejoniseret vand kan indeholde gramneg. stave som kan genfindes på glassene), hvorefter de lufttørres ved at blive stillet på højkant oven på et lag sugende cellestof. Glassene opbevares efter rensningen i lukket kasse og må kun håndteres med pincet. Umiddelbart før brugen flamberes de på den side, hvor præparatet skal være, i en *farveløs* gasflamme.

Fremstilling af tørpræparater til generel farvning, Gram- og Ziehl-Neelsen farvning

a) Hvis udgangsmaterialet er en kultur, fremstilles en svagt turbid bakteriesupension ved at opslemme lidt kolonimateriale fra et fast substrat i destilleret vand eller ved at udtage en øsefuld direkte fra en flydende kultur. Sidstnævnte er dog ikke altid tilfredsstillende, dels fordi bestanddelene fra nogle substrater forhindrer bakterierne i at hæfte sig på objektglasset, dels fordi substratbestanddele kan interferere med farvningen. En lille dråbe svagt turbid bakteriesuspension anbringes på objektglasset og spredes så tyndt som muligt ved hjælp af en steril øse. Formålet er at opnå et én-cellelag og en celletæthed på ca. 100 pr. synsfelt uden tætte hobe (1000 x forstørring). Spredningen foretages forsigtigt for at bevare cellernes naturlige indbyrdes arrangement, og præparatet lægges derefter til lufttørring. Afkortning af lufttørringstiden ved opvarmning af objektglasset over gasflamme er risikabel, da for høj temperatur af vandig suspension kan deformere cellernes udseende. Fysisk overlast i form af ridsning med andre glas eller lignende skal undgås, da mekanisk ødelæggelse af cellevæggen kan forvanske farvbarheden.

b) Hvis udgangsmaterialet er flydende biologisk prøvemateriale, afhænger fremgangsmåden af dettes art. I nogle tilfælde, hvor materialet er tyndtflydende og bakterietætheden lille (fx. spinalvæske), vil man søge at koncentrere bakterierne i et bundfald ved hjælp af centrifugering. Drejer det sig om tyktflydende materiale (fx. ekspektorat), fremstiller man et præparat direkte fra materialet. I alle tilfælde vil man ved udstrygningen stræbe efter at få et enkelt cellelag.

c) Hvis udgangsmaterialet er fast biologisk prøvemateriale (væv), kan man fremstille et aftrykspræparat af en frisk snitflade, men helst bør man findele og homogenisere enten hele materialet eller en del af det, fx. i en steril morter, og fremstille et udstrygningspræparat af homogenatet. Herved vil vævets arkitektur dog blive ødelagt, så hvis man ønsker oplysninger herom, må man

fremstille snitpræparater på mikrotom af frosne præparater eller af paraffin-indlejrede præparater. Bakteriefarvning af sidstnævnte slags præparater skal omtales nærmere, da de kræver speciel behandling.

Behandling af formalin-fikserede, paraffin-indlejrede præparater
Såfremt formalin-fikserede, paraffin-indlejrede vævspræparater skal farves til bakteriepåvisning, må paraffinen først fjernes og præparatet rehydreres. Efter farvningen skal det igen dehydreres og monteres med eukitt og dækglas, da det ellers glider af, når der kommer olie på.

Fremgangsmåde (Cruickshank 1969): (1) Xylen 5–10 min. (2) Xylenen fjernes med lidt abs. alkohol (ætanol), hvorved præparatet bliver uigennemsigtigt. (3) Der skylles forsigtigt med lidt 50% alkohol og vaskes forsigtigt i dest. H_2O, hvorefter præparatet er klar til farvning. Efter farvning og efterfølgende vask med vand fjernes overskud af vand med filtrerpapir, og præparatet behandles straks med nogle få dråber 95% alkohol og derefter med abs. alkohol. Overskud af alkohol fjernes rundt om præparatet, nogle få ekstra dråber alkohol hældes på, og præparatet klares ved neddypning i xylen. Overskud af xylen fjernes med filtrerpapir omkring præparatet, der monteres med eukitt og dækglas. Det er vigtigt, at præparatet ikke på noget tidspunkt tørrer ind, og at dehydreringen med abs. alkohol er komplet.

Hvis bakterierne er lette at affarve med alkohol, bør man anvende anilin-xylen (2+1) til dehydrering, og dette fjernes derefter ved afskylning med xylen; til sidst eukitt og dækglas.

Fiksering af præparater
Formålet med en fikseringsprocedure er at hæfte bakteriecellerne fast til objektglasset og bevare cellernes naturlige struktur bedst muligt. Fikseringen forhindrer opsvulmning eller skrumpning, opløsning eller forvridning af cellerne, inaktiverer autolytiske enzymer og gør derved vævet eller cellerne modstandsdygtige over for senere behandling. Man skelner mellem koagulerende (denaturerende) og ikke-koagulerende fikseringsmetoder (Baker 1960). De kemiske fiksationsmidler, som danner et koagel af proteiner, vil mikroskopisk omdanne homogent protoplasma til et netværk. Til de koagulerende metoder hører fx. varmefiksering (ca. 80–90°C ved proteinernes isoelektriske punkt) og ætanol- eller metanolfiksering, som muligvis virker ved at dehydratisere proteiner. Til de ikke-koagulerende metoder hører fx. formaldehyd, som virker ved at bindes til aminogrupper i proteiners peptidkæder. Herved blokeres basiske grupper i proteinerne, så affiniteten for sure farvestoffer falder meget, mens affiniteten for basiske farvestoffer er uændret.

Blandt de almindeligste kemiske fiksationsmidler, som også af og til bruges i bakteriologiske laboratorier, er koncentreret ætanol eller metanol eller 10% formalin (= 4% formaldehyd) i 15 min. (se Bennedsen 1969). 10% formalin tilsættes ofte en fysiologisk koncentration af NaCl for at undgå skrumpningsfænomener (fx. 83 ml dest. H_2O + 7 ml 10% NaCl + 10 ml formalin). Andre metoder og virkningsmekanismer er omtalt af Baker (1960) og Hopwood (1969). Almindeligvis bruges dog i det bakteriologiske laboratorium varme (flammefiksering) til at fiksere præparater på objektglas. Dette giver nogen celledeformering, men fjerner intet fra cellerne. Den gængse måde er at føre det lufttørrede præparat med præparatsiden opad tre gange hurtigt gennem en gasflamme, idet hver passage tager ca. 1 sekund. Efter en korrekt flammefiksering skal bagsiden af glasset kunne holdes mod huden på håndryggen uden at fremkalde smerte. For kraftig opvarmning kan ødelægge præparatet og forandre cellernes farvbarhed (Bartholomew & Mittwer 1952; Magee et al. 1975). Til præcise målinger af cellestørrelse og -form bør andre fiksationsmetoder end varme benyttes.

Referencer: se referencelisten efter kapitel 5.

Kapitel 2

Metylenblåtfarvning

1. Historisk indledning

Koch's generelle farvemetode (1877) videreudvikledes af Loeffler (1884, 1886), som til farvning anvendte enten alkoholisk metylenblåt eller gentianaviolet, eller fuksin i alkalisk vandig opløsning og til fjernelse af farverester behandling med 0,5% eddikesyre. Herved farvedes almindelige bakterier og cellekærner hurtigt og stærkt. Modifikationer af Loeffler's metode til generel farvning af bakterier er stadig meget anvendt.

2. Biokemisk baggrund

Det basiske farvestof metylenblåt bindes til sure grupper i cellekærner og bakterier. Efter afskylning af overskydende farvestof er cellekærnerne i vævsceller og gramneg. og grampos. bakterier – ekstracellulære såvel som intracellulære – blåfarvede, mens cytoplasma i vævsceller, syrealkoholfaste bakterier og proteinpræcipitater på objektglas ikke er blevet farvet.

Den generelle farvning med metylenblåt, som findes i mange modifikationer, er meget benyttet i bakteriologiske laboratorier. I de forskellige modifikationer bruges en vandig opløsning af farvestoffet, som i nogle tilfælde er tilsat alkohol og eventuelt gjort basisk med KOH for at opnå en mere intensiv farvning på kortere tid (Loeffler 1884, 1886).

3. Valg af metode

I diagnoseafdelingen på Seruminstituttet anvendes en vandig opløsning af metylenblåt uden yderligere tilsætning.

4. Teknisk udførelse

Reagens: 1% vandig opløsning af metylenblåt. Opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg ved stuetemperatur. Holdbarhed: mindst 1 måned.

Udførelse: Det varmefikserede tørpræparat overhældes med farvevæsken og henstår i 3 min., hvorefter overskydende farvestof afskylles med vandhanevand, indtil der ikke afgår mere farvestof (få sekunder). Aftrykkes dernæst med filtrerpapir. Risiko for over- eller underfarvning ved ændrede farvetider er ringe.

Mikroskopi: Præparatet oplyser om mængde, størrelse, form og indbyrdes lejring af bakterier samt tilstedeværelse af mørkere metakromatiske granula i disse. Desuden får man oplysning om mængde af hvide blodlegemer og andre vævsceller og disses art, så vidt det kan bedømmes ud fra kærnernes morfologi. Da eukaryotiske cellers cytoplasma ikke farves, kan intracellulært beliggende (fagocyterede) bakterier også ses.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen specielle. Brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand eller 2% Bacillotox® og kasseres. Om brugt filtrerpapir se under *Gram-farvning*.

6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Farvning med metylenblåt anvendes som et vigtigt supplement til Gram-farvning ved mikroskopi af spinalvæske, pus og andet biologisk materiale, idet således farvede præparater giver oplysning både om hvide blodlegemer og andre vævsceller og bakterier, mens erytrocytter i reglen er lyseret. Det skal anføres, at et metylenblåt-farvet præparat efter fjernelse af olien med xylen i nødsfald kan gramfarves med brugbart resultat; dog skal alkoholdifferentieringen i så fald udstrækkes til 1 min. (Thomsen 1917).

Referencer: se referencelisten efter kapitel 5.

Kapitel 3

Gram-farvning

1. Historisk indledning

Denne, den vigtigste bakteriologiske farvemetode, udvikledes af danskeren Gram (1884) under et ophold hos Friedländer i Berlin. Grams metode blev oprindelig udviklet til at påvise kokker i snitpræparater af lungevæv fra pneumonipatienter.

Gram havde arbejdet på at lave en dobbeltfarvning af nyresnit med anilin-gentianaviolet og jod for at opnå blå kærner og brune urincylindre, og han observerede tilfældigt, at de anilin-gentianaviolet-farvede præparater, som ellers vanskeligt affarvedes af alkohol, blev fuldstændigt affarvet af alkohol efter forudgående behandling med en jod-jodkalium-opløsning. På baggrund af disse observationer udarbejdede Gram sin berømte farvemetode, som fik kokkerne, der forårsagede lungebetændelse, til at fremtræde stærkere farvet end ved nogen tidligere metode, mens kærner og andre vævselementer blev affarvet af alkoholen; det var den første farvemetode, hvor kærner og bakterier ikke farvedes samtidigt (Unna 1888). Grams farveprocedure varede 15 min. og bestod i en farvning med Ehrlich's anilin-gentiana-opløsning (eller fuksin), efterfulgt af bejdsning med en vandig opløsning af jod-jodkalium kaldet Lugol's opløsning, som var almindeligt brugt til farvning blandt bakteriologer og botanikere på den tid (cit. fra Hucker & Conn 1923), og en affarvning med absolut alkohol. Gram fandt, at en række forskellige bakterier derved blev farvet sortrøde, mens andre som fx. tyfusbakterier affarvedes, men ligesom vævselementer kunne synliggøres ved hjælp af kontrastefterfarvning med fx. Bismarck-brunt eller vesuvin. Den lange farvetid der efter Koch (1882) krævedes til TB-bakterier nødvendiggjorde ved gramfarvning af disse ligeledes en farvetid på 12–24 timer. Gram omtalte ikke den taxonomiske betydning af sin farvemetode, men dens differential-diagnostiske muligheder blev i hvert fald hurtigt erkendt (Hueppe 1885 og en række forfattere i 1886, cit. fra Austrian 1960 og Bartholomew & Mittwer 1952). Omkring århundredskiftet blev metoden søgt standardiseret med henblik på anvendelse som pålideligt middel i species-differentieringen (Neide 1904).

Grams farvemetode er blevet modificeret af mange, bl.a. Weigert (1887) og Nicolle (1895), ved anvendelse af forskellige farvestoffer (fx. karbolsyre-gentianaviolet, krystalviolet og metylviolet), forskellige affarvningsmidler til differentiering mellem grampos. og -neg. bakterier (absolut alkohol, absolut alkohol + 5% salpetersyre, metylalkohol, acetone, alkoholacetoneblanding, xylen i anilinolie) og forskellige kontrastfarvestoffer (fx. fuksin og neutralrødt). Den udformning, som i en kun lidt ændret form bruges i dag på Seruminstituttet, er beskrevet i 1912 af Vilhelm Jensen.

I 1923 foretog Hucker & Conn en sammenligning af de mange forskellige modifikationer af metoden og konkluderede, at de to bedste var Atkin's og Hucker's, som begge indeholder lidt bejdse i farvevæsken og bruger alkohol til affarvning. Hucker's metode anvendes stadigvæk meget i USA, mens Lillie's metode (1928) med acetone til affarvning benyttes af mange i England (Cowan 1974).

2. Biokemisk baggrund

I korte og stærkt forenklede træk sker der antagelig følgende under de forskellige trin i Grams farvemetode: Det basiske farvestof krystalviolet bindes til sure grupper i bakterieceller. Med krystalviolet danner jod-molekyler sortblå præcipitater, som i gramneg. bakterier igen lader sig udtrække med 95% alkohol, mens de forbliver i grampos. bakterier. De affarvede gramneg. bakterier farves pany ved en efterfarvning med karbolfuksin. Trods næsten 100 års forskning er der dog ikke opnået fuld enighed om mekanismen ved Grams farvemetode. I det følgende skal de enkelte trin og de vigtigste teorier gennemgås. Der henvises i øvrigt til arbejder af Bartholomew & Mittwer (1952), Wensinck & Boevé (1957), Salton (1961, 1963) og Biswas et al. (1970).

Indledningsvis skal det understreges, at ingen af de traditionelt anvendte reagenser er specifikke for Gram-differentieringen, idet ethvert farvestof og enhver bejdse kan anvendes, hvis farvestoffet farver cellen tilstrækkeligt intenst, og hvis blot farve-bejdse-præcipitatet er dårligt opløseligt i alkohol og relativt uopløseligt i kontrastfarve-opløsningen (Bartholomew & Mittwer 1951). Også selve farveprocedurens trin kan afkortes og modificeres til to trin (Scales 1922; Adams 1975) eller trinene forkortes drastisk, så hele proceduren kun tager 15–20 sekunder mod normalt 3–4 min. (Norris & Swain 1971).

Farvning med krystalviolet

Gram anvendte oprindelig gentianaviolet eller fuksin; siden er der brugt metylviolet, krystalviolet og mange andre basiske farvestoffer, som kan præcipitere i et kompleks med jod. Sure farvestoffer kan ikke anvendes. Krystal-

violet er mere stabilt, veldefineret og ensartet end de tidligere benyttede farvestoffer (Bartholomew & Mittwer 1950). pH i farvevæsken skal være basisk. Bejdse (fx. ammoniumoxalat) i farvevæsken gør affarvningstiden mindre kritisk (Hucker & Conn 1923). Bartholomew (1962) foretrækker relativt høje koncentrationer af krystalviolet (≧ 2%), da affarvningstiden ellers bliver kritisk snæver. Han opnår samme resultat med de anvendte gramneg. og grampos. bakterier med farvetider fra 15 sekunder til 5 min., hvorfor 1 min. er udmærket. Wensinck & Boevé (1957), som undersøgte Gram-farvningen kvantitativt, fandt ved anvendelse af levende *E. coli* og *S. aureus* i suspensioner, at grampos. og -neg. bakterier optog samme mængder krystalviolet, og at optagelsen hos begge arter viste samme pH-afhængighed.

Bejdsning med jod

Gram anvendte Lugol's IIK. Kun enkelte andre stoffer som brom og pikrinsyre kan erstatte jod, men ingen af dem er så velegnede som dette (Mittwer et al. 1950). Et stofs evne til at erstatte jod i Gram-farvningen er korreleret med dets evne til med et farvestof at give præcipitater, som kun er dårligt opløselige i alkohol og relativt uopløselige i den vandige kontrastfarve-opløsning. IIK bliver surt ved henstand, hvilket kompromitterer dets funktion, og derfor anvender nogle basisk jodopløsning. IIK er kun holdbart i kort tid; hvis flasken står åben og temperaturen er 25°C, kan mængden af reaktivt jod falde til 40% af det oprindelige på 30 dage. Af den grund er stabile jodoforer med held benyttet af Magee et al. (1975) til Gram-farvning. Med øget jodkoncentration (op til 1% i en vandig IIK-opløsning) øges spillerummet for affarvningstidens varighed. Der opnås samme resultat med jodbehandling fra 15 sek. op til 5 min., og 1 min. er derfor udmærket (Bartholomew 1962). Wensinck & Boevé (1957) fandt, at farvestofjodkomplekserne dannes i det molekylære forhold 1:1-1:2, og det er samme slags komplekser ved gramneg.- og -pos. bakterier.

Differentiering (affarvning) med alkohol

Gram anvendte absolut alkohol (ætanol), men 95% alkohol er lige så godt, mens yderligt faldende koncentrationer giver tiltagende usikre resultater, og 60% alkohol giver ingen forskel på grampos. og -neg. bakterier. Det er derfor vigtigt, at alkohol og skyllevand ikke blandes sammen (Hucker & Conn 1923). For at opnå en tilfredsstillende affarvning må præparatet på intet tidspunkt blive tørt efter farvningen er begyndt, da affarvningstiden ellers stiger. Affarvningstiden falder med stigende temperatur (Bartholomew & Mittwer 1952; Bartholomew 1962; Tucker & Bartholomew 1962). Stigende alkoholopløselighed af farvestof-jod komplekser dannet af forskellige farvestoffer

giver aftagende differentiering mellem grampos. og -neg. bakterier (Bartholomew & Mittwer 1951). Anvendelse af andre alkoholer end ætanol som affarvningsmidler har været forsøgt, men jo højere alkoholen er, des langsommere affarver den. Metylalkohol affarver for hurtigt, og acetone affarver også meget hurtigt, men har været brugt med held (Lillie 1923). Langsommere affarvningsmidler har været forsøgt med vekslende held: kloroform, overfladeaktive stoffer, fortyndede syrer, alkohol-syreblandinger, natriumthiosulfat og saltopløsninger (Bartholomew & Mittwer 1952). Bartholomew (1962) foretrækker n-propylalkohol (som ikke nyder toldvæsenets bevågenhed), da den giver større spillerum for affarvningstiden end ætanol og især acetone. Med 95% ætanol og "fugtige" præparater (dvs. at de stadig er lidt fugtige efter afskylning af IIK) kan affarvningstiden for de anvendte grampos. og -neg. bakterier til korrekt differentiering varieres mellem 15 sek. og 3 min. Han anbefaler derfor $1\frac{1}{2}$ min. Vand i affarvningsmidlet (op til 20%) øger affarvningshastigheden og mindsker spillerummet. Lave koncentrationer af krystalviolet eller jod i affarvevæsken kan ved nogle procedurer forlænge affarvningstiden og øge spillerummet for affarvningstiden (Bartholomew 1962). Wensinck og Boevé (1957) har vist, at Gram-differentiering også kan foretages på levende, ikke-fikserede *S. aureus* og *E. coli* i opløsninger der først er farvet med krystalviolet. Efter farvning af grampos.- og -neg. bakterier med krystalviolet medfører behandling med alkohol samme grad af affarvning, men hvis bakterierne efter krystalviolet-farvningen har været jodbehandlede, afgiver de gramneg. bakterier en større mængde af krystalviolet-jod komplekset end grampos. Denne forskel opnås kun, når alkoholkoncentrationen ligger mellem 80 og 100%. Man kan vise, at kurven for kompleksets ekstraktion af gramneg. bakterier med forskellige alkoholkoncentrationer svarer til en kurve over krystalviolet-jodpræcipitaters opløselighed i forskellige ætanolkoncentrationer, og det tyder på, at ætanol passerer frit gennem væggen i gramneg. bakterier. Fra grampos. bakterier ekstraheres ved lave alkoholkoncentrationer samme mængde af komplekset som fra gramneg. bakterier, men ved højere koncentrationer af alkohol indtræder en brat ændring, idet den ekstraherede mængde fra de grampos. bakterier bliver meget mindre. Forsøgene tyder på, at forskellen mellem grampos.- og -neg. bakterier ligger i, at koncentreret alkohol har vanskeligere ved at trænge ind i de grampos. end i de gramneg. bakterier.

Efterfarvning (kontrastfarvning) med karbolfuksin

Gram anvendte Bismarck-brunt eller vesuvin. Siden har man anvendt fuksin, neutralrødt eller, som foretrukket af Hucker & Conn (1923) og Bartholomew (1962), safranin. Stigende opløselighed i kontrastfarveopløsningen af farvestof-jod komplekset giver aftagende differentiering mellem grampos.- og

-neg. bakterier (Bartholomew & Mittwer 1951). 'Replacement'-effekten af kontrastfarven er proportional med dennes koncentration og af kontrastfarvetiden, så disse to faktorer må standardiseres i overensstemmelse hermed (Bartholomew & Mittwer 1952): kontrastfarvning med 0,25% safranin kan erstatte jod-farvestof komplekset i grampos. bakterier på ½ time. En efterfarvningstid på 1 min. anbefales af Bartholomew & Mittwer (1951). Afskylning af overskydende kontrastfarve med vand bør være kortvarig (5 sek.), da farven hurtigt vaskes ud (Bartholomew 1962).

Vaskeprocedurer mellem de enkelte trin i Gram-farvningen

Gram anvendte ikke skylning med vand mellem de enkelte trin i sin farvemetode, og mange bruger kun afskylning med vand efter alkoholaffarvningen og efter kontrastfarvningen. Bartholomew (1962) har undersøgt betydningen af vandafskylning mellem de enkelte trin, og hans konklusioner gengives her: Overskydende krystalviolet vaskes af med vand for at undgå jod-farvestof-præcipitater på objektglasset. Man risikerer herved affarvning af grampos. bakterier, men ikke ved skylning i 5-15 sek., som er tilstrækkeligt. Vask efter jodbejdsningen er risikofrit, da jod-farvestof komplekset er langsomt udvaskeligt. Efter affarvning med alkohol er skylning med vand igen risikabelt, dels fordi meget af jod-farvestof komplekset er fjernet af alkoholen, dels fordi en blanding af alkohol med vand affarver hurtigere end koncentreret alkohol, men 5 sekunders afskylning er risikofrit. Afskylning af kontrastfarven med vand bør ligeledes være kort, da kontrastfarven hurtigt vaskes ud, hvorved gramneg. bakterier bliver usædvanligt små eller blege. 5 sek. er også her risikofrit. Afskylningerne kan foretages ved at dyppe objektglasset 5 sek. i rindende vand i et kar, men kan også udføres ved at holde glasset under en rindende vandhane i 5 sek. Bartholomew anbefaler afskylning med vand efter hvert trin efter de lige anførte regler.

Andre faktorer med indflydelse på Gram-farvningen

En bakteriearts Gram-farvbarhed afhænger af kulturens alder. Kraftigst grampositive er unge kulturer (< 24 timer), og efter 3 døgn har grampos. bakterier tendens til at blive gramnegative. Nogle få bakteriearter forholder sig dog omvendt. Det anbefales derfor at lave præparater af kulturer af varierende alder (12 timer og op til flere dage, og ved termofile bakterier allerede efter 6-8 timer) og at lave mindst 3 præparater fra hver kultur, men trods dette vil nogle arter (*Neisseria*) vise sig at være gramvariable (Hucker & Conn 1923). I prøvemateriale fra antibiotika-behandlede patienter kan grampos. bakteriers vægge være beskadigede, så de ved farvningen præsenterer sig som gramnegative. For kraftig varmefiksering får grampos. bakterier til at blive gramneg.

Tykke præparater er vanskelige at affarve, og store, tykke masser af bakterier skal undgås, når farveresultatet skal bedømmes. Fysisk kontakt af præparatet med hårde genstande, fx. kanten af et andet objektglas, forårsager arealer med gramneg. bakterier i et ellers grampos. præparat på grund af læsion af cellevæggene (Bartholomew & Mittwer 1952).

Teorier, der søger at forklare Gram-differentieringen

(1) Den kemiske teori: Grampos. bakterier besidder specifikke kemiske gramfarvbare substanser, som ikke findes i gramneg. bakterier.

(2) Isoelektrisk punkt-teorien: Grampos. bakterier har mere surt protoplasma, dvs. lavere isoelektrisk punkt, hvorfor de tilbageholder mere farvestof end gramneg. bakterier.

(3) Permeabilitetsteorien: Forskelle i grampos. og -neg. bakteriers cellevægges opbygning betinger særlige permeabilitetskarakteristika ved grampos. celler over for stoffer som alkohol, jod eller jod-farvestof-præcipitat.

(4) En underafdeling af den kemiske teori, som går ud på at grampos. bakterier har en særlig grampos. cortex.

Disse teorier er diskuteret af Bartholomew & Mittwer (1952), Wensinck & Boevé (1957), Salton (1961, 1962), Bartholomew (1962) og Biswas et al. (1970). Der er stærke eksperimentelle holdepunkter for, at permeabilitetsteorien er rigtig (Benians 1920; Burke et al. 1929; Wensinck & Boevé 1957; Salton 1961, 1962; Kandler & König 1978), mens lignende solid eksperimentel støtte ikke findes for de tre andre teorier. Saltons forklaring er, at gramneg. bakteriers cellevæg indeholder meget lipid, mens grampos. bakteriers cellevæg har et meget stort indhold af muco-peptid. Det sidste kunne føre til at grampos. cellevægge dehydreres under affarvningen, så farvestof-jod komplekset bliver vanskeligere tilgængeligt for alkohol. Der er i øvrigt en vis lighed i mekanismen ved Gram-farvning og Ziehl-Neelsen-farvning, og ved tilstrækkelig intensiv farvning fremstår tuberkelbakterier grampos., sådan som Gram viste det i 1884. Man kan også i nogle tilfælde efter en almindelig Gram-farvning se mykobakterier, som mere eller mindre kraftigt farvede grampos. stave; omvendt kan man ikke regne med altid at påvise mykobakterier ved en standard Gram-farvning.

Fysiologiske egenskaber korreleret til Gram-farvbarheden

En lang række fysiologiske egenskaber er korreleret til Gram-farvbarheden (Bartholomew & Mittwer 1952; Salton 1961, 1962). Her skal blot nævnes, at gramneg. bakterier er mere følsomme for plasmas lyserende effekt og for nogle kemikalier, fx. toluol, men mindre følsomme over for G-penicillin og krystalviolet end grampos. bakterier.

3. Valg af metode

På Seruminstituttet har vi i mange år brugt en modificeret udgave af Vilhelm Jensens metode fra 1912. På baggrund af de grundige undersøgelser foretaget af Hucker & Conn (1923) og Bartholomew (1962) må man nok erkende, at metoden kunne forbedres, omend gevinsten næppe vil blive stor. Indførelsen af jodofor i stedet for IIK (Magee et al. 1975) og anvendelse af hurtigmetoder i travle rutinelaboratorier (Norris & Swain 1971; Adams 1975) eller automatiske Gram-farvemaskiner (Ryan et al. 1973; Burdash et al. 1976) ville snarere lønne sig. Hurtigmetoder er allerede taget i brug i nogle af Seruminstituttets regionalafdelinger. Modificerede metoder til farvning af formalinfikserede paraffinsnit er bl.a. publiceret af Engbæk et al. (1977).

4. Teknisk udførelse

Reagenser

Krystalviolet til Gram-farvning: 0,2% krystalviolet, 3% anilin og 10% ætanol opløst i sterilt destilleret vand, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. pH skal være basisk, gerne 9,0. Holdbarhed ved stuetemperatur ca. 3–4 uger.

Jod-jodkalium 1+2+300: 0,33% jod + 0,67% kaliumjodid i dest. vand, opbevares i brun flaske med prop eller skruelåg. pH skal være basisk. Holdbarhed ca. 3–4 uger.

96% alkohol (ætanol): opbevares i klar flaske med slebet prop.

Karbolfuksin 1+9: 0,1% basisk fuksin, 1% ætanol og 0,5% fenol i dest. vand, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. Holdbarhed ca. 1 måned ved stuetemperatur.

Udførelse: Det varmefikserede tørpræparat overhældes med krystalviolet og henstår i 1 min. Krystalviolet afskylles med IIK og henstår med IIK i 1 min. IIK afskylles med alkohol og henstår i ca. 20 sek. under sagte vugning. Kort afskylning (ca. 5 sek.) af alkoholen under vandhane. Farvning med karbolfuksin i ½ min. Kortvarig afskylning (ca. 5 sek.) med vandhanevand. Aftrykning med filtrerpapir.

Mikroskopi: Gram-differentiering: grampos. bakterier er sortblå, gramneg. er røde.

Grampositiv, gramnegativ, gramvariabel, Gram-Dauer

Gram-differentiering repræsenterer en bred skala, hvor to organismer kan være snævert eller vidt adskilt. Grampos. betyder, at organismen beholder jod-farvestof komplekset og derfor stadig er sortblå efter affarvning (dif-

ferentiering) med alkohol. Gramneg. betyder, at organismen har mistet jodfarvestof-komplekset efter affarvningen og altså er farveløs. Konstrastfarven har intet med selve Gram-differentieringen at gøre. Gram-variabel betyder, at organismen er inkonstant i sin reaktion på Gram-differentieringen. Disse forhold afspejles også i udtrykket Gram-Dauer (Neide 1904), som er den tid der kræves for at affarve en mikroorganisme under standardiserede betingelser. Affarvningsendepunktet er imidlertid svært at etablere, da cellerne i en kultur ikke alle affarves samtidigt. Sommetider ses grampos. pletter i ellers gramneg. celler. Forklaringen kendes ikke, men sådanne grampos. intracellulære korn tager man ikke hensyn til ved vurdering af præparatet. Foruden Gram-differentieringen giver præparatet oplysninger om mængde, størrelse, form og indbyrdes lejring af bakterier. Derimod egner præparatet sig ikke godt til bedømmelse af andre slags celler, fx. hvide blodlegemer; her er farvning med metylenblåt bedre. Om Gram-farvning af tuberkelbakterier se afsnittet *Teorier der søger at forklare Gram-differentieringen, p. 32.*

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen specielle. Brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand eller 2% Bacillotox® og kasseres. Filtrerpapir til aftrykning af præparater smides i autoklavespand, *også* for at undgå at bakterier, der er blevet hængende i papiret, overføres til et nyt præparat, hvor de kan give anledning til forkerte resultater.

6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Gram-metoden anvendes til direkte farvning af prøvemateriale, inklusive vævssnit og til farvning af rendyrkede kulturer. En skelnen mellem grampos. og gramneg. egenskaber er tillige med erkendelsen af bakteriernes form og evne til svømmende bevægelse udgangspunktet for alle yderligere diagnostiske undersøgelser. Derfor kan en mislykket eller fejlvurderet Gram-farvning resultere i, at en diagnose ikke kan stilles. Det er derfor også en hovedregel, når en diagnose ikke kan stilles på grundlag af foreliggende data, at gentage Gram-farvningen med særlig omhu og med hensyntagen til alle de kendte forhold, der kan påvirke udfaldet. Hvad angår fejlkilder henvises til omtalen af de enkelte trin i farvemetoden under *Biokemisk baggrund.*

Om Gram-farvning af metylenblåt-farvede præparater se kapitel 2.

Referencer: se referencelisten efter kapitel 5.

Kapitel 4

Ziehl-Neelsen-farvning

1. Historisk indledning

Det var ikke lykkedes for Koch med hans generelle farvemetode i 1877 at påvise årsagen til tuberkulose. I 1882 offentliggjorde han en stor undersøgelse, hvor han i tuberkuløst væv regelmæssigt påviste en stavformet bakterie, der ikke kunne farves med de tidligere anvendte farvemetoder, men farvedes ved hjælp af en alkalisk opløsning af metylenblåt (de almindeligt brugte farveopløsninger var neturale eller sure) og en farvetid på næsten 1 døgn. I væv var bakterierne blå på brun baggrund efter kontrastfarvning med vesuvin. Ved opvarmning til 40°C kunne farvetiden dog afkortes til $\frac{1}{2}$-1 time.

Koch's metode til TB-farvning blev kort tid efter forbedret af Ehrlich (1882), som benyttede alkoholisk fuksin eller metylviolet i vandig opløsning mættet med anilinolie. Herved kunne farvetiden nedsættes til $\frac{1}{4}$-$\frac{1}{2}$ time. Ehrlich anvendte affarvning med salpetersyre og kontrastfarvning med gult eller blåt farvestof.

Ziehl (1882, 1883) modificerede Ehrlich's metode, idet han anvendte metylviolet eller metylgrønt og senere også fuksin i en karbolsyre-opløsning, og han viste desuden, at farvningen sker meget hurtigere ved højere temperatur. Neelsen (1883) brugte fuksin i en karbolsyre-opløsning og affarvning med 25% svovlsyre, og siden har hovedmetoden til farvning af TB-bakterier heddet Ziehl-Neelsen's metode (Bishop & Neumann 1970).

I Danmark indførte K.A. Jensen (1925) Bender's modifikation (1921, 1922) af Ziehl-Neelsen-farvningen med anvendelse af pikrinsyre som kontrastfarve, og med små ændringer har denne metode siden været brugt her i landet (Jensen 1954; Engbæk et al. 1969).

Ziehl-Neelsen's farvemetode er modificeret af bl.a. Randolph & Neekel (1944), Muller & Chermock (1945), Aubert (1950), Gross (1952) og Pottz et al. (1964) ved tilsætning af opløsningsmidler eller detergenser til karbolfuksinet, hvorved opvarmning under farvningen kunne undlades, uden at farvetiden forlængedes ("kold Ziehl-Neelsen").

2. Biokemisk baggrund

I korte, forenklede træk sker der følgende under de forskellige trin i Ziehl-Neelsen's farvemetode: Det basiske røde farvestof fuksin bindes til sure grupper i bakteriecellen, men for at tuberkelbakterier skal kunne optage farvestoffet kræves særlige forholdsregler: koncentreret fuksin tilsat fenol (karbol) og opvarmning under farvningen. Ved den efterfølgende intensive affarvning med fortyndet syre og 95% alkohol bevarer de syre-alkoholfaste tuberkelbakterier farvestoffet, mens andre bakterier og celler affarves. For at lette mikroskoperingen gør man det affarvede væv synligt med en let kontrastfarvning med fx. det gule, sure farvestof pikrinsyre, der især farver cytoplasma. Andre kontrastfarver som metylenblåt eller malakitgrønt bruges også, men er angiveligt pikrinsyren underlegne (Bender 1921, 1922; Jensen 1925).

Årsagen til syrefastheden, som i reglen ledsages af alkoholfasthed, er blevet udforsket intensivt. Koch (1882), Ehrlich (1882) og senere forfattere har vist, at mykobakterier ikke farves ved almindelige farvemetoder, men kræver basisk pH eller tilsætning af fenol eller detergenser, lange farvetider, højere farvestofkoncentration eller opvarmning for at blive farvede. Til gengæld modstår mykobakterier derefter energiske affarvningsforsøg med fortyndede syrer og alkohol. Ehrlich (1882) mente, at dette skyldtes egenskaber ved cellevæggen, og Koch viste i samarbejde med Proskauer (Koch 1897), at syre-alkoholfastheden skyldtes lipider i cellerne.

Senere har mange forskere arbejdet med at analysere mykobakteriernes cellevæg og deres lipidindhold og har bekræftet og forenet Ehrlich's og Koch's teorier (Bullock & McLeod 1904; Tamura 1913; Anderson 1932; Yegian & Vanderlinde 1947; Kotani et al. 1959; Takeya et al. 1963, Murohashi et al. 1969; Lederer 1971; Goren 1972). 20–40% af tørvægten af mykobakterier udgøres af lipid og 60% af cellevæggens tørstof er lipid, hvilket er langt mere end i andre bakterier. Det inderste lag af cellevæggen i mykobakterier er meget rigidt, indeholder ikke ret meget lipid og ligner grampos. bakteriers cellevæg, mens resten af cellevæggen mere ligner gramneg. bakteriers cellevæg, dog med et meget højere lipidindhold (Takeya et al. 1963). Kun intakte celler er syrefaste, og mekanisk beskadigelse af cellevæggen får cellerne til at miste syrefastheden (Yegian & Porter 1944; Murohashi et al. 1969). Med trinvis ekstraktion af lipider fra intakte celler reduceres syrefastheden gradvis og forsvinder, når bundet lipid er ekstraheret (Murohashi et al. 1969).

Blandt lipiderne i mykobakterier har især voksarterne (estere af højere fede syrer med alkoholer med lange kæder) været relateret til syrefastheden, og blandt disse er mykolsyre, som kun er fundet i cellevæggen hos slægterne *Mycobacterium* og *Nocardia* samt hos nogle corynebakterier, som derfor også

er syrefaste. Den sandsynligste forklaring på syre- og alkoholfastheden er formentlig den fysiske struktur af mykobakteriers cellevæg, hvis indhold af lipid i tæt kombination med andre stoffer udgør en barriere for farvning og affarvning af bakteriecellen (Murohashi et al. 1969).

3. Valg af metode

Foruden den klassiske Ziehl-Neelsen-farvemetode, der benytter sig af opvarmning for at afkorte farvetiden, er der udviklet "kolde" Ziehl-Neelsen-metoder, hvor der i stedet tilsættes et detergens til karbolfuksinet (se *Historisk indledning*) og hvor affarvning og kontrastfarvning foregår i eet trin (Pottz et al. 1964). Endvidere er der udviklet en "strip"-metode, hvor der benyttes karbolfuksin-imprægnerede filtrerpapirstykker (Varughese et al. 1974), samt farvemetoder der bygger på et helt andet farveprincip, nemlig farvning med fluorescerende farvestoffer (se fx. Bennedsen & Olesen Larsen 1966), og disse metoder har kunnet automatiseres (Clancey et al. 1976; Heimer et al.1978). De modificerede metoder har deres store berettigelse i laboratorier, hvor man har mange undersøgelser for tuberkelbakterier. I almindelige klinisk-mikrobiologiske laboratorier står man sig ved at anvende den simple, gennemprøvede Ziehl-Neelsen-metode, som ikke kræver særlig ekspertise eller udstyr (Jensen 1954; Engbæk et al. 1969), og som også kan benyttes til histologiske vævssnit (Jensen 1954; Greenwood & Fox 1973). Tilsætning af fortyndinger af BCG-vaccine til mukopurulent sputum har været anvendt som kontrol af en syre-alkoholfast farveteknik (Pybus 1974).

4. Teknisk udførelse

K.A. Jensens metode beskrevet i 1954, modificeret lidt af Engbæk et al. (1969): "Dansk Ziehl-Neelsen"

Reagenser

"Karbolfuksin (conc.)": 1% basisk fuksin, 5% fenol, 10% ætanol i dest. H_2O, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. Holdbarhed: måneder.

25% svovlsyre

96% alkohol (ætanol)

0,75% pikrinsyre i dest. H_2O, opbevares i mørk flaske med prop eller skruelåg. Holdbarhed: måneder.

Udførelse

Det varmefikserede tørpræparat dækkes med filtrerpapir, som overhældes med 1% karbolfuksin. Med Bunsen-brænder eller på varmeplade (75°C) holdes temperaturen netop under kogepunktet i 3 min. (præparatet damper). Afskylning under vandhane.

Affarvning: 25% svovlsyre i 3 min., afskylning under vandhane, 25% svovlsyre igen i 3 min. og afskylning under vandhane, 96% alkohol i 3 min., afskylning under vandhane, 25% svovlsyre i få sek., afskylning under vandhane. Kontrastfarvning med 0,75% pikrinsyre i 15 sek. Afskylning under vandhane.

Tørring af præparatet: nyt filtrerpapir til hver præparat for at undgå overførsel af tuberkelbakterier til næste præparat. Af samme grund bør farveskåle ikke benyttes.

Mikroskopi: Syre-alkoholfaste bakterier er røde, mens alt andet farves gult. Tuberkelbakterier ser ofte kornede ud (Much-granula) eller kan indeholde kugleformede legemer, der opdriver cellen. Dette skyldes formentlig artefakts på grund af farvningen, men der hersker ikke fuld enighed herom (Porter & Yegian 1945; Lamanna 1946; Mudd et al. 1951). Mekanisk beskadigelse af præparatet ved udstrygning eller skæring med mikrotom giver arealer med ikke-syrefaste bakterier i et ellers syrefast præparat (Yegian & Porter 1944).

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ved fremstilling af præparater fra prøvemateriale, der kan indeholde tuberkelbakterier, skal der på grund af smitterisikoen udvises særlig forsigtighed. Stinkskabe eller steril-bænk med udsug bør altid anvendes. Brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand og kasseres. Om brugt filtrerpapir se under *Udførelse* og under *Gram-farvning*.

6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Ziehl-Neelsen-farvning anvendes ved direkte mikroskopisk undersøgelse af biologisk materiale for indhold af syre-alkoholfaste bakterier. Da bakterierne ofte er til stede i ringe mængde, skal præparatet gennemsøges grundigt, mindst 25 synsfelter ved 800 x forstørrelse spredt over hele præparatet (Engbæk et al. 1969). Farvemetoden har taxonomisk værdi, da kun slægterne *Mycobacterium* og *Nocardia* samt enkelte corynebakterier, bakteriesporer og svampesporer er syrefaste; mykobakterier dog i betydelig højere grad end de øvrige. For de øvriges vedkommende og for *M. leprae* anvendes derfor en modificeret udgave af Ziehl-Neelsens metode uden affarvning med alkohol og evt. med mere fortyndet syre og kortere affarvningstid (Cruickshank 1969).

Referencer: se referencelisten efter kapitel 5.

Kapitel 5

Flagelfarvning

1. Historisk indledning

I 1889 og 1890 offentliggjorde Loeffler en ny metode til at farve bakterier og især deres svingtråde. Duske af svingtråde fra nogle bakterier havde kunnet farves med Koch's metode, men de enkelte svingtråde havde ikke kunnet erkendes. Loeffler's nye princip bestod i en bejdsning før farvningen, et princip som længe havde været brugt ved farvning af tekstil. Loeffler bejdsede præparatet med en vandig opløsning af tannin, ferrosulfat og Campeche-træafkog efterfulgt af farvning med en svagt alkalisk anilinopløsning af metylenblåt eller fuksin eller metylviolet. På denne måde kunne de tynde svingtråde gøres tilstrækkeligt tykke til at blive synlige i lysmikroskopet.

Loeffler's flagelfarvning blev forbedret af Zettnow (1899), som indførte bedre bejdser (jernoxydbejdse, kieselguhr-bejdse, antimonbejdse) og farvning af præparaterne med guld- eller sølvsalte, der udfældedes som metallisk guld og sølv på bakterierne og deres bejdsede svingtråde. En modificeret og forenklet metode indførte Plimmer & Paine (1921), idet de anvendte en opløsning med bejdse og farvestof samtidigt. Et lignende princip er videreudviklet af Leifson (1930, 1938, 1951, 1960, 1961), og hans metode anvendes stadigvæk i diagnoseafdelingen på Seruminstituttet, hvor den har afløst Zettnow's metode, der brugtes af Martin Kristensen (1955). En teknisk mere simpel metode byggende på farvning af fugtigt præparat er udarbejdet af Mayfield & Inniss (1977), men den har endnu ikke været rigtig gennemprøvet på Seruminstituttet. I det følgende omtales kun Leifson's metode til flagelfarvning.

2. Biokemisk baggrund

De fleste bakteriesvingtråde har en diameter på 0,01–0,03 μm, dvs. de skal gøres ca. 10 gange tykkere for at kunne ses i lysmikroskop. Denne fortykkelse opnås ved anvendelse af bejdse foruden farvestof. Ved Leifson's metode anvendes en opløsning, der både indeholder det basiske farvestof, tannin som bejdse og NaCl som elektrolyt. Mellem det basiske farvestof og den sure bejdse dannes et kolloidt præcipitat, som er mere opløseligt i alkohol end i vand, hvorfor

komponenterne er opløst i 33% alkohol, som ved denne koncentration lige netop forhindrer, at tannin–fuksin komplekset præcipiterer. Når farvevæsken hældes på præparatet, fordamper alkoholen hurtigere end vand, hvorfor tannin–fuksin komplekset præcipiterer, når alkoholkoncentrationen er kommet ned på 20–25%, og bindes til flageller og cellelegemer. Elektrolyttens betydning er formentlig en effekt på den relative elektriske ladning på tannin–fuksin komplekset og på flagellen. Jo højere elektrolytkoncentration des tykkere flagel op til en NaCl–koncentration på 1%. Endnu højere NaCl–koncentration deformerer flagellerne. Tanninkoncentrationen er ikke særlig kritisk, men pH skal helst være 5,0 ± 0,2. Ved faldende pH ses stadigt tyndere flageller, mens stigende pH giver tiltagende tykke flageller. Andre basiske farvestoffer end fuksin kan også bruges.

I mange tilfælde farves både cellelegeme og flagel røde, i andre farves kun omridset af cellelegemet, og i andre igen farves cellelegemet slet ikke. I sidstnævnte tilfælde kan 1% metylenblåt anvendes som kontrastfarvning af cellerne (Leifson 1951, 1960).

Bakterierne dyrkes på bouillon–agarplade, andet fast medium eller i tryptonbouillon ved en temperatur, der er lavere end optimum for vækst, oftest 20 eller 30°C, hvor flagellerne udvikler sig bedst. Optimal flageldannelse ses i den logaritmiske og i begyndelsen af den stationære vækstfase; efter ophør af væksten kan flagellerne ødelægges hurtigere end resten af cellerne. Ved den sædvanlige inkubering ved 35°C natten over er bakterierne langt forbi den logaritmiske vækstfase og godt inde i den stationære fase. For lavt pH i dyrkningsmediet kan ødelægge flagellerne, og derfor bør substratet ikke indeholde forgærbare sukkerarter. Flydende medier giver ofte, men ikke altid, bedre flagellering end faste medier. Agar, som overføres med bakterierne til objektglasset, interfererer med farvningen. Fosfat synes at fremme flageludviklingen (Leifson 1960).

3. Valg af metode

Leifson's metode har i mange år været anvendt i diagnoseafdelingen som afløser for Zettnow's metode. For at opnå et tilfredsstillende resultat kræves først og fremmest et fuksinsalt, som har vist sig egnet til flagelfarvning (mange af de kommercielle præparater af fuksin er helt uegnede) dernæst kræves friske reagenser, meget grundigt rensede objektglas, omhu ved fremstilling af præparaterne samt øvelse. Tages der højde for disse faktorer, fungerer metoden udmærket. Mayfield & Inniss (1977) har udviklet en metode til flagelfarvning, som ikke kræver specielt rensede glas; den udføres på fugtigt præparat og er teknisk meget enkel. Indtil en sammenligning mellem denne og Leifson's metode foreligger, må sidstnævnte dog anbefales.

4. Teknisk udførelse

Leifson's metode til flagelfarvning (1951, 1960)

Reagenser

Specielt rensede objektglas (se afsnittet om objektglas og dækglas)

Basisk fuksin, 1,2% i 96% alkohol (ætanol)

Tannin 3% i dest. H_2O

NaCl 1,5% i dest. H_2O

Opbevares i køleskab i hver sin flaske.

Lige dele af de 3 væsker blandes lige før brugen, og blandingen er straks brugbar, men henstand til næste dag kan være en fordel. Der udvikles gradvis et præcipitat, som *ikke* må rystes op ved brug af farvevæsken. Opbevares i mørk flaske med skruelåg. Holdbarhed ved stuetemperatur 1 uge, i køleskab 1 måned, i dybfryser meget længere, men så skal farvevæsken blandes grundigt før brugen. Når en opløsnings farvetid er 5 min. længere end en frisk opløsnings, ialt omkring 15 min., bør den kasseres.

Tryptonbouillon til dyrkning af flagelbærende bakterier

Bacto-trypton Difco	0,5 %
Gærekstrakt	0,1 %
Sekundært kaliumfosfat (K_2HPO_4)	0,05%
Primært kaliumfosfat (KH_2PO_4)	0,05%

pH ca. 6,8.

Til vask efter centrifugering: redestilleret H_2O

Til fiksering: formalinstødpude pH 7,5: 20% formaldehyd i $\frac{1}{15}$ molær fosfatstødpude "Sørensen", pH 7,5.

Udførelse

Bakterierne dyrkes på fast substrat eller i tryptonbouillon ved 20°C (30°C) natten over og undersøges dernæst for bevægelighed ved mikroskopi af fugtigt præparat. I en bevægelig kultur skal altid findes flageller, ellers er farvningen mislykket, mens en ubevægelig kultur i meget sjældne tilfælde kan have flageller, som ikke er funktionsdygtige (Leifson 1960). Hvis bakterierne er dyrket i flydende substrat, sættes 0,6 ml 20% formaldehydstødpude til 5 ml kultur, dels for at dræbe kulturen, dels fordi nogle bakteriers flageller farves bedst efter formalinbehandling. Dernæst henstår kulturen i 15 min. ved 35°C, hvorefter den centrifugeres ned for fuld styrke (ca. 3000 *g*) og vaskes 2–4 gange med redestilleret vand. Med bundfaldet fra den flydende kultur eller med kultur direkte fra en agarplade (uden medfølgende substratbestanddele!) laves der en suspension, der er så tynd at man lige netop kan ane turbiditeten.

Ved suspension fra fast medium i redestilleret vand skal man undgå, at kulturmassen på podenålen gnides hårdt imod substratoverfladen eller mod glassets sider, fordi flagellerne afrives som i en kuglemølle, når cellerne kværnes mellem hinanden.

De specialrensede og tørrede objektglas flamberes med en farveløs gasflamme (gul flamme forurener glasset) på den side, hvor præparatet skal være, og opdeles i to halvdele med en tyk fedtblyantstreg. Glassene stilles skråt op ad fx. et reagensglasstativ, på filtrerpapir, og en dråbe bakteriesuspension sættes af med øse lige neden for stregen og et godt stykke inden for kanten, således at dråben af sig selv kan løbe ned ad glasset i lige bane; at den gør det er tegn på, at glasset er rent. Der er plads til to præparater ved siden af hinanden på hvert glas. Når præparatet er lufttørret, lægges glasset *uden* fiksering på det skrå farvestativ som giver glasset en svag hældning fra fedtstregen ned til enden af glasset, og 1 ml farvevæske afsættes med en stangpipette på overfladen. Husk, at bundfaldet i flasken ikke må oprystes, dvs. overskydende farve i pipetten må ikke hældes tilbage i flasken. Der dannes herved et farvevæskelag af stigende tykkelse fra fedtstregen ud mod enden af glasset, og i den tynde del af farvelaget vil der ske en hurtigere udfældning med tættere farveintensitet end i den tykkere del. Farvetiden varierer betydeligt efter farvevæsken og de ydre omstændigheder som temperatur og luftfugtighed. Man står sig ved at begynde med at fremstille 3 præparater, som farves henholdsvis 8, 10 og 12 min., hvorefter man tager bestik, indtil den optimale tid er fundet. Hvis farvelaget på objektglasset belyses med en koncentreret stærk lysstråle, kan man se når udfældningen sker og dermed fastslå når farvningen er færdig. Under farvningen dannes der fra glassets rand en metallignende hinde på farvevæskens overflade, og når den dækker hele overfladen, er yderligere forlængelse af farvetiden formålsløs.

Uden forudgående afhældning af farven foregår afskylningen med rindende vand ved hjælp af en stråle rettet direkte mod den farvedækkede del af glasset, så al farve på een gang sprøjtes af. En "langsom" afskylning, hvorved farven fra en ende af bortskylles, ødelægger med sikkerhed præparatet. Derefter lufttørring eller tørring med filtrerpapir. Kontrastfarvning er i reglen ikke nødvendig.

Mikroskopisk vurdering af flagelpræparater (Leifson 1951, 1961)

Ved undersøgelse af præparatet opsøges områder, hvor cellerne ikke ligger for tæt, da det ellers er umuligt med sikkerhed at bedømme flagellernes antal og arrangement på den enkelte celle. Man noterer sig antal flageller pr. celle, deres afgangssteder på cellen og bølgens amplitude og bredde. De forskellige bakterier karakteriseres efter deres flagellering på følgende måde, idet man

anvender et arbitrært index til at fastlægge grænsen mellem polært mono- og multitrike. Index er det tal, som angiver procenten af flagellerede celler med mere end 1 flagel pr. pol (Lautrop & Jessen 1964).

(1) Som polært monotrik karakteriseres bakterier som har et index $\leqq 10$.

(2) Som polært multitrik karakteriseres bakterier som har et index $\geqq 25$ (ved index-værdier mellem 10 og 25 kan bakterierne ikke karakteriseres med hensyn til flagelleringen uden nærmere undersøgelse, se Lautrop & Jessen 1964).

(3) Som peritrik karakteriseres bakterier hvor flagellerne udgår spredt fra alle sider af cellen.

(4) Som subpolært flagellerede karakteriseres bakterier hvor alle flagellerne – een eller flere – udgår tæt under polen ofte retvinklet på cellens hovedakse.

(5) Som mixed flagellerede karakteriseres bakterier som essentielt er polært flagellerede, men hvor der samtidigt er udviklet laterale flageller af en anden bølgebredde.

Individuel flagelmorfologi: Almindeligvis har flageller form som en helix; afstand fra bølgetop til bølgetop kaldes bølgebredden, og udslaget fra bølgedal til bølgetop kaldes amplituden (Leifson et al. 1955; Leifson 1960). En del særlige flageltyper har fået særlige navne: ved curling forstås at der optræder flageller med netop halvt så stor bølgelængde som de øvrige; ved coiling forstås at flagellernes ender krummer tilbage mod celleoverfladen, så flagellerne ligner en række løkker langs cellen; ved undulation er amplituden meget lille og bølgebredden som regel stor; næsten lige flageller uden bølger kan ses (Leifson & Hugh 1953; Leifson 1960). Leifson (1961) mener, at bortset fra curling fremkaldes disse varianter formentlig overvejende af formalinbehandlingen, men vore erfaringer tyder på, at medens coiling kan skyldes formalinbehandlingen før farvningen, er de øvrige varianter vist betinget af variationer i flagellinets bygning. Ofte ses afrevne frie flageller, især har peritrikt flagellerede bakterier tendens til at tabe flagellerne. Såkaldte pseudoflageller (Thjøtta & Kåss 1946) er enten sammensnoede hobe af fimbriae eller slim og andet materiale fra kulturerne, som organiserer sig som tråde der kan forveksles med flageller, men som regel kan skelnes fra disse ved, at de næsten altid mangler helixform og i det hele er af meget vekslende længde og udseende, modsat flagellernes ret ensartede præg i et givet præparat.

5. Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige; brugte præparatglas lægges i 3% fenolvand eller 2% Bacillotox® og kasseres.

6. Anvendelse og diagnostisk værdi

Den taxonomiske betydning af flagelantal og -arrangement og i mindre grad deres bølgebredde er stor ved species-diagnostik af gramnegative, oxidase-positive stavbakterier, mens flagelfarvning sjældnere giver diagnostisk værdifulde oplysninger inden for *Enterobacteriaceae* eller grampositive bakteriearter. En sikker adskillelse af polært monotrike og polært multitrike bakterier forudsætter i en del tilfælde en præcis tælling af flagellerne hos 50–100, fritliggende, tydeligt flagellerede bakterier for at bestemme flagelindex. En afgørelse alene baseret på et skøn forudsætter enten stor erfaring eller meget oplagte tilfælde.

Samlet referenceliste for kapitlerne 1-5

Adams, E.: Studies in Gram staining. Stain Technology *50*: 227, 1975.

Anderson, R.J.: The chemistry of the lipoids of tubercle bacili. Physiol. Rev. *12*: 166, 1932.

Aubert, E.: "Cold" stain for acid-fast bacteria. Canad. J. publ. Hlth *41*: 31, 1950.

Austrian, R.: The Gram stain and the etiology of lobar pneumonia, an historical note. Bact. Rev. *24*: 261, 1960.

Baker, J.R.: Cytological Technique. The principles underlying routine methods. John Wiley & Sons. Inc., New York, 1960.

Bartholomew, J.W. & Mittwer, T.: The mecanism of the Gram reaction. I. The specificity of the primary dye. Stain Technol. *25*: 103, 1950.

Bartholomew, J.W., Roberts, M.A. & Evans, E.E.: Dye exchange in bacterial cells, and the theory of staining. Stain Technol. *25*: 181, 1950.

Bartholomew, J.W. & Mittwer, T.: The mecanism of the Gram reaction. III. Solubilities of dye-iodine precipitates and further studies of primary dye substitutes. Stain Technol. *26*: 231, 1951.

Bartholomew, J.W. & Mittwer, T.: The Gram stain. Bact. Rev. *16*: 1, 1952.

Bartholomew, J.W.: Variables influencing results, and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. Stain Technol. *37*: 139, 1962.

Bender, W.: Zur Technik des Nachweises der Tuberkelbazillen in Sputum. Centralbl. Bakt. I. Abt. Orig. *86*: 461, 1921.

Bender, W.: Zur Turberkelbazillenfärbung, insbesondere zur Unterscheidung der tuberkelbazillenähnlichen Stäbchen. Dtsch. med. Wschr. *48*: 381, 1922.

Benians, T.H.C.: A further investigation into the principles underlying Gram's stain, with special reference to the bacterial cell membrane. J. Path. Bact. *23*: 401, 1920.

Bennedsen, J. & Olesen Larsen, S.: Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. Scand. J. resp. Dis. *47*: 114, 1966.

Bennedsen, J.: The specificity of circulating antibodies in experimental infections with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* demonstrated by immunoflourescence. Acta path. microbiol. scand. *76*: 245, 1969.

Billroth, Th. & Ehrlich, P.: Untersuchungen über Coccobacteria septica. Langenbecks Arch. Chir. *20*: 403, 1877.

Bishop, P.J. & Neumann, G.: The history of the Ziehl-Neelsen stain. Tubercle (Lond.) *51*: 196, 1970.

Biswas, B.B. & Basu, P.S.: Gram staining and its molecular mechanism. Int. Rev. Cytol. *29*: 1, 1970.

Bulloch, W. & Macleod, J.J.R.: The chemical constitution of the tubercle bacillus. J. Hyg. (Lond.) *4*: 1, 1904.

Burdash, N.M., West, M.E. & Bannister, E.R.: Automatic Gram-staining with the microstainer II. Hlth. Lab. Sci. *13*: 20, 1976.

Burke, V. & Barnes, M.W.: The cell wall and the Gram reaction. J. Bact. *18*: 69, 1929.

Clancey, J.K., Allen, B.W., Rogers, D.T., Smith, L.S., Aber, V. & Mitchison, D.A.: Comparison of machine and manual staining of direct smears for acid-fast bacilli by fluorescence microscopy. J. clin. Path. *29*: 931, 1976.

Collard, P.: The Development of Microbiology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1976.

Cowan, S.T.: Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge Univ. Press, 1974.

Cruickshank, R.: Medical Microbiology. A guide to the laboratory diagnosis and control of infection. 11th ed. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1969.

Culling, C.F.A.: Handbook of Histopathological Techniques. Butterworths, London 1963.

Ehrlich, P.: Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. Arch. mikr. Anat. 1877. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, New York, *I*: 19,1956).

Ehrlich, P.: Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Thesis, Leipzig 1878. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, New York, *I*: 29, 1956).

Ehrlich, P.: Über das Methylenblau und seine klinisch-bakterioskopische Verwerthung. Z. klin. Med. 1881. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, New York, *I*: 287, 1956).

Ehrlich, P.: Referate aus dem Verein für innere Medicin zu Berlin. Dtsche med. Wschr. *8*: 269, 1882.

Ehrlich, P.: Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. Charité-Ann. *11*: 123, 1886.

Engbæk, H.C., Bennedsen, J. & Olesen Larsen, S.: Comparison of various staining methods for demonstration of tubercle bacilli in sputum by direct microscopy. Bull. *42*, Int. Union against Tuberculosis, 1969, p. 94.

Engbæk, K., Stæhr Johansen, K. & Egholm Jensen, M.: Gramfarvning af bakterier i formalinfikseret paraffinsnit. En sammenligning af 5 metoder med en ny modifikation. Ugeskr. Læg. *139*: 2385, 1977.

Friedberger, E. & Reiter, H.: Das mikroskopische Präparat. I: Kolle, W. & von Wassermann, A. (eds.): Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bind I, Gustav Fisher, Jena 1912, p. 293.

Goeppert, H.R. & Cohn. F.: Ueber die Rotation des Zellinhaltes in *Nitella flexilis*. Bot.Ztg. *7*: 665, 681, 697, 713, 1849.

Goren, M.B.: Mycobacterial lipids: selected topics. Bact. Rev. *36*: 33, 1972.

Gram, C.: Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. Fortschr. Med. *2*: 185, 1884.

Greenwood, N. & Fox, H.: A comparison of methods for staining tubercle bacilli in histological sections. J. clin. Path. *26*: 253, 1973.

Grimme, A.: Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. Centralbl. Bakt. I. Abt. Orig. *32*: 1, 81, 161, 241, 321, 1902.

Gross, M.: Rapid staining of acid-fast bacteria. Amer. J. clin. Path. *22*: 1034, 1952.

Gurr, E.: Encyclopædia of Microscopic Stains. Leonard Hill Ltd., London 1960.

Gurr, E.: Staining Animal Tissues. Practical and Theoretical. Leonard Hill Ltd., London 1962.

Gurr, E.: The Rational Use of Dyes in Biology and General Staining Methods. Leonard Hill Ltd., London 1965.

Heimer, G.V., Joseph, N. & Taylor, C.E.D.: Staining clinical specimens for acid-fast bacilli by means of a mechanical conveyor system. J. clin. Path. *31*: 185, 1978.

Hoffmann, H.: Ueber Bacterien. Bot. Ztg, *27*: 233, 249, 265, 281, 305, 321, 1869.

Hopwood, D.: Fixatives and fixation: a review. Histochemical J. *1*: 323, 1969.

Hucker, G.J. & Conn, H.J.: Methods of Gram Staining. N.Y. Agric. Exp. Sta. Techn. Bull. No. 93, 1923.

Jensen, K.A.: Grundrids af den organiske kemi. J. Gjellerups Forlag, København 1964, p. 390.

Jensen, K.A.: Tuberkelbacillens Forekomst i Spinalvædsken undersøgt ved Dyrkning paa Petroff's Substrat. Ugeskr. Læg. *87*: 710, 1925.

Jensen, K.A.: Towards a standardisation of laboratory methods. Bull. int. Un. Tuberc. *24*: 78, 1954.

Jensen, V.: Om en Modifikation af Grams Farvning, særlig med Hensyn til Gonokokdiagnosen. Hospitalstidende *55*: 568, 1912.

Kandler, O. & König, H.: Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of Methanogenic bacteria. Arch. Microbiol. *118*: 141, 1978.

Koch, R.: Verfahren zur Untersuchung, zum Konservieren und Photographieren der Bakterien. Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen, *2*: 399, Breslau 1877, J.U. Kerns Verlag (Gesammelte Werke von Robert Koch, I. Band, p. 27, Leipzig 1912).

Koch, R.: Die Ätiologie der Tuberkulose. Berl. klin. Wschr. *19*: 221, 1882. (Gesammelte Werke von Robert Koch, I. Band, p. 428, Leipzig 1912).

Koch, R.: Ueber neue Tuberkulinpräparate. Dtsche med. Wschr. *23*: 209, 1897.

Kotani, S., Kitaura, T., Hirano, T. & Tanaka, A.: Isolation and chemical composition of the cell walls of BCG. Biken's J. *2*: 129, 1959.

Kristensen, M.: Zettnow's flagella staining as a routine method. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 111, p. 130, 1955.

Lamanna, C.: The nature of the acid-fast stain. J. Bact. *52*: 99, 1946.

Lautrop, H. & Jessen, O.: On the distinction between polar monotrichous and lophotrichous flagellation in green fluorescent pseudomonads. Acta path. microbiol. scand. *60*: 588, 1964.

Lechevalier, H.A. & Solotorovsky, M.: Three Centuries of Microbiology. Dover Publications, New York 1974.

Lederer, E.: The mycobacterial cell wall. Pure appl. Chem. *25*: 135, 1971.

Leifson, E.: A method of staining bacterial flagella and capsules together with a study of the origin of flagella. J. Bact. *20*: 203, 1930.

Leifson, E.: Staining of bacterial flagella. J. Bact. *36*: 656, 1938.

Leifson, E.: Staining, shape, and arrangement of bacterial flagella. J. Bact. *62*: 377, 1951.

Leifson, E. & Hugh, R.: Variation in shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bact. *65*: 263, 1953.

Leifson, E., Carhart, S.R. & Fulton, M.: Morphological characteristics of flagella of *Proteus* and related bacteria. J. Bact. *69*: 73, 1955.

Leifson, E.: Atlas of Bacterial Flagellation. Acad. Press, N.Y. and London, 1960.

Leifson, E.: The effect of formaldehyde on the shape of bacterial flagella. J. gen. Microbiol. *25*: 131, 1961.

Lillie, R.D.: The Gram stain I. A quick method for staining Gram-positive organisms in the tissues. Arch. Path. *5*: 828, 1928.

Loeffler, F.: Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte *2*: 421, 1884.

Loeffler, F.: Die Aetiologie der Rotzkrankheit. Arb. Gesundh.-Amte (Berl.) *I*: 141, 1886.

Loeffler, F.: Vorlesungen über die geschichtliche Entwickelung der Lehre von den Bacterien. Erster Theil bis zum Jahre 1878. Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig 1887.

Loeffler, F.: Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen, im besonderen ihrer Wimperhaare und Geisseln. Centralbl. Bakt. *6*: 209, 1889.

Loeffler, F.: Weitere Untersuchungen über die Beizung und Färbung der Geisseln bei den Bakterien. Centralbl. Bakt. *7*: 625, 1890.

Magee, C.M., Rodeheaver, G., Edgerton, M.T. & Edlich, R.F.: A more reliable Gram staining technic for diagnosis of surgical infections. Amer. J. Surg. *130*: 341, 1975.

Mayfield, C.I. & Inniss, W.E.: A rapid, simple method for staining bacterial flagella. Canad. J. Microbiol. *23*: 1311, 1977.

Mittwer, T., Bartholomew, J.W. & Kallman, B.J.: The mechanism of the Gram reaction. II. The Function of iodine in the Gram stain. Stain Technol. *25*: 169, 1950.

Mudd, S., Winterscheid, L.C., De Lamater, E.D. & Henderson, H.J.: Evidence suggesting that the granules of mycobacteria are mitochondria. J. Bact. *62*: 459, 1951.

Muller, H.E. & Chermock, R.L.: A rapid staining technique for acid-fast organisms. J. Lab. clin. Med. *30*: 169, 1945.

Murohashi, T., Kondo, E. & Yoshida, K.: The role of lipids in acid-fastness of mycobacteria. Amer. Rev. resp. Dis. *99*: 794, 1969.

Neelsen, F.: Ein casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centralbl. med. Wiss. *21*: 497, 1883.

Neide, E.: Die Alkoholentfärbung der nach Gram gefärbten Bakterien als Speciesdiagnose, in Verbindung mit einer Untersuchung der für die Gram-Färbung in Betracht kommenden Faktoren. Cbl. Bakt. I. Abt. Orig. *35*: 508, 1904.

Neisser, A.: Versuche über die Sporenbildung bei Xerosebacillen, Streptokokken und Choleraspirillen. Z. Hyg. Infekt. -Kr. *4*: 165, 1889.

Nicolle, M.: Pratique des colorations microbiennes (Méthode de Gram modifiée et méthode directe). Ann. Inst. Pasteur *9*: 664, 1895.

Norris, J.R. & Swain, H.: Staining bacteria. In: Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (eds.): Methods in Microbiology, vol. 5 A. Academie Press, N.Y. 1971, p. 105.

Plimmer. H.G. & Paine, S.G.: A new method for the staining of bacterial flagella. J. Path. Bact. *24*: 286, 1921.

Porter, K.R. & Yegian, D.: Some artifacts encountered in stained preparations of tubercle bacilli. II. Much granules and beads. J. Bact. *50*: 563, 1945.

Pottz, G.E., Rampey, J.H. & Benjamin, F.: A method for rapid staining of acid-fast bacteria in smears and sections of tissue. Amer. J. clin. Path. *42*: 552, 1964.

Pybus, A.: The use of BCG as a source of acid and alcohol fast bacilli for staining purposes. Ann. trop. Med. Parasit. *68*: 483, 1974.

Randolph, T.G. & Mikell, R.F.: Carbol fuchsin in propylene glycol for rapid staining of the tubercle bacillus. Amer. Rev. Tuberc. *49*: 109, 1944.

Ryan, R.W., Sedgwick, A.K. & Tilton, R.C.: Laboratory evaluation of an automatic Gram staining machine. Hlth Lab. Sci. *10*: 82, 1973.

Salomonsen, C.J.: Studier over Blodets Forraadnelse. G. Torsts Boghandel, Kjøbenhavn 1877.

Salomonsen, C.J.: Bakteriologisk Teknik for Medicinere. P.G. Philipsens Forlag, København 1894.

Salomonsen, C.J.: Carl Weigert (Nekrolog i Berliner klinische Wochen-schrift, nr. 35, 1904). i "Smaa-Arbejder", Kjøbenhavn 1917, p. 353.

Salton, M.R.J.: The anatomy of the bacterial surface. Bact. Rev. *25*: 77, 1961.

Salton, M.R.J.: The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain. J. gen. Microbiol. *30*: 223, 1963.

Scales, F.M.: A new method for differential staining of bacteria. J. infect. Dis. *31*: 494, 1922.

Takeya, K., Hisatsune, K. & Inoue, Y.: Mycobacterial cell walls. II. Chemical composition of the "basal layer". J. Bact. *85*: 24, 1963.

Tamura, S.: Zur Chemie der Bakterien. I. Mitteilung. Z. phys. Chemie *87*: 85, 1913.

Thomsen, Oluf: Farvning af Gonococcer og Meningococcer. I: Festskrift for Prof. C.J. Salomonsen, København 1917, p. 173. (Communications de l'Institut Serotherapique de l'Etat Danois, Tome IX, 1917).

Thjøtta, T. & Kåss, E.: Pseudo-flagella in bacteria. Acta path. microbiol. scand. *23*: 215, 1946.

Tucker, F.L. & Bartholomew, J.W.: Variations in the Gram staining results caused by air moisture. Stain Technol. *37*: 157, 1962.

Unna, P.G.: Die Entwicklung der Bakterienfärbung. Eine historisch-kritische Uebersicht. Centralbl. Bakt. *3*: 22, 61, 93, 120, 153, 189, 218, 254, 285, 312, 345, 1888.

Varughese, P., Helbecque, D.M., McRae, K.B. & Eidus, L.: Comparison of strip and Ziehl-Neelsen methods for Staining acid-fast bacteria. Bull. Wld. Hlth Org. *51*: 83, 1974.

Weigert, C.: Über eine Mykose bei einem neugeboreren Kinde. 53. Jahres-Bericht der Schlesischen Gesellschaft für Vaterländische Cultur 1875, p. 229. (G.P. Aderholz Buchhandlung 1876, Breslau).

Weigert, C.: Ueber eine neue Methode zur Färbung von Fibrin und von Microorganismen. Fortschr. Med. *5*: 228, 1887.

Wensinck, F. & Boevé, J.J.: Quantitative analysis of the Gram reaction. J. gen. Microbiol. *17*: 401, 1957.

Yegian, D. & Porter, K.R.: Some artifacts encountered in stained preparations of tubercle bacilli. I. Non-acid-fast forms arising from mechanical treatment. J. Bact. *48*: 83, 1944.

Yegian, D. & Vanderlinde, R.J.: The nature of acid-fastness. J. Bact. *54*: 777, 1947.

Zettnow, E.: Ueber Geisselfärbung bei Bakterien. Z. Hyg. Infekt.-Kr. *30*: 95, 1899.

Ziehl, F.: Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsche med. Wschr. *8*: 451, 1882.

Ziehl, F.: Ueber die Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsche med. Wschr. *9*: 247, 1883.