Aus dem Hygienischen Institut der Freien und Hansestadt Hamburg.
(Direktor: Prof. Dunbar.)

Zur Frage der bakteriologischen Diphtherie-Diagnose.

Von Stabsarzt Dr. H. Berlin, s. Z. kommandiert zum Institut.

Im Folgenden will ich über die Ergebnisse von Nachprüfungen einiger neuerer Methoden zum Nachweis von Diphtheriebazillen berichten, die ich, zum Teil in Gemeinschaft mit Dr. Gaehtgens, am hiesigen Institut ausgeführt habe. Die Untersuchungen fanden bereits im Sommer und Herbst 1913 statt, die Veröffentlichung konnte aus äußeren Gründen erst jetzt erfolgen.²⁾

In Nr. 11 dieser Wochenschrift (1913) hat Gins (1) eine Modifikation der Neisserschen Diphtheriebazillenfärbung angegeben, die darin besteht, daß zwischen die beiden Phasen der Neisser-Färbung eine 3—5 Sekunden währende Färbung mit Lugolscher Lösung, der 1 % Milchsäure zugesetzt ist, eingeschaltet wird.

Gins empfiehlt diese Färbemethode besonders für Originalausstriche von frischen diphtherieverdächtigen Rachenabstrichen. Die Vorteile derselben sollen darin bestehen, daß sich die äußere Form der Diphtheriebazillen deutlicher darstellt als bei der gewöhnlichen Doppelfärbung nach Neisser, ferner daß die Polkörner intensiver gefärbt und größer erscheinen. Vermöge dieser Vorzüge soll man bereits im Originalausstrichpräparat die Diphtheriebazillen mit weitaus größerer Sicherheit finden und damit die Diagnose „Diphtherie“ sicherer und schneller stellen können, ohne erst das Resultat der Kultur abwarten zu müssen, ein Vorteil, der für den Praktiker unzweifelhaft von großem Werte sein muß. Gins hat mit Hilfe seiner Färbemethode bei 59 % der später kulturell sich als positiv erweisenden Rachenabstriche bereits im Originalausstrich Diphtheriebazillen nachweisen können, während das bei der gewöhnlichen Neisserschen Färbung nur bei 29 %, also noch nicht bei der Hälfte, der Fall war.

Für meine Untersuchungen benutzte ich zunächst eine größere Anzahl Rachenabstriche, die mir von der Infektions-

¹⁾ Nachtrag. Bis zum Erscheinen dieser Arbeit sind mehrere Wochen verflossen. Inzwischen hat eine ununterbrochene Behandlung stattgefunden, bestehend aus Bädern sowie täglicher Massage der Extremitäten; daneben wurden die heißen Mutterlaugenbäder für Hände und Füße zweimal täglich fortgesetzt. Die Anfälle haben zwar an Intensität und Dauer abgenommen, kommen jedoch, wenn auch etwas seltener, immer wieder zum Vorschein. Die Behandlung wird zurzeit noch fortgesetzt.

²⁾ Das Manuskript ist bei der Redaktion am 27. VII. 14 eingegangen, konnte aber wegen der Kriegsverhältnisse (vgl. Nr. 14 S. 420) bisher nicht veröffentlicht werden. D. Red.

abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Eppendorf fremdstammigsten, bei welchen klinisch und bakteriologisch Diphtherie festgestellt war. Sodann verwandte ich das Material, das unserem Institut von Aerzten und Krankenhäusern zur Untersuchung eingesandt wurde, und zwar nahm ich nur die Fälle, die unter Diphtherieverdacht, nicht aber auch die, die unter Keimträgerverdacht eingeliefert waren. Es wurden von jedem Rachenabstrich außer der Löfflerserumplatte jedesmal zwei Objektträgerpräparate angefertigt, von denen das eine dann nach Neisser, das andere nach Gins gefärbt wurde.

Die Ergebnisse gestalteten sich folgendermaßen: Von den 50 aus dem Eppendorfer Krankenhause stammenden, von sicheren Diphtheriefällen herrührenden Abstrichen waren kulturell (auf Löfflerserum) 49 positiv, 1, vermutlich von einem schon in Rekonvaleszenz befindlichen Patienten, negativ. Von den mit diesem Material hergestellten Originalausstrichen waren bei Färbung nach Neisser 28 positiv (= 57,1 %), bei Ginsscher Färbung dagegen nur 13 (= 26,5 %). Die andere Gruppe von Untersuchungen, also das uns zur bakteriologischen Diagnose eingesandte diphtherieverdächtige Material, umfaßt 273 Fälle. Hiervon erwiesen sich 100 kulturell als positiv. In den Originalausstrichen von diesen 100 positiven Fällen wurden mit Neisserscher Färbung bei 48 Fällen Diphtheriebazillen nachgewiesen (= 48 %), mit der Ginsschen Modifikation jedoch nur bei 38 Fällen (= 38 %). Und zwar waren von diesen positiv nach beiden Färbemethoden 31; nur nach der Neisserschen positiv, nach der Ginsschen Methode dagegen negativ 17, während umgekehrt nach Gins positiv und nach Neisser negativ 7 waren.

Ich habe also ein wesentlich anderes Resultat erhalten als Gins, der ja, wie oben erwähnt, 59 % positive Resultate hatte gegenüber nur 29 % nach der Neisserschen Methode. Um bei der Untersuchung von denselben Voraussetzungen auszugehen wie Gins, habe auch ich nur dann den Befund als positiv bezeichnet, wenn eine gewisse Anzahl, nicht etwa nur vereinzelte, typisch geformter und gelagerter Diphtheriebazillen mit zwei deutlichen Polkörnern aufgefunden wurden. Auch die übrigen von Gins aufgeführten Vorteile seiner Färbung möchte ich nicht unbedingt bestätigen. Die Polkörner erschienen ja wohl bei einer Reihe von Exemplaren größer und intensiver dunkel gefärbt, jedoch traf das längst nicht bei allen zu; und daß die äußere Form der Diphtheriebazillen sich irgendwie anders dargestellt hätte als bei der Neisserschen Färbung, ist mir ebenfalls nicht aufgefallen. Im Gegenteil habe ich den Eindruck gewonnen, daß das ganze Bild des Präparates schöner und die Kontrastfärbung ausgesprochener wird nach der Neisserschen Methode, weil hier der Gegensatz zwischen den dunkeln Polkörnern und den goldgelben Bazillenleibern erheblich schärfer wird als bei der Färbung nach Gins, die an Stelle des schönen, leuchtenden Goldgelb einen mehr trüben, graubraunen bis gelbbraunen Farbenton liefert.

Mein Urteil geht somit dahin, daß die Ginssche Modifikation der Diphtheriebazillenfärbung für die Diagnose aus Originalausstrichpräparaten keinen Vorteil bedeutet gegenüber der bewährten Doppelfärbung nach Neisser, daß sie ihr vielmehr unterlegen ist. Daß aber ein negativer Befund im Originalausstrich nichts besagt, sondern daß für die Diagnose „Diphtherie“ schließlich der Ausfall der Kultur maßgebend ist, darin pflichte ich Gins selbstverständlich vollkommen bei.

Von anderen Untersuchern, die sich mit der Nachprüfung der Ginsschen Färbung beschäftigt haben, konnten Gilde-meister und Günther (2) die Ueberlegenheit dieser Methode gegenüber der Neisserschen bei der Beurteilung von Originalausstrichen bestätigen, während Böttcher (3) gleich mir in dem Ginsschen Verfahren keine Verbesserung erblicken konnte.

Weitere Nachprüfungen erstreckten sich auf das von Conradi (4) angegebene Verfahren zur elektiven Züchtung von Diphtheriebazillen.

Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, daß infolge des Unterschiedes in der Oberflächenspannung zwischen den von einer fettkörperhaltigen Membran umgebenen Diphtheriebazillen und wäßrigen Medien die Diphtheriebazillen beim Ausschütteln mit einem Kohlenwasserstoff an den Tropfen derselben haften bleiben und vermöge des geringeren spezifischen Gewichtes mit an die Oberfläche gerissen werden, von wo aus sie dann leicht auf Kulturplatten übertragen werden können. Andere, nicht von einer d-artigen Membran umgebene Keime bleiben dagegen in der unteren Schicht zurück, sodaß eine Trennung der Diphtheriebazillen von den übrigen Mikroorganismen erfolgen kann. Diese Methode ist unter Verwendung von Ligroin bereits früher von Lange und Nitsche (5) zur Tuberkelbazillen-anreicherung angegeben und seine Anwendungsmöglichkeit auch auf Diphtheriebazillen kurz gestreift worden. Conradi hat auf Grund obiger Tatsachen folgende Methode zur elektiven Züchtung von Diphtheriebazillen ausgearbeitet: Der Wattetupfer mit dem Rachenabstrich wird eine Viertelstunde in einem Reagenzglas mit 10 ccm erwärmter NaCl-Lösung gehalten und dann darin ausgeschüttelt, darauf werden 2 ccm Pentan bzw. Petroläther hinzugefügt, das Röhrchen mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen und kräftig durchgeschüttelt. Nachdem man dann einige Minuten gewartet hat, bis sich Kochsalzlösung und Pentan getrennt haben, führt man ein steriles Oelstäbchen in die obenauf schwimmende Pentanschicht und entnimmt damit die in dieser befindlichen Diphtheriebazillen, um sie sodann auf der Kulturplatte auszustreichen. Die Oelstäbchen werden in der Weise hergestellt, daß am Ende eines dünnen Holzstäbchens etwa kleinfingerdick und 3 cm hoch in Form einer Halbkugel ein Wattebausch befestigt wird, der mit einer kleinen Scheib-Filterpapier umgeben wird. Die Stäbchen werden sterilisiert und vor dem jedesmaligen Gebrauch mit dem mit Watte-armierten Ende in steriles Olivenöl getaucht. Werden die so präparierten Stäbchen in die Pentanschicht des Reagenzglases getaucht, so wird das Pentan von der Watte aufgesogen, während die in der Pentanschicht befindlichen Keime an dem geölten und deshalb bakterien-dichten Filterpapier hängen bleiben.

Nach Conradi's Angaben gelingt es auf diese Weise, nur die Diphtheriebazillen auf die Kulturplatte zu übertragen, während die übrigen Bakterien in der Kochsalzschicht zurückbleiben, sodaß bei Vorhandensein von Diphtheriebazillen nur diese Keime wachsen, oder aber, wenn keine Diphtherie vorliegt, die Platte nahezu steril bleibt.

Bei der Nachprüfung dieser Züchtungsmethode haben wir zunächst eine Anzahl Abstriche von sicheren, klinisch und bereits bakteriologisch festgestellten Diphtheriefällen, die uns ebenfalls vom Eppendorfer Krankenhause lebens-würdigerweise zur Verfügung gestellt worden waren, nach Conradi's Angaben behandelt. Es waren dies 72 Fälle. Von jedem Abstrich wurde außerdem zum Vergleich eine Kultur auf Löfflerserum in der gewöhnlichen Weise angelegt.

Die Aussaat der an den Oelstäbchen haftenden Keime erfolgte, wie auch bei allen unseren sonstigen Diphtherieuntersuchungen, ebenfalls auf Löfflerserum. Nachdem wir an diesen Fällen die Brauch-barkeit des Conradi'schen Verfahrens erprobt hatten, wandten wir dieses auch auf das uns zur bakteriologischen Diagnose eingesandte laufende Material an, indem stets natürlich außerdem zum Vergleich auch eine Kultur in der sonst üblichen Weise auf Löfflerserum angelegt wurde. Die Kulturen wurden stets am folgenden Tage, die negativen auch am zweiten Tage noch einmal untersucht. Die Färbung der Präparate erfolgte mit der gewöhnlichen Neisserschen Doppelfärbung. Bei einem Teil der aus dem Eppendorfer Krankenhause erhaltenen Abstriche haben wir zur Ausschüttelung außer Pentan auf Dr. Gaeh-tgens Vorschlag auch Ligroin (Siedepunkt bis zu 36°) verwandt, indem wir die etwas reichlicher bemessene Kochsalzaufschwemmung teilten. Wir wollten dadurch feststellen, ob nicht ein anderer, erheblich billigerer Kohlenwasserstoff dieselben Dienste leistet wie das sehr teure Pentan. (1 kg Pentan kostet 9,50 M., Ligroin nur 0,70 M.) Nachdem wir uns an 52 Fällen überzeugt hatten, daß die Wirkung des Ligroins der des Pentans in keiner Weise nachstand, und diese vergleichenden Untersuchungen auch noch auf eine Anzahl Fälle unseres laufenden Materials ausgedehnt hatten und zu demselben Resultat gekommen waren, benutzten wir in der Folgezeit für die weiteren Untersuchungen nur noch das Ligroin.

Unsere Ergebnisse verhalten sich im einzelnen folgender-maßen:

Uebersichtstabelle.

1. 72 sichere Diphtheriefälle.

Direkter Ausstrich positiv:	Pentanverfahren positiv:
60 = 83.3 %	67 = 93 %
1. Tag : 56. 2. Tag : 4.	1. Tag : 65. 2. Tag : 2.

Darunter 52 Fälle (sichere Diphtherie) mit Ligroin behandelt:
 Direkter Ausstrich positiv: 43 = 82,7 %
 Pentan positiv: 47 = 90,4 %
 Ligroin positiv: 49 = 94,2 %

1. Tag: 39. 2. Tag: 4. 1. Tag: 45. 2. Tag: 2. 1. Tag: 47. 2. Tag: 2.

2. 180 gemischte Fälle.

Direkter Ausstrich positiv:
 52 = 28,9 %

Ligroinverfahren positiv:
 74 = 41,1 %

1. Tag: 47. 2. Tag: 5.

1. Tag: 62. 2. Tag: 12.

Also: 1. Sichere Diphtherien (Material aus Eppendorf) im ganzen 72 Fälle: Davon kulturell positiv mit dem gewöhnlichen Züchtungsverfahren 60 Fälle = 83,3 % (56 am ersten, 4 am zweiten Tage); nach dem Conradischen Pentanverfahren positiv 67 Fälle = 93 % (am ersten Tage 65, am zweiten Tage 2). Unter diesen 72 Fällen wurden bei 52 Abstrichen Paralleluntersuchungen mit Pentan und Ligroin gemacht, diese ergaben: gewöhnliches Verfahren positiv 43 (39 am ersten, 4 am zweiten Tage), Pentanverfahren positiv 47 (45 am ersten, 2 am zweiten Tage), Ligroinverfahren 49 positiv (47 am ersten, 2 am zweiten Tage). Daraus ergibt sich, daß die Conradische Methode, was das kulturelle Resultat anbetrifft, der gewöhnlichen, direkten Ausstrichmethode überlegen ist und daß, bei Benutzung von Ligroin an Stelle des Pentans, dies Ergebnis noch etwas besser wird. Bei den negativen Fällen handelte es sich vermutlich um bereits in Rekonvaleszenz befindliche Patienten.

2. Gemischte Fälle (laufendes eingesandtes Material), im ganzen 180 Abstriche: Davon kulturell positiv bei gewöhnlichem Ausstrich auf Löfflermedium 52 Fälle = 28,9 % (47 am ersten, 5 am zweiten Tage), bei Anwendung des Ligroinverfahrens positiv 74 Fälle = 41,1 % (62 am ersten, 12 am zweiten Tage). Dabei sei bemerkt, daß bei den ersten 10 von diesen 180 Fällen noch vergleichende Untersuchungen mit Pentan und Ligroin angestellt wurden, die ein übereinstimmendes Ergebnis hatten, nämlich 5 positive und 5 negative Fälle, während bei einfachem Ausstrich nur 4 positiv waren. Die übrigen 170 Abstriche sind nur noch mit Ligroin ausgeschüttelt worden. Wenn auch mit Hilfe des Conradischen Verfahrens wesentlich mehr positive Befunde erzielt wurden, so hatten wir doch einige Fälle (6), die nur bei einfachem Ausstrich auf Löfflermedium positiv waren, dagegen mit dem Ligroinverfahren ein negatives Resultat ergaben; andererseits war aber bei 28 Fällen der Befund nur mit dem Ligroinverfahren positiv, im gewöhnlichen Ausstrich negativ.

Als Schlußergebnis unserer Untersuchungen können wir also sagen, daß das von Conradi angegebene Verfahren zur Züchtung von Diphtheriebazillen mittels Ausschüttelung mit Kohlenwasserstoff auch bei gemischtem Material nicht unwesentlich bessere Resultate liefert als das einfache Ausstreichen der infizierten Wattebäusche auf Löfflermedium, denn wir hatten 41,1 % positive Befunde gegenüber nur 28,9 % bei dem gewöhnlichen Verfahren, also ein Mehr von 12,2 %. Diesem Vorteil steht jedoch der große Nachteil gegenüber, daß die Methode sehr umständlich und zeitraubend ist, sodaß ihre Anwendung in einem großen Betriebe außerordentliche Schwierigkeiten stößt.

Auf einen Punkt sei aber hier noch aufmerksam gemacht: Conradi behauptet, daß alle oder fast alle Begleitbakterien in der Kochsalzschicht zurückgehalten werden, sodaß auf der Kulturplatte bei positiven Fällen nur Diphtheriecolonien wachsen oder in negativen Fällen die Platte nahezu steril bleibt. Diese Angaben können wir nicht bestätigen. Wir haben nur sehr vereinzelte Platten mit Diphtheriereinkultur gefunden, die meisten waren verunreinigt, meist mit Staphylokokken, wenn auch vielleicht nicht in dem Grade, wie bei direktem Ausstrich. Ebenso war es bei den negativen Fällen; hier fanden sich fast stets mehr oder weniger reichliche Kulturen verschiedener Bakterien, sterile oder nahezu sterile Platten dagegen trafen wir nur ganz vereinzelt. Von einer elektiven Züchtung kann man daher eigentlich wohl nicht sprechen. Hervorgehoben sei an dieser Stelle noch der Wert der Unter-

suchung diphtherieverdächtiger Kulturen auch am zweiten Tage, worauf Trautmann und Gaeltgens (6) besonders hingewiesen haben. Dadurch ist es uns gelungen, wie aus der obigen Tabelle ersichtlich, bei einer Reihe von Fällen, die nach 24 Stunden negativ waren, nach weiteren 24 Stunden noch Diphtherie nachzuweisen. Diese Beobachtung wird auch von Neisser und Schuster (7) bestätigt.

Die Resultate anderer Autoren, die das Conradische Verfahren einer Nachprüfung unterzogen haben, lassen manche Differenzen erkennen. Rhodovi (8) hat um 12 % schlechtere Ergebnisse gehabt als mit dem direkten Ausstrichverfahren, und hinsichtlich der Begleitbakterien fand er, daß wohl eine gewisse Zurückhaltung derselben stattfand, daß aber noch in einer sehr großen Zahl von Fällen Staphylokokken mehr oder weniger zahlreich auf den Platten erschienen. Orkin (9) fand häufig Reinkulturen von Diphtherie oder fast sterile Platten, oft aber auch Reinkulturen von Staphylokokken. Schulze (10) erkennt die Conradische Methode dem direkten Ausstrichverfahren als etwas überlegen an, betont aber die Kostspieligkeit und die Umständlichkeit, die die Einführung in größere Betriebe verbietet. Reinkulturen von Diphtherie bzw. sterile Platten hat auch er nur bei einem kleineren Teile seiner Fälle gesehen. Neisser und Schuster (7) können keinerlei Vorteile in dem Conradischen Verfahren erblicken, und Böttcher (3) bezeichnet die damit erzielten Resultate in Anbetracht der Umständlichkeit des Verfahrens als recht mäßig; auch er konnte sich nicht entschließen, dasselbe in dem ihm unterstellten Untersuchungsamt einzuführen.

Nach allem scheint es, als ob Conradi's Verfahren trotz seiner unbestreitbaren Vorzüge sich nicht so bald Eingang in die Praxis verschaffen wird.

Zusammenfassung. 1. Die Färbung der Diphtherieoriginalausstriche nach Gins ist der Neisserschen Färbung nicht überlegen.

2. Die von Conradi angegebene Methode zur elektiven Züchtung von Diphtheriebazillen liefert bessere Resultate als der direkte Ausstrich auf Löfflermedium, wir fanden einen Unterschied von über 12 % zugunsten des Conradischen Verfahrens.

3. An Stelle des teuren Pentans leistet das viel billigere Ligroin dieselben Dienste.

4. Das Verfahren ist jedoch zu umständlich und zeitraubend, um in einem größeren praktischen Betriebe eingeführt zu werden.

5. Reinkulturen von Diphtherie bzw. sterile Platten erhält man mit dem Conradischen Verfahren nur selten, in den meisten Fällen werden die Begleitbakterien nicht oder nur teilweise zurückgehalten.

6. Von Wichtigkeit ist die Untersuchung diphtherieverdächtiger Kulturen, die nach 24 Stunden negativ waren, nach weiteren 24 Stunden; sie liefert häufig noch positive Befunde.

Literatur: 1. D. m. W. 1913, Nr. 11. — 2. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 1913, 72. — 3. Hyg. Rdsch. 1914, Nr. 13. — 4. M. m. W. 1913, Nr. 20. — 5. D. m. W. 1939, Nr. 10 u. Zschr. f. Hyg. 1910. — 6. Zbl. f. Bakt. I. Ref. 1913, 57. — 7. Vöfl. M. Verw. 1913, 3. H. 6. — 8. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 1913, 71. — 9. Ebenda, 72. — 10. Ebenda 1914, 73.