Aus dem Hygienischen Institut.
Zur Gramschen Färbungsmethode.

Von F. Loeffler.

Nachdem Gram im Jahre 1884 seine neue Methode der isolierten Färbung von Mikroorganismen im Gewebe bekannt gegeben hatte, ist dieselbe als überaus wertvoll für den Nachweis und die Differentialdiagnose zahlreicher Mikroorganismenarten allgemein anerkannt worden.

Gram brachte, wie bekannt, Schnitte, in denen er die darin enthaltenen Organismen nachweisen wollte, aus absolutem Alkohol in die Ehrlichsche Anilingerentiallösung, ließ sie darin 1—3 Minuten, übertrug sie dann in eine Lösung von Jodkalium in Wasser (Jod 1,0, Jodkalium 2,0, Wasser 300) für 1—3 Minuten und darauf in absoluten Alkohol, bis sie gänzlich entfärbt erschienen. Nachher hellte er sie in Nelkenöl auf, in dem eventuell noch der Rest des Farbstoffes abgegeben wurde. Die Kerne und das Grundgewebe zeigten sich dann schwach gelblich gefärbt, während die Bakterien intensiv blau, oft ganz schwarz gefärbt hervortraten. Auch bei Nachbehandlung der Schnitte mit 3%igen Lösungen von Salz- oder Salpetersäure in Alkohol blieben die meisten Schizomyceten intensiv gefärbt.

Die Methode ergab ausgezeichnete Resultate, häufig aber waren bei der praktischen Handhabung derselben die Resultate weniger befriedigend, weil entweder die Färbung der Organismen eine ungenügende war, oder weil sich die Entfärbung des Gewebes trotz der Behandlung mit saurem Alkohol, nur sehr schwierig und unvollkommen vollzog, oder weil störende Niederschläge in den Präparaten sich zeigten. Im Laufe der Zeit sind deshalb eine ganze Anzahl von Modifikationen der Gramschen Färbungsmethode angegeben, auch ist das Wesen der Färbung näher erforscht worden.

Besonders die Untersuchungen von Unna im Jahre 1888 haben einen bedeutenden Fortschritt gebracht.

Unna ermittelte, daß die Gramsche Färbung bedingt war im wesentlichen durch die chemische Konstitution des Gentianaviolets. Er stellte durch vergleichende histochemische Untersuchungen fest, daß die einfachen Jodverbindungen der beiden Farbbasen, des Rosanilins und des Pararosanilins erhebliche Verschiedenheiten zeigten, insofern als die Jodrosanilinverbindung eine lockere, leicht zerlegbare, die Jodpararosanilinverbindung dagegen eine relativ feste Verbindung darstellte. „Die Rolle des Jods und des Gentianaviolets in den Jodmethoden erklärt sich demnach so, daß bei den Rosanilinen nach der Jodbehandlung der entfärbende Alkohol das Jod allein aus der Verbindung des Jodrosanilins mit dem Gewebe auswäscht und die einfache Farbe im Gewebe an dem Ort ihrer stärksten Bindung zurückläßt, während der Alkohol aus der Verbindung des Jodpararosanilins mit dem Gewebe nicht das Jod für sich auswachen kann, ohne das Pararosanilin mit fortzuspielen. Der Alkohol entzieht diesen Schnitten daher das Jodpararosanilinsalz als Ganzes, wo es schwach vom Gewebe gebunden ist, und läßt es als viel dunklere Farbe zurück, wo es stark gebunden ist — in den Coccen und coccenartigen Bestandteilen der Bacillen.“ Das dunkle Blau oder Violett der Präparate nach Gram war daher keine einfache Anilinfarbe, sondern eine Jodverbindung derselben, wie auch schon Gram betont hatte. Unna fand dann weiter, daß die störenden Farbstoffniederschläge in den Präparaten wegfielen, wenn er nicht eine Jod-Jodkaliumlösung, wie Gram sie vorgeschrieben, verwandte, sondern eine Mischung von Jodkalium (5%) und Wasserstoffsuperoxyd, die Jod in statu nascendi lieferte. Er empfahl außerdem für die Färbung das ungemein tief und echt färbende Viktoria-blau, ein methyliertes Naphtolderivat des Pararosanilins. Trotz dieser Vorschläge Unnas blieb nach wie vor die alte Gramsche Methode im Gebrauch.

Im Jahre 1895 empfahl Nicolle statt der von Gram vorgeschlagenen Anilingentianaviolett-Lösung eine Karbolsäuregentianaviolett-Lösung, die er durch Vermischen von 100 ccm 1%iger Karbollösung mit 10 ccm einer gesättigten Gentianaviolett-Lösung in 95% Alkohol herstellte. Zur Entfärbung empfahl er eine Mischung von Aceton und Alkohol im Verhältnis von 1:3, die sehr viel schneller und sicherer entfärbte wie der absolute Alkohol. Da das Gentianaviolett sich als ein unreines Methylviolett erwies, wurde später fast ausschließlich Methylviolett oder Kristallviolett für die Gramsche Färbung verwendet.

Wenn auch die Erfolge bei Anwendung der Gramschen Färbung mit den verschiedenen angegebenen Modifikationen meist nicht schlechte waren, so waren doch noch bisweilen ungenügende Ergebnisse zu konstatieren, die, wie es schien, durch die Natur des angewendeten Violetts bedingt waren. Ich hielt es deshalb für angezeigt, die sämtlichen im Handel vorkommenden Violetts in bezug auf ihre Brauchbarkeit für die Gramsche Färbung einer vergleichenden Untersuchung zu unterziehen. Eine solche Untersuchung erschien mir um so mehr geboten, als bei den verschiedenen Darstellungsmethoden des Methylvioletts kein chemisch reiner Farbstoff, sondern ein Gemenge verschiedener Farbstoffe entsteht.

„Neben Hexamethyl-Pararosanilin“, sagt Julius, „kommen auch Pentamethyl-, Tetramethyl- und wohl auch Trimethyl-Pararosanilin darin vor. Da mit der Zahl der eintretenden Methylgruppen das Violett immer blauer wird, so bilden an Hexamethyl-Pararosanilin reiche Violetts die blauen und die, welche hauptsächlich aus Tetramethyl- und Trimethyl-Pararosanilin bestehen, die rötlichen Handelsmarken, die man durch Hinzufügen der Buchstaben B bis 6 B zu der Bezeichnung Methylviolett voneinander unterscheidet.“

Außerdem aber entstehen nach Nietzki noch benzylierte Violetts bei der Einwirkung von Benzylchlorid auf die Violettbase. Nach Fischer wird dabei das Hexamethylpararosanilin nicht angegriffen und nehmen nur die niedriger methylierten Produkte Benzylgruppen auf. Die Zusammensetzung der im Handel vorkommenden Violetts ist deshalb eine sehr verschiedene. Ich beschaffte mir folgende Handelsmarken:

Methylviolett . . . B	Methylviolett . . . 3 R
Methylviolett . . . 1 B	Methylviolett . . . BN
Methylviolett . . . 2 B	Gentianaviolett . . . B
Methylviolett . . . 3 B	Gentianaviolett . . . B R
Methylviolett . . . 4 B	außerdem noch Hofmanns Violett
Methylviolett . . . 5 B	(Triäthylrosanilin)
Methylviolett . . . 6 B	Methylenviolett (ein Dimethyl-
Methylviolett . . . BB	thionolin), und
Methylviolett . . . R	Parme-Violett.
Methylviolett . . . 2 R	

Alle diese Farbstoffe habe ich mit Dr. Miyairi einer vergleichenden Prüfung bezüglich ihrer Brauchbarkeit zur Gramschen Färbung unterzogen. Von sämtlichen Farbstoffen wurden zunächst gesättigte alkoholische Lösungen hergestellt. Als Verdünnungsflüssigkeiten dienten Anilinwasser und Karbolwasser in verschiedenen Konzentrationen, als Entfärbungsflüssigkeiten Alkohol ohne und mit Zusatz von 3%iger Salzsäure, 5%iger Schwefelsäure, 5%iger Salpetersäure und Acetonalkohol in verschiedenen Konzentrationen. Als Prüfungsmaterial wurden verwendet Schnitte in Alkohol gehärteter Organe von 20–30 μ Dicke mit Milzbrandbacillen, Mäuse-septicämiebacillen, Pneumococcen, Streptococcen, Tuberkelbacillen, Aktinomyces und Oidium.

Ich sehe an dieser Stelle davon ab, eine genauere Schilderung der Versuche zu geben und begnüge mich mit der Mitteilung des Endergebnisses.

Die besten Färbungen wurden erzielt mit Methylviolett 6 B und Methylviolett BN in 1–2½%igem Karbolwasser im Verhältnis von 1:10 gelöst. Die Schnitte wurden aus dem Alkohol direkt in die Farblösung übertragen und blieben darin zwei bis zehn Minuten. Darauf wurden sie gründlich in Wasser abgespült, um den an ihnen außen anhaftenden Farbstoff zu entfernen, dann in die Gramsche Jodjodkaliumlösung übertragen und zwei Minuten darin belassen. Als vorteilhaft erwies es sich nunmehr, die Schnitte für eine Minute in 5%ige wässrige Salpetersäure, resp. Schwefelsäure oder für zehn Sekunden in 3%igen Salzsäure-Alkohol zu bringen und darauf in absolutem Alkohol, bzw. 30%igem Acetonalkohol bis zur vollständigen Entfärbung zu belassen. Bei Anwendung des Unnaschen Jodkalium-Wasserstoffsuperoxydgemisches als Entfärbungsflüssigkeit, schien die Entfärbung schneller vor sich zu gehen, auch

waren störende Kristallbildungen auf den Schnitten nie bemerkbar. Ich ziehe deshalb die Unnasche Entfärbungsflüssigkeit der Gramschen vor. Aus dem Alkohol wurden die Schnitte in Xylol übertragen und darauf in Canadabalsam eingebettet. Eine sehr schöne Färbung wurde erzielt, wenn zu 10 ccm der Karbol-Methylviolett 6 B-Lösung 1 ccm alkoholischer Methylenblaulösung hinzugegeben wurde. Das Methylenblau scheint als Beize zu wirken. Bei Zusatz von 1 ccm alkoholischer Fuchsinlösung zu der Violett-Lösung, war die Färbung ebenfalls sehr gut, die Schnitte erschienen rotgefärbt. Zur Erzielung einer Doppelfärbung zog ich es jedoch vor, die Schnitte nach der Entfärbung kurze Zeit in eine verdünnte Fuchsinlösung zu bringen und alsdann in Alkohol zu entwässern. Das Methylviolett 6 B zeigte sich allen andern Violetts überlegen bei der Mehrzahl der Mikroorganismen; nur für die Pneumococcen war die Methylviolett BN-Lösung vorzuziehen. Die Zusammensetzung dieses Farbstoffes ist Fabrikgeheimnis. Selbst wenig Geübten gelang bei Anwendung des angegebenen Färbeverfahrens die Gramsche Färbung ohne Schwierigkeit. Frisches Material färbt sich stets am besten. Betonen möchte ich, daß zur Bereitung der Farblösung die Karbolsäurelösung frisch herzustellen ist, weil ich die Beobachtung gemacht habe, daß längere Zeit im Laboratorium aufbewahrte wässrige Karbollösungen sich so verändern können, daß sie eine gut färbende Farblösung nicht mehr liefern. Erwähnen möchte ich endlich noch, daß auf meinen Vorschlag das Methylviolett 6 B für die Färbung nach Gram in die Anleitung für die bakteriologische Feststellung der Pest aufgenommen worden ist.