Über eine durch die Ziehlfärbung nicht darstellbare Form des Tuberkelbazillus.

Von

Dr. med. N. A. Michaelidès

aus Athen.

Mit einer Tafel.

Trotz der reichen Literatur über die säurefesten und insbesondere die Tuberkelbazillen und trotz der Verbesserung in der Untersuchungs- und Färbemethodik harrt das Problem ihrer färberischen Differenzierung bisher noch einer völlig befriedigenden Lösung.

Allgemein werden die Wichtigkeit dieser Fragen und die Folgen, welche ihre Beantwortung für die Diagnose und Therapie haben würden, anerkannt.

Bei der Bestimmung eines Mikroorganismus und beim Studium seiner Morphologie spielen ja seine färberischen Eigenschaften eine grosse Rolle, da verschiedene Bakterienarten eine verschiedene Affinität zu einzelnen Farbstoffen besitzen. Namentlich die sogenannte Säurebeständigkeit und Gramfestigkeit haben in weitem Masse die Klassifikation der Bakterien unterstützt. Wir wollen hier nicht auf den Mechanismus dieser Färbung eingehen, da dies den Rahmen unserer Arbeit überschreiten würde, wollen uns aber, ganz im allgemeinen wenigstens, mit der Klasse der Säurefesten beschäftigen und in grossen Zügen ihre wichtigsten Merkmale skizzieren.

Es gehören hierher neben den Tuberkelbazillen, die Lepra-, Smegma-, Verruga-, Butter-, Milch- etc. Bazillen. Sie verdanken ihre Zugehörigkeit zu dieser Klasse dem Umstand, dass sie sich durch die basischen Anilin- und Pararosanilinfarben färben lassen und nach dieser Färbung der Entfärbung durch hochkonzentrierte Mineralsäuren und Alkohol widerstehen. Leider ist aber die Säurefestigkeit keine

konstante Eigenschaft aller Bakterien dieser Gruppe, ja nicht einmal aller Bazillen einer Unterabteilung. Die Autoren, welche, auf diese Eigenschaft sich stützend, die Differenzierung der krankmachenden säurefesten Bazillen, der Erreger der Tuberkuloseformen, und der nicht pathogenen Bazillen dieser Gruppe von anderen ähnlichen Bakterien unternommen haben, erkennen selbst die Ungleichmässigkeit dieser Reaktion an. Sie beginnen vor der Säurefestigkeit als einem sicheren Unterscheidungsmittel zu warnen; denn diese Inkonzanz hat schon allzuhäufig bei Klinikern und pathologischen Anatomen zu diagnostischen Schwierigkeiten, ja zu Irrtümern geführt. Und doch sollte der Bakteriologe in jedem einzelnen Falle eine klare Antwort geben können, nach der unter Umständen der Arzt am Krankenbett sein Handeln einrichten kann.

Das entgegengesetzte Problem aber, dass sich das spezifische Virus in tuberkulösen Herden in anderer Form vorfinden kann, als sie der typische Tuberkelbazillus darstellt, ist durch von Behring schon in in seinem Pariser Vortrag erörtert worden.

Tatsächlich konnten wir neuerdings im hiesigen Institut und zwar gar nicht einmal so selten in sicher tuberkulös veränderten Herden bei Tieren, die mit echten Tuberkelbazillenkulturen geimpft waren, folgenden Befund erheben: Es fanden sich nach ihrer Färbung mit den üblichen Methoden — Ziehl-Neelsen, Ehrlich, Gram — trotz eifrigsten Suchens keine Bazillen in den Präparaten, welche z. B. nach Ziehl gefärbt waren, während sie in den nach Gram behandelten Präparaten oft sogar reichlich sich zeigten. Anfangs glaubten wir an irgend welche methodischen Fehler oder an eine falsche Zusammensetzung der färbenden Agentien; aber auch, nachdem wir uns die Farbstofflösungen neu hergestellt und uns dessen vergewissert hatten, dass unsere Methoden richtig waren, konnten wir dieselben Befunde erheben. Auch die Möglichkeit, dass es sich um nicht säurefeste tuberkelbazillenähnliche Keime handele, konnte durch den Hergang der Infektion und das pathologisch-anatomische Bild ausgeschlossen werden.

Wir sehen also tatsächlich das tuberkulöse Virus in einer Form vor uns, die zwar nach Gram aber nicht nach Ziehl darstellbar ist. Namentlich zwei wichtige Tatsachen bekräftigen uns in dieser Ansicht:

1. Die Anwesenheit des tuberkulösen Virus in den nach Gram gefärbten Präparaten und zwar entweder in Form von granulierten Bazillen, oder von vollkommen zerstreuten Granulis, oder endlich von Anhäufungen solcher Körnchen in grossen mononukleären Zellen, ohne

dass es gelang, irgend einen nach Ziehl gefärbten Bazillus in analogen (cfr. Methodik) Präparaten zu finden.

2. Die Anwesenheit einer nur geringen Menge von nach Ziehl sehr schwach gefärbten (oder vielmehr sehr stark entfärbten) Bazillen bei gleichzeitigem Vorhandensein — in den gefärbten Präparaten — von einer etwa ebenso grossen Zahl nicht zu Granulis aufgelöster grampositiver Stäbchen; daneben findet sich das tuberkulöse Virus in diesen Präparaten und zwar in überwiegender Menge in granulierter oder ein wenig atypischer Stäbchenform.

Die Gramfärbung hat uns also in vielen Fällen, in denen die Methode nach Ziehl versagte, die Möglichkeit gegeben, das tuberkulöse Virus zu entdecken. Aber es sind uns auch Fälle vorgekommen, in denen wir die Bazillen weder durch die Ziehlsche noch durch die Gramsche Färbung nachweisen konnten. Wir haben darauf eine ganze Anzahl anderer Färbemethoden versucht, aber ohne Erfolg. Und doch sind auch hier Tuberkelbazillen vorhanden. Professor Römer hat nämlich als erster in der jüngst von Löffler publizierten Schnellfärbemethode¹⁾ ein Mittel gefunden, um auch in solchen Fällen zum Ziel zu gelangen. Diese Methode hat uns nämlich nicht uninteressante neue Tatsachen gelehrt. Löffler sagt (l. c.), dass man verschiedene Mikroorganismen und zwar namentlich die Blutparasiten, die Spirochäten, die Gonokokken, die Diphtheriebazillen mit ihr färben kann. Wir haben aber des weiteren noch gefunden, dass sich auch die Tuberkelbazillen mit ihr darstellen lassen. Wenn wir nämlich Tuberkelbazillen aus Reinkulturen hiernach behandelten, so färben sie sich in einem blassen Blau und zeigen dunkelrotviolette Körnchen. In tuberkulösen Herden verhalten sie sich gelegentlich ein wenig anders. Liegen sie nämlich extrazellulär, so sind sie allerdings entweder ebenfalls hellblau gefärbt, oder sie bleiben unsichtbar. Findet man sie aber in Zellen eingeschlossen, so zeigen sie einen rötlichen Ton und enthalten etwas dunklere Körnchen.

Selbstverständlich sind wir weit davon entfernt, diese Methode etwa als eine allgemeine differential-diagnostische Tuberkelbazillenfärbung zu empfehlen, welche die Ziehlsche oder Ehrlichsche Methode verdrängen könnte; aber in einzelnen Fällen kann sie doch offenbar recht gute Dienste tun, namentlich in den oben beschriebenen.

Wir haben also gemeinsam mit Herrn Professor Römer gefunden, dass diejenigen Tuberkelbazillen, welche sich nach Gram oder nach Ziehl nicht färben, durch diese Löfflersche Methode meistens

¹⁾ Löffler, Neue Verfahren zur Schnellfärbung von Mikroorganismen etc. Deutsche med. Wochenschr. 1907. Nr. 5. S. 169.

wenigstens darstellbar sind, und dass sie sich dann in den grossen mononukleären Zellen finden. Bei der Fortführung dieser Untersuchungen ergab sich, dass diejenigen Stäbchen dagegen, welche sich nach Gram und nach Ziehl färben, durch diese Methode oft nicht nachweisbar sind und schliesslich, dass diejenigen Bazillen, die nach Ziehl nur schwach gefärbt erscheinen, ebenfalls nach Löffler färbbar sind, dass es sich dann aber um extrazelluläre Formen zu handeln pflegt.

Diese Untersuchungen sind an Meerschweinchen, Kaninchen und Schweinen angestellt; sie mussten aus äusseren Gründen vorzeitig abgebrochen werden, sollen aber demnächst wieder aufgenommen werden und zwar namentlich in der Absicht, zu erforschen, welches die Gründe dieses verschiedenartigen Verhaltens der Bazillen sind. Einige Hinweise hierfür glauben wir schon gewonnen zu haben.

Zusammenfassung.

1. Es gibt eine Form des tuberkulösen Virus, welche durch die Ziehlsche Färbung nicht darstellbar ist.
2. Sie kann aber dann durch die Gramsche und Löffler-Giemsa-Methode sichtbar gemacht werden.
3. Weder durch Ziehl noch nach Gram färbbare Tuberkelbazillen können nach Löffler-Giemsa gefärbt werden.
4. Nach Ziehl schwach färbbares Virus kann nach Gram und etwas weniger gut nach Löffler-Giemsa gefärbt werden.
5. Es kommt eine Form des Virus vor, die nach Gram und Ziehl, die aber nicht nach Löffler-Giemsa färbbar ist.

Zum Beweis der Richtigkeit der oben mitgeteilten Tatsachen folgen hier die photographischen Wiedergaben unserer wichtigsten Präparate.

Zur Methodik sei folgendes bemerkt:

Wir stellen die Präparate in der Weise her, dass wir ein Deckgläschen mit dem Untersuchungsmaterial beschicken und eine ganze Anzahl anderer Deckgläschen an ihm abziehen. So sind wir imstande, jedesmal die nötige Menge Präparate mit wirklich identischem Material herzustellen. Unsere Farblösungen stammen von Dr. Grübler-Leipzig.

Färbemethoden.

A. Ziehl-Neelsen.

1. Fixation: dreimal durch die Flamme ziehen.

2. Färbung mit Karbolfuchsin (1 gr. Fuchsin, 10 cem Alkohol absol., 90 cem 5% Karbolwasser).

Zwei Minuten lang unter Erwärmen bis zur Dampfbildung.

3. Abspülen mit destilliertem Wasser.

4. 1—5 Sekunden lang entfärben in 30% Salpetersäure; ohne abzuspülen 20—60 Sekunden in 96% Alkohol entfärben.

(Die Entfärbung ist vollendet, wenn das Präparat nur noch einen schwach rosa gefärbten Farbton zeigt.)

5. Ohne Abzutrocknen 2 Minuten lang färben in verdünnter Methylenblaulösung.

6. Abspülen in destilliertem Wasser, abtrocknen. Einbetten in Kanadabalsam.

B. Gram-Nicolle (modifiziert).

1. Fixieren in der Flamme.

2. Zwei Minuten färben mit Methylviolett BN (10 cem Methylviolett BN; 90 cem 2% Karbolwasser) unter Erwärmen bis zur Dampfbildung.

3. Ohne abzuspülen, zwei Minuten lang mit Lugolscher Lösung behandeln (1 gr Jod, 2 gr Jodkalium, 300 cem Aq. dest.).

4. Flüssigkeit abziehen, nicht abspülen, 1 Minute lang 5% Salpetersäure (einige Tropfen) einwirken lassen.

5. Salpetersäure abgießen, 20 Sekunden 3% Salzsäure einwirken lassen.

6. 3—4 mal entfärben mit Acetonalkohol (Aceton 1,0, Alkohol abs. 3,0).

7. Abspülen mit destilliertem Wasser.

8. Ohne abzutrocknen, 30 Sekunden mit wässriger Lösung 2% Bismarckbraun färben.

9. Abspülen, trocknen, Kanadabalsam.

NB. Mit dieser Methode bekamen wir nie störende Niederschläge.

C. Löffler-Giemsa.

A. Man bereite sich folgende Lösungen, die gut verschlossen aufzubewahren sind:

a) 0,5%ige Lösung von Malachitgrünkristall-Chlorzinkdoppelsalz.

b) 0,5%ige Lösung von Natrium arsenicosum.

c) 0,5%ige Lösung von reinem Glycerin.

d) Giemsalösung:

B. Färbung.

1. Fixieren in der Flamme oder Alkohol-Äther aa.

2. Aufgiessen von 3 Tropfen Natrium arsenicosum und 1 Tropfen Malachitgrün, mischen und erwärmen bis zur Dampfbildung.

Farbe 1 Minute einwirken lassen.

3. Abspülen und 3 Minuten lang färben mit folgender bis zum Kochen erhitzter Lösung: (5 ccm Glycerinlösung, 6 Tropfen Giemsa-lösung).

4. Abspülen mit destilliertem Wasser.

5. Trocknen. Einbetten in Kanadabalsam.

Exzellenz v. Behring spreche ich auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank aus für die Übertragung des Themas und für das mir während seiner Ausarbeitung stets bewiesene Interesse; ebenfalls Herrn Professor Römer, welcher die Liebenswürdigkeit hatte, meine Präparate zu sehen und sich von der Richtigkeit meiner Angaben zu überzeugen. Auch Herrn Dr. Noeggerath danke ich verbindlichst für seine freundliche Unterstützung bei der Übertragung ins Deutsche.

Erklärung der Bilder.

Vergrößerung 800:1; Ölimmersion Leitz $\frac{1}{12}$; Okular 3; elektrisches Bogenlicht 30 Ampère.

Figur 1: Ausstrichpräparat gewonnen durch Zerreiben tuberkulösen Materials aus einem grau-gelblichen Lungentuberkel eines Meerschweines, das mit virulentem tuberkulösem Virus infiziert worden war. Färbung nach Ziel-Neelsen. Die sehr wenig zahlreichen Bazillen sind ungefärbt; man sieht sie als vollkommen weisse Stäbchen in der Mitte des Photogramms.

Figur 2: Das Präparat stammt von ebendemselben Material und ist nach der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik als Klatschpräparat des ersten hergestellt. Färbung nach Gram-Nicolle (modifiziert; vergl. oben). Jetzt sieht man eine grosse Zahl von im Originalpräparate dunkelviolett gefärbten Tuberkelbazillen.

Figur 3: Ausstrichpräparat wie 1 und 2, aber aus der Lunge eines anderen tuberkulösen Meerschweines. In diesem Falle fanden sich sowohl in den nach Ziel-Neelsen als auch in den nach Gram-Nicolle gefärbten Präparaten keine Bazillen. In dem hier reproduzierten nach Loeffler-Giemsa (cf. l. c.) gefärbten Schwester-Präparate aber sieht man die in Makrophagen liegenden zahlreichen Bazillen dunkelblau mit einem Stich ins rötliche gefärbt.

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Michaelidès, Über eine durch die Ziehlfärbung nicht darstellbare Form des Tuberkelbazillus.