Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut No. II der Universität in Budapest. (Direktor: Hofrat Prof. Dr. Pertik.)

Der Nachweis sehr spärlicher Mengen von Tuberkelbazillen.

Von Theodor Huzella.

Nach eingehender vergleichender Untersuchung der neueren Methoden für den Nachweis von Tuberkelbazillen war ich bestrebt, ein Verfahren zu finden, das die Vorteile aller bisherigen Methoden in sich vereinigt, die ihnen anhaftenden Mängel aber tunlichst beseitigt. Im Verlaufe meiner Untersuchungen habe ich jede Phase jeder einzelnen Methode für sich geprüft.

Jede der untersuchten Methoden zerfällt in drei Teile.

Man unterscheidet:

1. die Homogenisierung, d. h. die Befreiung der Bazillen und ihre gleichmäßige Verteilung in der Lösung;
2. die Anreicherung, d. h. die Einengung der in der Lösung zerstreut befindlichen Bazillen auf einen kleinen Raum;
3. den Nachweis der Bazillen, d. h. ihre Verwendung für die eigentliche Untersuchung: die Färbung, den Tierversuch oder die Züchtung.

Der Wert dieser Methoden hängt davon ab, in welchem Maße sie diese dreifache Aufgabe erfüllen.

Die Homogenisierung suchen die neueren Methoden durch Anwendung von Hydrogen-superoxyd (Sorgo, Sachs-Mücke), Autodigestion (Ellermann-Erlandsen), Lauge (Lange-Nitsche) und Antiformin (Uhlenhuth) herbeizuführen.

¶ Lauge wird schon seit Jahrzehnten zur Homogenisierung verwendet, sie hat sich jedoch hierfür nicht ganz bewährt.

Durch die Anwendung von Hydrogensuperoxyd wird die gleichmäßige Verteilung der Bazillen nicht erreicht, da diese sich hauptsächlich an zwei Stellen, an der Oberfläche der Flüssigkeit und im Bodensatz, vorfinden. Das Mittel vermag ein schwer lösliches Material nicht zu bewältigen, außerdem ist das Verfahren mit mehreren kleineren Unannehmlichkeiten verbunden, wie Schaumbildung, Verspritzen des infektiösen Materials. Auch durch Zusatz von Alkohol werden diese Mängel nur unvollkommen behoben, und die Methode wird hierdurch zu teuer.

Die Autodigestion ist zeitraubend, unständig und mit der Entwicklung eines widerlichen Geruchs verbunden.

Unter allen bisher angewendeten Mitteln entspricht allein das Antiformin allen an einen guten Homogenisator geknüpften Anforderungen. Es ist haltbar, führt, wie kein anderes Mittel, eine vollkommene Homogenisierung herbei, ohne die Bazillen irgendwie zu schädigen; seine Anwendung ist einfach, vielseitig und wohlfeil. Es ist eine glückliche Zusammensetzung der Lauge und des Natriumhypochlorid, deren jedes schon zur Homogenisierung verwendet wurde, aber mit geringerem Erfolge. (Biedert, de Lannoise et Girard, „Eau

de Javelle“.) Aus den angeführten Gründen verwende ich bei meinem Verfahren zur Homogenisierung das Antiformin.

Das Zusammensammeln oder Einengen der Bazillen aus der homogenisierten Flüssigkeit erfolgt nach den neueren Methoden durch einfaches Sedimentieren, Zentrifugieren oder Schütteln mit Kohlenwasserstoff-Verbindungen.

Das Sedimentieren hat den Nachteil, daß der größte Teil der Bazillen in der Flüssigkeit oberhalb des Bodensatzes zurückbleibt oder für die weitere Untersuchung auf andere Weise verlorengeht. Es ist ein sehr langwieriges Verfahren, gestattet nur, Lösungen von geringer Konzentration zu gebrauchen, und bedarf der Zugabe von viel Alkohol. Das Auswaschen des Bodensatzes ist mit weiterem Bazillenverlust verbunden und beansprucht mehrere Tage.

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, daß Tuberkelbazillen wegen ihres geringen spezifischen Gewichts und des durch ihre relativ große Oberfläche bedingten Reibungswiderstandes sehr schwer zum Absetzen gebracht werden können; ihr Zubodensinken ist auch dann hauptsächlich den in der Flüssigkeit befindlichen schwereren geformten Elementen zuzuschreiben, die die Bazillen mit sich reißen oder niederdrücken.

Es ist also klar, daß die Vollkommenheit der Homogenisierung, d. h. die Reduzierung der außer den Bazillen anwesenden geformten Elemente auf ein Minimum, als ein Nachteil für die Möglichkeit der Sedimentierung anzusehen ist.

Der größte Nachteil des Zentrifugierens ist, daß man auf ein über eine recht starke Zentrifuge verfügendes Laboratorium angewiesen ist. Dieser Umstand schließt die allgemeine Verbreitung der mit Zentrifugieren verbundenen Methoden aus. Außerdem haften dem Zentrifugieren, wenn auch in geringerem Maße, sämtliche Nachteile der einfachen Sedimentierung an.

Sammeln sich die Bazillen auch nicht spontan an der Oberfläche der Lösung an, so streben sie doch jedenfalls nach oben, während das Zentrifugieren sie in eine diametral entgegengesetzte Richtung zu treiben trachtet, was in erster Linie bei den übrigen geformten Elementen gelingt, erst in zweiter Reihe bei den Bazillen. Durch Anwendung des Zentrifugierens kommen wir um einen großen Teil der Bazillen, wenn wir nicht etwa verschiedene zeitraubende und das Verfahren komplizierende Kunstgriffe in Anwendung bringen wollen.

Durch Schütteln mit Kohlenwasserstoffen, am besten mit Ligroin, gelingt es, die Bazillen nahezu vollständig einzuengen. Die Methode ist einfach und wohlfeil, doch haftet dem im übrigen sinnvollen Verfahren nach meinen Erfahrungen der Nachteil an, daß das Fixieren und Färben des Materials mit besonderen Schwierigkeiten verbunden ist. Zu der Schicht, welche die Bazillen enthält, können wir nur durch die Ligroinschicht gelangen, und bei der Entnahme des Materials macht sich die Oberflächenspannung und die Adhäsion geltend, sodaß an der freien Oberfläche der Ligroinschicht das auf die Oese oder ein anderes Instrument aufgenommene Material gänzlich oder größtenteils herabschlüpft. Die mit Mühe auf das Glas gebrachte Schicht läßt sich dann kaum fixieren und löst sich bei der Alkoholbehandlung gewöhnlich los. Wollen wir aber das Haften der Schicht durch frisches Sputum oder Eiweißlösung fördern, so wird beim Ligroinpräparat das mikroskopische Bild ungemein verschleiert.

Das Ligroin wirkt auf die Färbbarkeit und Virulenz der Bazillen schädlich. Wie es scheint, entzieht es nach einer gewissen Zeit den Bazillen die säurefeste Substanz. Eine 20–30 Minuten lange Einwirkung des Ligroins auf homogenisiertes Sputum tötet die Bazillen (Bernhard), es ist somit weder für den Tierversuch noch für Kulturen anzuwenden. Und doch fordern wir wohl von einer guten Methode, daß sie für den eigentlichen Nachweis der Bazillen, für die Färbung und den Tierversuch, geeignetes Material liefere.

Diese Forderung wird von keinem der üblichen Anreicherungsverfahren erfüllt. Ich suchte daher nach einer Methode, die eine bessere Ausbeute an Bazillen gewährt. Dieses Ziel habe ich auf die Weise erreicht, daß ich das Emporsteigen der zum Aufsteigen in der Lösung geneigten, spezifisch leichten Bazillen durch Erhöhung des spezifischen Gewichts der Lösung fördere.

Geben wir in ein Reagenzglas eine homogenisierte Lösung, verdünnen sie etwas mit Wasser, setzen dann Kochsalz hinzu, sodaß eine konzentrierte Lösung entsteht, und schütteln diese zusammen, so steigen die in der Lösung befindlichen geformten Elemente, in erster Reihe die leichten Bazillen, in kurzer Zeit an die Oberfläche der Flüssigkeit und bilden dort eine dünne, dichte Schicht. Der Prozeß wird beschleunigt, wenn wir das Reagenzglas in warmes Wasser stellen; dann entsteht schon nach wenigen Minuten die Bazillen enthaltende Schicht, die sofort verarbeitet werden kann.

Haben wir es mit einem an Bazillen außerordentlich armen Material zu tun, sodaß auch mit meinem erwähnten Verfahren die zur weiteren Untersuchung erforderliche Bazillenmenge nur aus einer beträchtlichen Menge des Materials erhofft werden kann, dann müßten wir natürlich mit mehreren Reagenzgläsern arbeiten und die aus diesen gewonnenen bazillenhaltigen Schichten (z. B. zu experimentellen Zwecken) vereinigen,

was mit viel Mühe und Zeitverlust einherginge. Daher empfehle ich für diesen Zweck die folgende Modifikation meines obigen Verfahrens:

Ich durchlöchere den Boden eines Reagenzglases, am einfachsten, indem ich es über eine Flamme halte, sodaß das Loch groß genug ist, damit der Inhalt des Reagenzglases rasch abfließen kann, aber nicht so groß, daß Luftbläschen in die Flüssigkeit des Reagenzglases gelangen und sie trüben können.

Dieses durchlöchernte Reagenzglas fülle ich mit der homogenisierten Lösung, indem ich zugleich seine untere Oeffnung mit dem kleinen Finger zuhalte; nachdem es gefüllt ist, halte ich die Mündung zu, sodaß unten vom Inhalte nichts ausfließen kann. Das derart gehaltene Reagenzglas setzen wir nun in Wasser, unter Sicherung seiner Lage, am zweckmäßigsten in den Erlenmeyerschen Kolben, sodaß das durchlöchernte Ende des Reagenzglases den Boden der Flasche erreicht, die Flüssigkeitssäulen des Reagenzglases und des Erlenmeyerschen Kolbens aber im gleichen Niveau sind. In dieser Lage verbleibt das Reagenzglas kurze Zeit, bis sich die Bazillen an der Oberfläche der homogenisierten Lösung ansammeln.

Nun lassen wir wie bei der Handhabung von Pipetten aus dem durchlöchernten Reagenzglas die untere Flüssigkeitsschicht ab, die die Bazillen enthaltende obere Schicht aber halten wir mit einem Fingerdruck darin zurück; dann spülen wir diese mit Wasser aus und sammeln sie in einem andern Reagenzglas. Auf diese Weise können wir in einem Reagenzglas das gesamte bazillenhaltige Material sammeln, das wir ev. auch einer neuerlichen Auswaschung unterziehen können.

Ich muß noch bemerken, daß die Saturierung des homogenisierten Materials mit Salz am zweckmäßigsten während der ersten Phase (wenn die untere Oeffnung zugehalten wird) im durchlöchernten Reagenzglas selbst bewerkstelligt wird. Das ganze Verfahren ist rasch und einfach und kann durch Anwendung mehrerer durchlöcherter Reagenzgläser noch beschleunigt werden.

Besonders vom Gesichtspunkte des Tierexperiments empfiehlt sich dieser Kunstgriff, indem wir die Flüssigkeit vom Material ablassen und diese, durch steriles destilliertes Wasser oder Bouillon verdünnt, direkt zu Tierimpfungen verwenden können.

Für die Färbung des Materials empfehle ich nach Ueberprüfung der verschiedenen Färbemethoden die so einfache Spenglersche Pikrimethode, mit der ich die besten Resultate erzielt habe.

Die nach meiner Methode verfertigten Präparate habe ich in jedem Falle einwandfrei fixieren können.

Im mikroskopischen Bilde sehen wir nebst den sich schön färbenden Bazillen auch regelmäßig geformte, stark lichtbrechende, sich nicht färbende Salzkristalle, die keinen Anlaß zu Verwechslungen geben können.

Zur Homogenisierung verwende ich das Antiformin in größerer Konzentration, als dies sonst üblich. Zu dem für das Tierexperiment bestimmten Material benutze ich eine 15% ige, zu Sputum, Eiter eine 25% ige, zu Faeces und zur Auflösung von Geweben eine 40—50% ige Antiforminlösung. Die Quantität der Lösung soll zu der Konsistenz, der Festigkeit des zu untersuchenden Materials in gerader Proportion stehen. 10 ccm dünnen Sputums verdünne ich mit 30 ccm 25% iger Antiforminlösung. Die Gewebe, z. B. Lymphknoten, zerkleinere ich vor der Homogenisierung und zerreiße sie mit wenig Flüssigkeit in der Reibschale, dann verdünne ich z. B. 10 ccm der breiartigen Masse mit 50 ccm einer 50% igen Antiforminlösung.

Steht uns wenig Zeit zur Verfügung, so können wir die Homogenisierung durch Anwendung eines warmen Wasserbades beschleunigen. Oft können wir mit einer Homogenisierung von wenigen Minuten ein gutes Resultat erzielen. Auf diese Art gelang es mir, in einem Sputum, das man nach sorgfältiger Prüfung mit gewöhnlichen Methoden für negativ befand, binnen 20 Minuten Bazillen nachzuweisen. Ja, der Nachweis von Bazillen gelang mir auch in mehreren solchen Fällen, wo die oben aufgezählten neuen Verfahrensarten nicht zum Ziele führten.

Ich konnte ferner den Säuren widerstrebende, nach Ziehl sich färbende Stäbchen in vergrößerten Lymphknoten aus solchen Leichen nachweisen, in denen keinerlei makroskopische tuberkulöse Entartung gefunden wurde, und in mehreren Materialien, wo ich mit dem gewöhnlichen Verfahren in jedem Falle ausschließlich nach Gram sich färbende Granula fand.

Zusammenfassung. 1. Homogenisierung, am zweckmäßigsten in 15—50% iger Antiforminlösung je nach der Konsistenz des Materials $\frac{1}{2}$ —5 Stunden hindurch.

2. Ansammlung der Bazillen aus der mit Wasser verdünnten homogenisierten Lösung durch Hinzugabe der zur Konzentration erforderlichen Kochsalzmenge, am besten in 60° igem Wasserbade.

3. Das Material wird auf gewohnte Weise auf Glas gebracht, fixiert und gefärbt oder mittels durchlöchernten Reagenzglases zu Zwecken des Tierversuchs ausgewaschen.

In allen Fällen der Anwendung meiner Methode habe ich mich davon überzeugt, daß sie unter allen bisherigen Methoden die wenigste Zeit in Anspruch nimmt, der wenigsten Hilfsmittel benötigt, keine größere Eingebetheit erheischt, nicht die pünktliche Einhaltung der

vorgeschriebenen Zeiträume fordert, in jeder ihrer Phasen suspendiert werden kann, in allen Fällen, ohne Rücksicht auf die Qualität des zu untersuchenden Materials verlässlich ist und sowohl für Färbung als für den Tierversuch, diese zwei verbreitetsten Methoden zum Nachweis der Tuberkelbazillen, geeignetes Material liefert.

Literatur: G. Bernhard, Ueber die Verwendung von Antiformin und Lignoïn für den Nachweis der Tuberkelbazillen im Sputum. Deutsche medizinische Wochenschrift 1909, No. 33. — Ellermann u. Erlandsen. Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum. Zeitschrift für Hygiene etc. Bd. 61, H. 2. — Hammert. Ein Beitrag zur Homogenisierung des Sputums. Münchener medizinische Wochenschrift 1909, No. 38. — Haserodt, Neue Methoden zum Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum. Hygienische Rundschau 1909, No. 12. — Hüne, Antiformin zur Anreicherung der Tuberkelbazillen im Auswurf, Stuhl, Urin etc. Hygienische Rundschau 1909, No. 12. — Derselbe, Die Tuberkelbazillen-Anreicherung mittels Antiformin. Deutsche medizinische Wochenschrift 1909, No. 41. — Lange u. Nitsche, Eine neue Methode des Tuberkelbazillennachweises. Deutsche medizinische Wochenschrift 1909, No. 10. — K. Meyer, Zum Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum mittels Antiformins. Tuberculosis 1909, No. 2. — O. Pertik, Pathologie der Tuberkulose 1904. — Sachs-Mücke, Ein Sedimentierungsverfahren des Auswurfs mit Wasserstoffsperoxyd. Münchener medizinische Wochenschrift 1906, No. 34. — Seemann, Die Brauchbarkeit des Antiformins zum Nachweis von Tuberkelbazillen. Berliner klinische Wochenschrift 1909, No. 14. — C. Spengler, Neue Färbemethoden für Perlsucht und Tuberkulosebazillen und deren Differentialdiagnose. Deutsche medizinische Wochenschrift 1907, No. 9. — Uhlenhuth-Xylander, Antiformin, ein bakterienauflösendes Desinfektionsmittel. Berliner klinische Wochenschrift 1908, No. 29. — Uhlenhuth, Neue Methoden der Sputumuntersuchung. Medizinische Klinik 1909, No. 35.