

Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Greifswald.
Ein neues Anreicherungsverfahren zum färberischen Nachweise spärlicher Tuberkelbazillen.¹⁾

Von F. Loeffler.

Die Erkenntnis der hohen praktischen Bedeutung des färberischen Nachweises der Tuberkelbazillen in tuberkuloseverdächtigen Materialien einerseits und die Schwierigkeit, bei Anwesenheit spärlicher Bazillen oder auch bei sehr ungleichmäßiger Verteilung der Bazillen in dem Material, diesen Nachweis im einfachen Ausstrichpräparat zu erbringen andererseits, haben im Laufe der Zeit eine ganze Anzahl von „Anreicherungsverfahren“ gezeitigt, die bezwecken, die in einer größeren Menge des zu untersuchenden verdächtigen Materiales vorhandenen Bazillen so zusammenzubringen, daß sie, in einem einzigen Präparat vereinigt, mit Leichtigkeit und Sicherheit aufgefunden werden können. Um dieses Ziel zu erreichen, mußte zunächst das zähe, schleimig-eitrige, öfters auch blutige Material in eine leichtflüssige Masse verwandelt werden. Aus

¹⁾ Vortrag im Greifswalder medizinischen Verein am 27. Mai 1910.

diesem verflüssigten Material wurden dann die Tuberkelbazillen durch Absetzenlassen oder Zentrifugieren oder auch, nach Zusatz von spezifisch leichten Kohlenwasserstoffen, wie z. B. Ligroin durch Emporreißern mit den nach dem Schütteln aufsteigenden Kohlenwasserstoffteilchen gewonnen. Ich sehe davon ab, alle die verschiedenen für die Homogenisierung des Untersuchungsmaterials angegebenen Methoden hier zu erörtern. Nähere Angaben finden sich in der Arbeit von Ellermann und Erlandsen in der Zeitschrift für Hygiene, Bd. 61, 1908 und in einem Aufsatz von Schulte in der Medizinischen Klinik 1910.

Die Auflösung der tuberkulösen Materialien geschieht am besten durch das von Uhlenhuth in die Untersuchungstechnik eingeführte Antiformin.¹⁾ Es enthält unterchlorigsaures Natron und Natronlauge. Es löst tuberkulöse Sputa schon in schwachen Konzentrationen, sehr leicht und schnell unter Bräunung der Flüssigkeit in stärkerer, z. B. 25%iger Konzentration, ganz besonders schnell, wenn das Sputum mit dem Antiformin gekocht wird. Mischt man ein Volumen Sputum mit einem Volumen 50%igen Antiformins in einem Kolben, so geht nach kurzem Aufkochen, bei welchem die Flüssigkeit stark schäumt, die vollständige Lösung auch der zähesten schleimig-eitrigen Sputa vonstatten. Man hat nun betont, daß durch starke Alkalilösungen und auch durch starke Antiforminlösungen auch die Tuberkelbazillen geschädigt würden, sodaß die Zahl der färbbaren Bazillen erheblich abnehme. Bei einer kurz dauernden, nur etwa 15 Minuten währenden Einwirkung des Antiformins, selbst bei Siedetemperatur, habe ich eine praktisch in Betracht kommende Schädigung der Tuberkelbazillen nicht eintreten sehen. Es ist zweckmäßig, konzentrierte Antiforminlösungen zur Verflüssigung des Sputums zu verwenden, um das Volumen des Untersuchungsmaterials durch die Zusatzflüssigkeit möglichst wenig zu vermehren.

Freilich ist es nicht ganz leicht, aus den mit hochprozentigem Antiformin hergestellten konzentrierten Sputumlösungen die Tuberkelbazillen herauszubekommen. Es bedarf dazu eines etwa einstündigen Zentrifugierens mit einer kräftigen Zentrifuge. Um die Viskosität und das spezifische Gewicht der Flüssigkeit zu verringern und dadurch das Auszentrifugieren der Tuberkelbazillen zu erleichtern, hat man stärkere Verdünnungen der Sputumlösung mit Wasser oder mit Spiritus zur Anwendung gebracht. Dadurch wird jedoch das Volumen der zu verarbeitenden Flüssigkeit erheblich vermehrt. Je größer aber das Volumen, um so schwieriger gelingt es, womöglich alle in dem Material enthaltenen Tuberkelbazillen herauszubekommen und in einem einzigen Präparat zu vereinigen. Auch durch Zusätze von Ligroin, das als spezifisch leichter Körper die Tuberkelbazillen aus der verflüssigten Masse in die Höhe reißen soll, gelingt dies nur unvollkommen.

So gut wie gar keine Volumenvermehrung des Untersuchungsmaterials erhält man, wenn man dieses einem Verdauungsprozeß unterzieht. Die beste Methode ist ohne Zweifel die von Ellermann und Erlandsen angegebene Methode der Autodigestion bei 37° unter Zusatz von $\frac{1}{2}$ Volumen 0,6% Sodalösung. Der Verdauungsprozeß nimmt aber 24 Stunden in Anspruch. Bei der sog. Doppelmethode wird dann das verdaute Sputum zentrifugiert, der Bodensatz mit 4 Volumina 0,25% Natriumhydrats verrührt und aufgekocht, worauf nochmaliges Zentrifugieren erfolgen muß. Diese Doppelmethode liefert ohne Zweifel sehr gute Ergebnisse. Aber sie dauert lange und ist umständlich.

Für die Praxis aber bedarf man einer möglichst einfachen, schnell auszuführenden und doch zuverlässigen Methode.

Ich habe mich nun bemüht, ein Verfahren zu finden, das diesen Anforderungen entspricht. Nach vielen Untersuchungen, auf deren Details ich nicht eingehen will, bin ich zu einem Verfahren gelangt, das ich als „Chloroformverfahren“ bezeichnen möchte. Ich habe als bestes Verflüssigungsmittel das Antiformin beibehalten. Durch Aufkochen mit dem gleichen Volumen 50%igen Antiformins wird eine schnelle Verflüssigung

und zugleich eine vollständige Sterilisierung des verdächtigen Materials erzielt. Um nun das Auszentrifugieren der Tuberkelbazillen zu erleichtern, habe ich einen Zusatz von Chloroform angewandt. Das Chloroform emulgiert sich bei kräftigem Schütteln schnell mit der Flüssigkeit. Eine besonders feine Emulsion erhält man, wenn man zugleich etwas Alkohol hinzugibt. Das Chloroform hat eine besondere Affinität zu den fett- und wachsartigen Stoffen, wie sie in den Tuberkelbazillen enthalten sind. Die in der verflüssigten Masse enthaltenen Tuberkelbazillen beladen sich mit dem Chloroform und werden dadurch spezifisch schwerer, da das spezifische Gewicht des Chloroforms ein sehr hohes — 1,489 — ist. Bei dem nun folgenden Zentrifugieren wird das Chloroform sehr schnell ausgeschleudert und sammelt sich in der Spitze des Zentrifugenröhrchens. Darüber liegen dann die durch das adhärierende Chloroform fast ebenso spezifisch schwer gewordenen Stoffe, vor allem die Tuberkelbazillen. Diese Stoffe sind zu einer Scheibe vereinigt, die nach Abgießen der darüber stehenden Flüssigkeit in toto herausgenommen und zur Färbung verwendet werden kann.

Das Auszentrifugieren des Chloroforms geht sehr vollständig vor sich; gelöst bleibt nur eine minimale Menge, da es in Wasser nur zu 0,07% löslich ist. Statt des Chloroforms läßt sich auch Chlorkohlenstoff verwenden, dessen spezifisches Gewicht — 1,601 — noch höher ist als das des Chloroforms. Das Chloroform hat mir aber bessere Resultate geliefert als der Chlorkohlenstoff. Außerdem ist Chloroform überall in den Laboratorien vorhanden. Deshalb habe ich mich für das Chloroform entschieden.

Das „Chloroformverfahren“ gestaltet sich kurz zusammengefaßt folgendermaßen:

Eine gewisse Menge Sputum (5, 10, 20 ccm) wird abgemessen, in einen Kolben aus Jenaer Glas gebracht, mit der gleichen Menge 50%igen Antiformins versetzt und über der Flamme aufgekocht. Die Lösung erfolgt sofort unter Schäumen und leichter Bräunung der Flüssigkeit. Zu 10 ccm der Lösung werden hinzugesetzt 1,5 ccm einer Mischung von zehn Volumteilen Chloroform und 90 Volumteilen Alkohol. Nach tüchtigem Durchschütteln, am besten in einer mit Patentverschluß versehenen Flasche, wird die Flüssigkeit in Zentrifugenröhrchen gebracht und 15 Minuten zentrifugiert. Es hat sich dann eine Scheibe des auszentrifugierten Materials gebildet in der Spitze des Zentrifugengläschens, oberhalb des die Spitze ausfüllenden Chloroforms. Die Flüssigkeit wird abgegossen, die Scheibe in toto herausgenommen und auf einen Objektträger gebracht. Nach Absaugen des ihr noch anhängenden Flüssigkeitsrestes mit Filtrierpapier wird die Scheibe unter Zusatz eines Tropfens Hühnereiweißes, dem zur Konservierung 0,55% Karbol zugesetzt wird, mit einem zweiten Objektträger verrieben und durch Abziehen dieses Objektträgers fein ausgestrichen. Darauf läßt man die Schicht lufttrocknen werden und fixiert sie, indem man den Objektträger mehrere Male durch die Flamme zieht. Nunmehr erfolgt die Färbung mit Karbolfuchsin unter Erhitzung bis zur Blasenbildung auf den Objektträger, Nachbehandeln mit 3%igem Salzsäurealkohol, Abspülen mit Wasser, Uebergießen mit einer 0,1%igen wäßrigen Lösung von Malachitgrün chemisch rein Chlorzinkdoppelsalz (Höchst) und Abspülen mit Wasser. Nachdem das Präparat trocken geworden, wird es mit der Oelimmersion direkt untersucht.

Die ganze Prozedur nimmt 15—20 Minuten in Anspruch. Eine Schädigung der Färbbarkeit durch das Antiformin tritt in dieser kurzen Zeit nicht ein. Die Tuberkelbazillen erscheinen intensiv rot auf dem grünen Grunde und sind mit Leichtigkeit auffindbar.

Das neue Verfahren hat in meinem Institut durchaus befriedigende Ergebnisse geliefert. Auch von anderer Seite ist mir berichtet, daß es sich gut bewährt habe. Ich kann daher das Chloroformverfahren als ein sicher und schnell arbeitendes und dabei sehr einfaches und vollkommen ungefährliches Verfahren den Herren Kollegen zum Nachweis der Tuberkelbazillen empfehlen.

¹⁾ Das Antiformin wird von der Firma Oskar Kühn, Berlin, in den Handel gebracht.