

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Königsberg i. Pr. (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. J. Schreiber.)

Tuberkelbazillennachweis.¹⁾

Von Dr. Walter Telemann.

Seit der bahnbrechenden Entdeckung Robert Kochs, daß der spezifische Erreger der Tuberkulose ein Bacillus ist, der im Gegensatz zu fast allen anderen Bakterien unsere gewöhnlichen Farbstoffe schwer annimmt, der aber, einmal gefärbt, selbst durch starke Differenzierungsmittel nur schwer zu entfärben ist, seit dieser Entdeckung beruht die exakte klinische Diagnose der Tuberkulose gewöhnlich in letzter Instanz auf der Auffindung derartig charakterisierter Bazillen. Aus dieser ursprünglichen Definition ergeben sich ohne weiteres die differentialdiagnostischen Bedingungen der tinktoriellen Darstellung des Tuberkulosevirus, nämlich die erschwerte Färbung und die Differenzierung gegenüber anderen Bakterien infolge erschwelter Entfärbung; Aufgaben, die sehr bald durch das Vorgehen von Ehrlich, Ziehl, Nelsen u. a. anscheinend restlos gelöst wurden. Aus diesen anfänglichen Angaben resultiert unsere zurzeit sicherlich noch gebräuchlichste Darstellung des Tuberkelbacillus, die Ziehlsche Methode. Diese beruht auf der elektiven Resistenz des Virus gegen die entfärbende Kraft von Säuren, ein Phänomen, das wir kurz als Säurefestigkeit zu bezeichnen gewohnt sind. Sehr bald entdeckte man nun, daß dieser Färbmethode zwei wesentliche Fehler anhaften, nämlich, daß sie einerseits zu viel, andererseits und vor allen Dingen aber zu wenig darstellte. Zuviel, weil es noch andere säurefeste Bakterien gibt, zu wenig erstens, weil nicht alle Tuberkelbazillen nach Ziehl darstellbar sind, zweitens, weil auch darstellbare infolge ihrer geringen Anzahl in voluminösen Untersuchungsmaterialien nicht auffindbar sind. Um nun diese Mängel zu beheben, sind im Laufe der Jahre eine große Reihe von Methoden sowohl zur spezifischeren Färbung als auch zur Anreicherung aus Untersuchungsmaterialien angegeben worden. Daß speziell der zweite Fehler, daß zu wenig Tuberkelbazillen nachgewiesen werden, zurzeit durch alle diese Methoden noch nicht abgestellt ist, sehen wir vielleicht schon aus den Statistiken unserer Heilstätten, die im allgemeinen durchschnittlich nur 30—40 % positiven Tuberkelbazillenbefund ihrer Insassen aufweisen. Es hat sich daher auch keine dieser Methoden allgemeiner eingebürgert, weil eben der Beweis nicht erbracht werden konnte, daß sie positiv mehr zu leisten imstande sind als die anfängliche einfache Methode nach Ziehl oder Ziehl-Neelsen. Demnach erschien eine Zeitlang die Frage der tinktoriellen Darstellung des Tuberkelbacillus zum Abschluß gebracht, wie es z. B. auch Sahli in seinem neuesten Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden betont.

In den letzten Jahren sind nun auf dem Gebiete des Tuberkelbazillennachweises allem Anscheine nach sehr wichtige Entdeckungen gemacht worden, welche in der Literatur eine sehr rege Diskussion hervorgerufen haben. Von diesen liegen die einen auf dem Gebiete der Anreicherung, andere stellen einen wesentlich erweiterten färberischen Nachweis dar. Daß diese für die Darstellung von Tuberkelbazillen vor allen Dingen in ihrem Zusammenwirken eine erhöhte Bedeutung haben, hoffe ich, Ihnen auf Grund einiger Erfahrungen aus der Medizinischen Poliklinik zu demonstrieren. Die Vorbedingung für eine annähernd sichere Auffindung des Virus ist natürlich vor der Färbung eine zweckmäßige Anreicherungsmethode.

¹⁾ Vortrag, gehalten im Verein für wissenschaftliche Heilkunde in Königsberg i. Pr. am 24. Januar 1910.

Die Antiforminmethode. Uhlenhuth fand bei der Prüfung der desinfizierenden Kraft des Antiformins, einer Flüssigkeit, die bis dahin im Brauereigewerbe vielfach zum Reinigen von Bierröhren verwandt wurde, daß dieses fast alle Bakterien und auch die meisten anderen organischen Stoffe und Untersuchungsmaterialien relativ schnell und restlos auflöste mit Ausnahme der Tuberkelbazillen. Er erkannte sofort die eminente Wichtigkeit dieses Stoffes für die Auffindung und Anreicherung resp. Reindarstellung des Tuberkelbacillus aus allen Arten von Untersuchungsmaterialien, und er hat daraus ein Untersuchungsverfahren geschaffen, das nach den bisherigen, schon relativ großen Erfahrungen als eine glänzende Bereicherung unserer Untersuchungsmethoden anzusehen ist. Dieses Antiformin, dessen Name zunächst etwas irreführend wirkt, weil man hinter der Bezeichnung Formin nach Analogie anderer Stoffe ein Formolderivat vermutet, hat mit der Formaldehydgruppe nichts zu tun, sondern ist eine Mischung von Alkalihypochlorid und Alkalihydrat in einem bestimmten Verhältnis. Seine stark auflösende Wirkung beruht vor allen Dingen auf der intensiven Oxydationskraft der ersten Komponente also der unterchlorigen Säure, während der zweite Bestandteil, das Alkalihydrat, vor allen Dingen durch Quellung der organischen Substanzen die Oxydation und damit die Auflösung unterstützt. Das Verfahren selbst, wie es jetzt am gebräuchlichsten zu sein scheint und wie es auch bei uns bei einer großen Reihe von Untersuchungen als durchaus brauchbar erkannt ist, ist etwa folgendes: Einer gegebenen Menge von zu untersuchendem Material, z. B. Auswurf, wird eine vier- bis sechsmal so große Quantität einer 20 %igen Antiforminlösung zugesetzt. Niedrige Konzentrationsgrade sind weniger geeignet, höhere schädigen die Tuberkelbazillen, selbst bei längerer Einwirkung, auch nach unseren Erfahrungen nicht, sind aber aus anderen Gründen, auf die ich noch zurückkomme, ungeeignet. Beim Umrühren dieser Mischung fängt sich das zu untersuchende Material meist sofort zu lösen an und ist fast immer, bereits nach einer halben bis spätestens drei Stunden, völlig homogenisiert. Unterstützen kann man diese Auflösung, indem man das Gemisch während dieser Zeit in den Brutschrank stellt; unbedingt nötig ist es nicht. Nach völliger Auflösung ergibt sich eine relativ klare gelbliche Flüssigkeit, die nun zentrifugiert wird. Hierzu ist allerdings eine Zentrifuge von etwa 4000 Umdrehungen in der Minute durchaus notwendig. Das resultierende Sediment wird entweder mit physiologischer Kochsalzlösung nochmals gewaschen, was ein besseres Haften des Materials auf dem Objektträger zur Folge hat, oder es wird auch direkt ausgetrichen und auf Tuberkelbazillen gefärbt. Es zeigt sich nun bei den mikroskopischen Untersuchungen, daß von Sputumbestandteilen nur einige amorphe Reste übrig geblieben sind und daß das Präparat vor allen Dingen aus den stark angereicherten Tuberkelbazillen besteht. Die Güte dieses Verfahrens für alle Arten von tuberkulösem Untersuchungsmaterial ist durch vielfache Nachprüfungen auch von unserer Seite festgestellt. Besonders leistungsfähig ist es bei Materialien, die auf größere Mengen spärliche Tuberkelbazillen enthalten, und ist in diesem Sinne bei Exsudaten, Stuhl, Eiter, Urnsedimenten, tuberkulösen Organstücken und vor allen Dingen bei Sputum mit geringem Tuberkelbazillengehalt mit größtem Erfolge angewandt worden. Auf diese Weise ist es auch mir gelungen, in Urnsedimenten, in pleuritischen Exsudaten, in Zerebrospinalflüssigkeit nach einer kleinen Modifikation im strömenden Blute und vor allem in vielen Sputen Tuberkelbazillen nachzuweisen, wo ohne das Verfahren bei Durchmusterung mehrerer mikroskopischer Präparate solche nicht auffindbar waren. Auch im Stuhle habe ich in zwei Fällen den Kochschen Bacillus nachweisen können, ich möchte aber dazu bemerken, daß das Verfahren bei Stuhluntersuchungen zwar gegen früher einen bedeutenden Fortschritt darstellt, jedoch immerhin noch außerordentlich zeitraubend ist, weil daraus immer noch ein relativ zu großes Sediment restiert. Die Anreicherung und Wichtigkeit des Verfahrens läßt sich vielleicht am besten an einem Präparat demonstrieren, das von einem pleuritischen Exsudat stammt. Der zugehörige Patient hatte außer dem Exsudat keine Zeichen von Tuberkulose. Ohne Antiforminbehandlung waren Bazillen im Exsudat nicht nachweisbar; nach ihrer Anwendung — eine große Menge. Als Anreicherungsverfahren stellt das Uhlenhuthsche Vorgehen zurzeit das allerbeste dar und ist geeignet, alle früheren Methoden, die sich an die Namen Biedert-Czaplewski, Spengler, Ikewitsch, Hammerl und Ellermann-Erlandson knüpfen und die sicherlich, jede in ihrer Art, Gutes zu leisten imstande sind, vollständig zu verdrängen. Leider hat diese Methode für den Praktiker den Nachteil, daß dazu, wie schon vorher erwähnt, eine große Zentrifuge gehört, die etwa 4000 Umdrehungen in der Minute zu leisten imstande ist. Mit kleinen Handzentrifugen kommt man, wie ich mich überzeugt habe, nicht oder doch nur sehr unvollkommen zum Ziel. Bedingt werden derartige Umdrehungszahlen durch das spezifische Gewicht des in Antiformin gelösten Materials; dieses ist sehr hoch und kommt dem des Tuberkelbacillus wahrscheinlich sehr nahe. Daher tritt eine gute Sedimentierung nur bei sehr starker Zentrifugalkraft und bei längerer Anwendung dieser ein. Verminderung des spezifischen Gewichts durch Zusatz von spezifisch leichteren Flüssigkeiten wie Alkohol zu dem Gemische, wie es von einigen Seiten vorgeschlagen wurde, ist bei Anwendung guter Zentrifugen nicht notwendig. Jedoch ist es nicht zweckmäßig, wie schon vorher erwähnt,

eine stärkere als 20 %ige Antiforminlösung, die in jedem Falle zur Auflösung ausreicht, anzuwenden, um das spezifische Gewicht nicht unnötig zu erhöhen. Hat man nun eine derartige Zentrifuge nicht zur Verfügung, so kann man diese durch Anwendung einer Hilfsmethode umgehen, nämlich durch die sogenannte Ligröinmethode.

Die Ligröinmethode. Lange und Schmidt machten die interessante Bemerkung, daß, wenn man Gemische von Tuberkelbazillen mit anderen Bakterien in wäßrigen Medien mit gewissen Kohlenwasserstoffen, z. B. Petroläther, Benzin, Benzol, Toluol und vor allen Dingen mit Ligröin, einer billigen, überall erhältlichen Substanz, ausschüttelt, beim Aufsteigen des spezifisch leichteren Kohlenwasserstoffes fast lediglich Tuberkelbazillen mit in die Höhe gerissen werden. Dieses Verhalten wird dadurch erklärt, daß die wachsartige Hülle dieser Bazillen eine größere Adhäsionskraft zu Kohlenwasserstoffen als zu wäßrigen Flüssigkeiten hat und daher mit dem aufsteigenden Ligröin in die Höhe gerissen wird. Das Indiehöhesteigen des Ligröins kann man noch durch Erwärmen auf 60° beschleunigen. Nach einiger Zeit tritt dann eine scharfe Grenzschicht zwischen Kohlenwasserstoff und ursprünglicher Flüssigkeit hervor, und oberhalb dieser Grenzschicht befinden sich im Ligröin sehr stark angereichert die Tuberkelbazillen. Diese Grenzschicht kann man mit Platinösen oder einer Pipette entnehmen und zur Untersuchung auf erwärmte Objektträger übertragen. Auf diesen verdunstet das Ligröin sehr schnell, die Tuberkelbazillen bleiben zurück und können färberisch dargestellt werden. Diese Ligröinmethode hat Bernhard im Institut für Infektionskrankheiten in Berlin mit der Antiforminmischung kombiniert. Diese Doppelmethode ergibt gute Resultate und hat dabei den Vorzug, daß sie von jedem Praktiker ohne Apparate in relativ kurzer Zeit ausgeführt werden kann. Ich gebe Ihnen hier ein durch Antiformin in einstündiger Dauer gelöstes Sputum her, das mit Ligröin ausgeschüttelt ist, dessen Menge man meist so bemißt, daß gerade eine wenige Millimeter dicke Schicht dieser Substanz vorhanden ist. Das spezifisch leichte Ligröin bildet hier nach seinem Aufsteigen eine scharfe Grenze gegen das Antiformingemisch. An dieser Grenze finden sich reichlich Tuberkelbazillen. Vorzuziehen ist, wie ich glaube, Abzentrifugieren des Antiformingemisches, vor allen Dingen, wenn es sich außer der Anreicherung auch darum handelt, das Tuberkulosevirus annähernd rein darzustellen. Wie schon vorher erwähnt, werden alle anderen Bakterien mit Ausnahme der säurefesten vom Antiformin aufgelöst, von denen für gewisse Untersuchungen vor allen Dingen die gleich näher zu erwähnenden Smegmabazillen in Betracht kommen. Und diese Tatsache gerade ist neben der Anreicherung besonders wichtig. Wie vollkommen dieses speziell für Sputum der Fall ist, geht daraus hervor, daß man aus mit Antiformin vorbehandeltem Auswurf relativ leicht Reinkulturen von Tuberkelbazillen züchten kann. Auch in dieser Beziehung scheint das Antiforminverfahren alle bisher erdachten Methoden zur Reinkultivierung weit zu übertreffen. Uhlenhuth selbst hat in letzter Zeit eine Reihe von aus Sputum gelungenen Reinkulturen veröffentlicht, und einige eigene Erfahrungen bestätigen dieses Verhalten durchaus. Sie sehen, meine Herren, daß wir in dem Antiformin ein sehr vielseitiges, gutes Mittel haben, um Tuberkelbazillen für verschiedene Zwecke relativ rein darzustellen und stark anzureichern. Es ist nun eine Aufgabe der Färbung, diese differentialdiagnostisch spezifisch zur Anschauung zu bringen.

Aufbau des Tuberkelbacillus und dessen Differenzierung gegen Smegmabazillen. Wie schon vorher erwähnt, beruhte die bisherige Darstellungsart des Tuberkelbacillus auf seiner sogenannten Säurefestigkeit, d. h. seiner außerordentlich großen Resistenz gegen die entfärbende Kraft selbst starker Mineralsäuren. Diese Resistenz wird durch die Hülle des Bakterienleibes, über deren chemisch fettartigen Charakter wir zurzeit bereits durch die Arbeiten von Koch, Klebs, Helbing, Aronsolin, Bienstock, Gottstein, Fontes und Much ziemlich weitgehend unterrichtet sind, bedingt. Eine derartige Säureresistenz besitzt nun aber nicht nur der Tuberkelbacillus, sondern auch eine ganze Gruppe von Bakterien, von denen für die Untersuchung menschlicher tuberkulöser Materialien, wie schon erwähnt, vor allen Dingen der von Alvarez und Tave! als solcher zuerst beschriebene Smegmabacillus in Betracht kommt. Mit Ausnahme von wenigen ungewöhnlich seltenen Fällen, in denen dieser Bacillus, z. B. von Pappenheim, als Parasit des Sputum beschrieben worden ist, kommt er, wie es schon sein Name besagt, im Smegma vor. Hier ist er, wie ich mich auch selbst in mehr als hundert Ausstrichen aus dem Smegma von jugendlichen und älteren Individuen beiderlei Geschlechts überzeugt habe, fast immer zu finden. Desgleichen habe ich ihn bei sehr genauer, mittels Antiformin ausgeführter Untersuchung von etwa 20 Urnsedimenten in $\frac{3}{4}$ aller Fälle vorgefunden. In Urnsedimenten hat er nun bei seiner großen Ähnlichkeit mit dem Tuberkelbacillus zu den schwerwiegendsten diagnostischen Irrtümern Anlaß gegeben, die, wie es in der Literatur in einigen Fällen beschrieben ist, sogar zu grundlosen Nierenexstirpationen geführt haben. Methoden, um diese Irrtümer zu vermeiden, sind genügend angegeben worden, unter anderem die Methoden der Differenzierung mit absolutem Alkohol und der Differenzierung mit Rosolsäure. Beide sollen darauf beruhen, daß durch die erwähnten Substanzen den Smegmabazillen der Farbstoff entzogen wird, während die Tuberkelbazillen gefärbt bleiben. Nach Angaben der Lite-

ratur und nach eigener Erfahrung kommt der ersten Methode keine absolut spezifische Bedeutung zu, während die zweite, die Pappenheimsche Methode, bisher vielfach bestätigt worden ist.

Vor einiger Zeit erschienen nun aus der Berliner medizinischen Poliklinik zwei Arbeiten von Demetrius Gasis, die als eine differentialdiagnostisch wichtige Reaktion gegenüber dem Smegmabacillus die Alkalifestigkeit des Tuberkelbacillus hervorhoben. Diese beruht darauf, daß ein leider kompliziert zusammengesetzter und sehr schlecht haltbarer saurer Farbstoff, der sich im Zustande sogenannter Schwebefällung befindet, zur Tingierung der Tuberkelbazillen benutzt wird und die Differenzierung gegenüber anderen Bakterien mit einer alkoholischen Lösung mehrerer Alkalien erfolgt. Die Nachfärbung muß, wie ich es gleich hervorheben will, mit durch Salzsäure angesäuertem Methylenblau ausgeführt werden, wenn man, wie es Gasis selbst betont, eine blaue Ueberfärbung der Randzone vermeiden will. Diese Methode schien bei der Nachprüfung, die inzwischen auch von anderer Seite mit gutem Resultate erfolgt ist, sehr zweckmäßig zu sein. Ich ging nun von der Voraussetzung aus, daß, wenn die Tuberkelbazillen überhaupt alkalifast sind, man auch mit weniger komplizierten Farbstoffen und Entfärbungsmitteln auskommen müßte, und versuchte, die Darstellung mit gewöhnlichem Karbolfuchsin als Vorfärbung, alkoholischer Kalilauge als Entfärbungs- und gewöhnlichem Methylenblau als Nachfärbungsmittel auszuführen. Das zur Entfärbung benutzte Kalilaugealkoholgemisch stellte ich mir aus gewöhnlicher käuflicher, also 30 %iger Kalilauge und 60 %igem Alkohol im Verhältnis von 1 : 3 her, sodaß ein 30 %iges Kalilaugealkoholgemisch resultierte. Ich wählte absichtlich eine so hohe Laugenkonzentration, weil diese bekanntlich im Gegensatz zu der niedrigen 1 %igen von Gasis weniger schnell organische Elemente zerstört. Ein derartiges Gemisch entfärbt Präparate in etwa 15 bis 60 Sekunden, jedoch scheinen auch Einwirkungen bis zu 10 Minuten der Tinktion der Tuberkelbazillen nicht wesentlich zu schaden. Ich fand nun bei einer Serie von über hundert ausgestrichenen Smegmen, die gleichzeitig auch nach der ursprünglichen Gasisschen Methode gefärbt wurden, niemals rot gefärbte Smegmabazillen. Voraussetzung ist jedoch, daß die Ausstriche dünn angefertigt werden, weil gewisse dickere Smegmafettklümpchen mit allen eingeschlossenen Bakterien nach allen mir bekannten Differenzierungsmethoden nicht zu entfärben sind. Bei der Untersuchung von einer ebenso großen Anzahl von nach Ziehl sichergestellten tuberkulösen Sputa zeigte es sich aber, daß die Tuberkelbazillen nach Gasis schön rot gefärbt erschienen, nach meiner Modifikation dagegen um einen roten Kern eine blaue Ueberfärbung zeigten. Außerdem erschienen die nach Gasis gefärbten Bazillen schlanker und mehr gekörnt zu sein. Wenn ich nun gleichfalls wie Gasis statt mit alkalischem mit saurem Methylenblau nachfärbte, so erhielt ich dieselben Befunde wie er, und zwar in allen Ziehl-positiven Sputa deutliche Tuberkelbazillen. In einigen sogar auffallend viel mehr als nach Ziehl. In einem Sputum und einem Urin z. B. waren nur alkalifeste Tuberkelbazillen nachweisbar. Ich möchte dabei vorgehend bemerken, daß in diesem Sputum und in diesem Urin nach einer später zu beschreibenden Methode noch viel mehr Tuberkelbazillen gefunden wurden und daß außerdem ein mit dem erwähnten Urinsediment geimpftes Meer-schweinchen inzwischen an Tuberkulose zugrunde gegangen ist, sodaß also der tuberkulöse Charakter der beiden Materialien sichergestellt ist. Diese Befunde entsprechen durchaus den Angaben von Gasis, der behauptet, daß seine Methode außer der erwähnten Differenzierung gegen Smegmabazillen den Vorzug habe, wesentlich mehr als nach Ziehl, sogar manchmal ausschließlich Tuberkelbazillen darzustellen. In diesem Sinne kann man wohl nach meinen Befunden sowohl seine Methode als auch die von mir angegebene, wesentlich einfachere Modifikation empfehlen, vor allen Dingen aber als mit sehr einfachen Mitteln ausführbare Differenzierung gegenüber Smegmabazillen.

Interessant war es mir nun zu prüfen, weshalb bei der alkalifesten Methode von Gasis oder meiner Modifikation bei Nachfärbung mit alkalischem Methylenblau eine stark blaue Ueberfärbung der Rand-schicht der Tuberkelbazillen eintrat und mit saurem Methylenblau nicht. Ich möchte auf diese Verhältnisse deshalb etwas näher eingehen, weil sie färberisch, wie ich glaube, einen interessanten Einblick in den Aufbau des Tuberkelbacillus ergeben. Die Idee, daß durch die alkalische Entfärbung der fettartigen Kapsel der saure Farbstoff von Gasis oder das von mir angewandte Karbolfuchsin entzogen wird, und deshalb der nachfolgende alkalische Farbstoff angenommen wird, der saure aber der Säureresistenz der Fettkapsel wegen nicht so leicht, lag natürlich sehr nahe. Um dieses zu entscheiden, kam ich nach mehreren mißlungenen Versuchen auf die Idee, hier ein neues Verfahren, das Bakterien sehr schön in seinen Umrissen darzustellen gestattet, anzuwenden, nämlich das Burrische Tuscheverfahren. Ich kam dabei zu folgenden Resultaten. Entfärbte ich Tuberkelbazillen mit Alkalialkohol und übertuschte dann das Präparat, so erhielt ich vorzugsweise sehr grazile, zum Teil gekörnte Tuberkelbazillen, die von einer dicken, hellen, gegen die schwarze Tusche scharf sich abhebenden Hülle umgeben waren. Färbte ich dagegen Tuberkelbazillen säurefest unter Vermeidung von Alkohol und übertuschte sie, so erhielt ich, wie dies aus ausgestellten Präparaten

ersichtlich ist, vorzugsweise mitten in der Tusche ev. mit ganz schwacher Raddifferenzierung wesentlich dickere Bazillen. Schlußfolgerungen, die man aus diesem tinktoriellen Verhalten wohl ziehen darf, sind offenbar die, daß normale säurefeste Tuberkelbazillen eine säure-, aber nicht alkalifeste Hülle haben, was mit der chemisch erwiesenen Anschauung ihres Fettcharakters sehr gut übereinstimmt. Außerdem haben sie offenbar einen alkalifesten Kern, bei dem demnach durch Alkalialkohol verseifbare Fettsubstanzen keine große Rolle spielen können. Nach neueren Untersuchungen besteht dieser aus einem Eiweißkörper. Gleichzeitig scheint mir nun diese Alkalidifferenzierung mit nachfolgender Ueber-tuschung eine Methode zur isolierten Darstellung von Kern und Kapsel zu sein, wie sie mir nach anderen komplizierteren Methoden selten so deutlich gelungen ist.¹⁾ Trotzdem nun diese in mancher Beziehung interessante Alkalimethode geeignet zu sein scheint, in einigen Fällen mehr Bazillen erkennen zu lassen als die Säuredifferenzierung, steht sie doch gerade in dieser Beziehung weit zurück hinter einer anderen, auf die ich gleich näher eingehen werde, der von Much eingeführten modifizierten Grammethode.

Die Muchsche Grammethode und die granuläre Form des Tuberkelbacillus. Much fand bei einigen Fällen von experimentell erzeugter Tiertuberkulose weder säurefeste noch sonst mit unseren gewöhnlichen Farbstoffen darstellbare Bazillen, obwohl die von diesen Fällen stammenden Knötchen einen typisch histologischen Bau zeigten und sich auch durch das Tierexperiment als hochvirulent erwiesen. Er schloß daraus folgerichtig, daß das aus der Tiertuberkulose als vorhanden erwiesene Virus offenbar sehr schwer Farbstoffe annehmen müsse, und versuchte, es mit protrahierter Gramfärbung in etwas modifizierter Form darzustellen. Er kam dabei in der Tat zu positiven Resultaten, und zwar zu um so vollkommeneren, je länger er das zur Gramvorfärbung benutzte Karbolfuchsin einwirken ließ, bis nach 24—48 stündiger Färbung ihr Maximum erreicht war. Außerdem kombinierte er diese protrahierte Gramfärbung mit der für Tuberkelbazillen charakteristischen Säureentfärbung, indem er nach der Jodierung kurze Zeit nacheinander 5 % Salpetersäure und 3 % Salzsäure einwirken ließ und dann mit einem Gemisch von Azeton und absolutem Alkohol zu gleichen Teilen entfärbte. Um die unbequem lange Dauer dieses Verfahrens zu umgehen, hat Much Schnellfärbungen angegeben, die jedoch nach meinen Erfahrungen keine ebenbürtigen Resultate liefern. Dagegen scheint eine 24stündige Dauer der Vorfärbung vollständig ausreichend ev. sogar zur Vermeidung von Farbniederschlägen am zweckmäßigsten zu sein. Nach dieser Methode fand nun Much in histologischen Schnitten und in Ausstrichen des vorher erwähnten Materials ganz regelmäßig 1. verschieden große, scharf konturierten Kokken ähnliche Körnchen, die entweder diffus oder in Häufchen zusammen in ganz außer-ordentlich großer Zahl vorhanden waren, 2. eine Anzahl Granula, die, in gerader oder etwas gekrümmter Reihe von 4—8 Körnchen angeordnet, die Zusammengehörigkeit zu einem Bacillus, wie man ihn gelegentlich auch nach Ziehl gefärbt granuliert sieht, deutlich erkennen ließen, und 3. außer diesen granulären Gebilden einige nach Gram gefärbte, Tuberkelbazillen gleichsehende Stäbchen. v. Behring und Much hielten diese Gebilde für besondere spezifische Entwicklungsformen des Tuberkelbacillus und bezeichneten sie als die sogenannte granuläre Form. Zunächst ist nun wohl die Mitteilung dieser Tatsache an vielen Stellen mit großer Skepsis aufgenommen worden; es gelang jedoch Much und einigen Nachuntersuchern zu beweisen, daß es in der Tat eine offenbar nur nach protrahierter Gramfärbung darstellbare, spezifische, granuläre Form des Tuberkulosevirus gibt, die isoliert vorkommen kann und auch einerseits aus säurefesten Bazillen bei ungeeigneten Nährböden gewissermaßen als eine Dauerform hervorgehen, andererseits unter geeigneteren Verhältnissen ev. wieder zu säurefesten Kulturen auswachsen kann. Einen dieser Beweise möchte ich hier anführen: Much streute frische, virulente, nach Ziehl darstellbare Kulturen in keimfrei gemachte Milch von gegen Tuberkulose immunisierten Tieren aus. Er konnte dann beobachten, daß nach einiger Zeit die Tuberkelbazillen in diesem ungeeigneten Nährsubstrat ihre Säurefestigkeit verloren und in die vorher beschriebene, nur nach Gram darstellbare, granuläre Form übergingen. Setzte er dann zu der Milch Glycerin zu und machte so aus ihr einen geeigneten Nährboden, so konnte er umgekehrt wieder ein Auswachsen der Granula zu säurefesten Bazillen beobachten. Auch auf andere Weise und von anderen Untersuchern ist diese Tatsache nachgewiesen, sodaß nunmehr an der granulären Form als einer durchaus lebensfähigen und virulenten Form des Virus wohl nicht mehr gezweifelt werden kann. Was diese Form biologisch ist, ob sie eine Sporen- oder Degenerationsform oder sonst ein besonderes Entwicklungsstadium darstellt, darüber ist von berufener Seite eine Einigung bisher nicht erzielt worden. Mir scheint diese Frage unwichtig gegenüber der Tatsache, daß eine granuläre, virulente, nicht nach Ziehl darstellbare Form des Tuberkelbacillus besteht.

Diese Tatsache, daß es eine nach Ziehl nicht nachweisbare, latente

¹⁾ An anderer Stelle gedenke ich demnächst auf die eben geschilderten Verhältnisse der Alkalidifferenzierung und der damit zusammenhängenden Kapseldarstellung genauer einzugehen.

Tuberkuloseform gibt, ist nun bekanntlich schon früher vielfach behauptet worden, n. a. von Baumgarten und Behring, desgleichen ist es schon früher gelungen, nach anderen Methoden diese Formen des Tuberkelbacillus in vereinzelt Fällen darzustellen, z. B. von Unna, Lotz und von Hermann. Immerhin gebührt Much das Verdienst, diese Form zuerst ätiologisch und biologisch exakt bewiesen und zu weiterer Nachprüfung auf diesem Gebiete besonders angeregt zu haben. Dementsprechend ist nun von einer Reihe von Untersuchern in fast allen schon früher als tuberkulös bekannten Materialien, in denen der säurefesteste Tuberkelbacillus nicht oder nur selten zu finden war, seine granuläre Form nachgewiesen worden, so z. B. in kalten Abszessen, in käsig-kreidigen Drüsen, in dem Inhalt tuberkulöser Gelenke etc. Es lag nun natürlich sehr nahe, diese Methode auch für die klinisch-diagnostische Untersuchung menschlichen Materials, vor allen Dingen für die Sputumuntersuchung nutzbar zu machen. Dabei zeigt es sich, daß in jedem Sputum die Anzahl der Gram-positiven Tuberkelbazillen bedeutend größer ist als die der säurefesten. Man kann sich von dieser Tatsache fast immer in Präparaten, die voneinander abgestrichen sind und von denen eins nach Ziehl, das andere nach Gram-Much angefertigt ist, überzeugen. Außerdem und vor allen Dingen ist, wie ich es noch zu zeigen haben werde, das Tuberkelvirus aus seiner granulären Form in Sputum zu identifizieren, wo nach Ziehl keine Spur eines Tuberkelbacillus nachweisbar ist. Leider stößt nun bei diesen so wichtigen Untersuchungen die Methode auf eine Schwierigkeit. Die Gram-Positivität ist nicht allein spezifisch für Tuberkelbazillen, sondern kommt außerdem noch einer Reihe von anderen Bakterien zu, die sich neben dem Tuberkulosevirus im Sputum befinden oder befinden können. Vor allen Dingen ist dieses bei Identifizierung einzelner Granula sehr störend, da sich fast in jedem Sputum Gram-positive Kokken befinden, die zu Verwechslungen Anlaß geben können. In diesem Sinne sprechen sich auch die bisherigen Untersucher über die Bewertung der einzelligen Granula im Sputum aus, sodaß man auf die Auffindung derartiger Gebilde sicherlich zunächst keinen Wert legen darf. Es ist dies auch nicht notwendig, weil diese Formen stets mit einer zweiten Form vergesellschaftet zu sein pflegen, die für das tuberkulöse Virus in hohem Maße charakteristisch ist. Es sind dieses die vorher erwähnten, in Reihen zusammenliegenden Granula, die ihre Zusammengehörigkeit zu einem Bacillus noch deutlich erkennen lassen. Diese sind von anderen Untersuchern und von mir bei einer großen Reihe von Untersuchungen tuberkulöser Auswürfe, dagegen niemals in normalen gefunden worden, ein Resultat, das von einer soeben aus dem Rubnerschen Institut in Berlin erschienenen Arbeit durchaus bestätigt wird. Immerhin wäre doch die Möglichkeit einer Verwechslung mit anderen Bakterien gegeben. Aus diesem Grunde sind zur sicheren Identifizierung dieser granulären Bazillen von zwei Seiten Methoden angegeben worden, welche es gestatten, gleichzeitig oder nacheinander säurefest und nach Gram zu färben. In derartigen Präparaten sieht man die roten, säurefest gefärbten Tuberkelbazillen in Gemeinschaft und in Zusammenhang mit nach Gram gefärbten Granula. In gelungenen Präparaten kann man sich, wie dies eins der aufgestellten Präparate erkennen läßt, sehr gut über den Zusammenhang von Muchschen Granula und nach Ziehl darstellbaren Bazillen informieren. Leider haben diese Methoden den Nachteil, daß sie gerade an der wichtigsten Stelle versagen, nämlich bei Auswürfen, die nur Gram-positive, aber keine nach Ziehl darstellbaren Bazillen enthalten. In diesen findet man auch nach den Doppelmethode nur die Gram-positiven, wie vorher erwähnt, nicht durchaus spezifischen Formen. Es ist daher die Anschauung einiger Autoren durchaus berechtigt, daß man zweifellos aus den Muchschen Bazillen mit größerer Sicherheit Tuberkulose diagnostizieren könnte, wenn man andere Gram-positive Bakterien ausschließen könnte, eine Bedingung, die zunächst für das Sputum nicht zutrifft. Nun steht uns, wie gesagt, neuerdings ein Verfahren zur Verfügung, das es gestattet, aus gewissen bakterienhaltigen Materialien Tuberkelbazillen rein oder annähernd rein darzustellen, das vorher näher erörterte Uhlenhuthsche Antiforminverfahren. Die Kombination dieser Methoden verleiht nun nach meinem Dafürhalten der Muchschen Färbung schon dadurch einen größeren Wert, daß durch sie zunächst bei richtiger Handhabung alle Gram-positiven Kokken und Kokkenreihen ausgeschaltet werden, während die tuberkulösen Granula nicht geschädigt werden. Es fragt sich nun: Könnten ev. andere zufällig vorkommende, antiforminresistente Bakterien des Sputum auch derartige granuläre Tuberkelbazillen vortäuschen? Die theoretische Erörterung dieser Frage dürfte auch von berufenerer Seite bei den vielen zufälligen Möglichkeiten schwer zu lösen sein. Praktisch kommen vor allen Dingen wohl im Sputum überhaupt von säurefesten Bakterien, wenn ich von Leptra absehe, nur Smegmabazillen in Betracht, wie sie in einigen exquisit seltenen Fällen im Sputum beschrieben worden sind. Smegmabazillen sind aber im allgemeinen Gram-negativ, sodaß sie auch in diesen seltenen Fällen wohl kaum für Verwechslungen in Frage kommen. Bei den nach Antiforminbehandlung nach Gram-Much aus Sputum dargestellten granulären Formen ist nun noch ein zweiter Einwand zu entkräften, nämlich der, daß die nach Gram dargestellten Granula resp. die granulären Stäbchen gar keine Bakteriengebilde zu sein brauchen, sondern entweder Farbniederschläge oder aus der Lunge stammende gefärbte Kalkkrümelchen oder gar antraktisches Pigment

sind. Dieser Einwand gegen die Identifizierung der Granula, der von einigen Autoren erhoben worden ist, erscheint durchaus berechtigt. Was indessen schon bei der Betrachtung der Grampräparate dagegen spricht, ist 1. die scharfe Konturierung und 2. vor allen Dingen die Aneinanderreihung zu stäbchenartigen Gebilden; und nur solche sind, wie ich es vorher auseinandergesetzt habe, diagnostisch verwertbar und von uns verwertet worden. In dem vorher schon erwähnten Burrischen Tuscheverfahren haben wir nun nach meinem Dafürhalten ein Mittel, derartige Fehlerquellen auszuschließen. Ich glaube, daß diese Methode überhaupt zur Darstellung der sonst sehr schwer färbbaren granulären Form verwendbar ist, speziell da, wo Verwechslungen mit anderen Bakterien nicht in Betracht kommen, z. B. bei Untersuchungen von Reinkulturen, sonst sterilen kalten Abszessen etc. Bei der Anwendung des Tuscheverfahrens auf derartiges Material scheint mir noch ein anderer Umstand besonders günstig zu sein; es ist das die schnelle und leichte Ausführbarkeit der Methode. Wie vorher erwähnt, ist das Muchsche Verfahren außerordentlich zeitraubend und setzt dabei eine gute Technik voraus. Dieses ist bei dem Tuscheverfahren durchaus nicht der Fall. Es besteht darin, daß man einen Tropfen geeigneter chinesischer Perltsche auf einen Objektträger bringt, darin eine Oese des zu untersuchenden Materials verreibt und dann mittels des Randes eines Deckglases durch Abziehen eine möglichst homogene Schicht herstellt. Dieses ist in kürzester Zeit erledigt, und man sieht dann bei der mikroskopischen Betrachtung scharf konturierte, absolut farblose Granula und granuläre Stäbchen in dunklem Grunde liegen. Diese Farblosigkeit ist nun differentialdiagnostisch natürlich sehr wertvoll für die Verwechslung mit Niederschlägen, Kalk, Pigment etc. Gelegentlich ersieht man aus derartigen Präparaten, daß diese granuläre Stäbchenform, die nach Ziehl nicht darstellbar ist, nicht etwa nur ein Bakterienkern ist, sondern daß dieser Kern in der Tat keine Kapsel besitzt. Derartige Gebilde erscheinen dann lediglich als eine Aneinanderreihung von Kokken, die durch eine leichte Aufhellung der zwischen den zugekehrten Partien liegenden Tusche einen organischen Zusammenhang vermuten lassen. Diese Form entspricht durchaus der nach Gram-Much dargestellten und scheint mir auch in nach Antiforminbehandlung auf diese Weise hergestellten Sputumpräparaten, falls sie auffindbar ist, für Tuberkulosevirus charakteristisch zu sein. In diesem Sinne gestattet das Tuscheverfahren bei vorbehandeltem Sputum gelegentlich eine schnelle Orientierung, der dann die Gram-Muchmethode nachfolgen kann. Leider hat nun die Tuschemethode auch gewisse Schwierigkeiten, die darin bestehen, daß selbst die sterilisierte Perltsche niemals ganz einwandfrei ist mit Rücksicht auf die Anwesenheit von Bakterienleichen und sonstigen morphotischen Elementen. Auch das von Burri angegebene, durch wochenlanges Stehen zu bewirkende Selbstsedimentationsverfahren nach starker Verdünnung schützt dagegen nicht. Ich habe mir dadurch zu helfen gesucht, daß ich zu der Tusche $\frac{1}{2}$ reines Antiformin zugesetzt habe. Dieser Zusatz schädigt die Tusche in keiner Weise, es wird aber dadurch erreicht, daß der Reichtum an morphotischen Elementen abnimmt und neue Infektionen nicht erfolgen. Ich glaube, daß man die so vorbereitete Tusche, wenn man ihren Gehalt an morphotischen Elementen genau kennt, zur einfachen und schnellen Darstellung der charakteristischen granulären Bazillenform gelegentlich auch aus mit Antiformin vorbehandelten Sputa verwenden kann.

Nach dem bisher Gesagten hat sich, um es noch einmal zusammenfassend zu erwähnen, die Untersuchung auf Tuberkulosevirus, wie ich sie in letzter Zeit vorgenommen habe, folgendermaßen gestaltet. Führt man die gewöhnlichen Untersuchungsmethoden zu einem negativen Ergebnis, so wurde das Material mit Antiformin vorbehandelt und dann nach Ziehl gefärbt; führte auch dieses Verfahren zu keinem positiven Resultat, so wurde das Antiforminsediment einerseits ohne vorheriges Waschen mit Kochsalzlösung, um sekundäre Verunreinigungen zu vermeiden, mit Tusche untersucht, andererseits nach Gram-Much in 24-stündiger Dauer behandelt. Nach diesem Modus habe ich zunächst über 100 tuberkulöse Sputa untersucht und in diesen sicher nach Ziehl als tuberkulös erkannten Auswürfen, sowohl stets nach Much als auch häufig aus der eben beschriebenen granulären Form nach dem Tuscheverfahren Anwesenheit von Tuberkulosevirus nachgewiesen. In normalen Sputa habe ich derartige Gebilde niemals gesehen. Dagegen habe ich bei einer Reihe von lungenkranken, tuberkuloseverdächtigen Individuen, bei welchen nach Ziehl trotz Antiforminbehandlung bei wiederholter Untersuchung Tuberkelbazillen in keiner Weise nachweisbar waren, nach der vorerwähnten Methode solche identifizieren können. Es sind dies bis jetzt im ganzen acht¹⁾ Fälle, die ich im folgenden ganz kurz anführen möchte.

¹⁾ Anmerkungen bei der Korrektur: Inzwischen sind noch zwei derartige Fälle beobachtet worden, die durch den Tierversuch als tuberkulös sichergestellt sind, von denen der zweite als besonders interessant kurz erwähnt sein möge: Junger Mann kommt wegen Schluckbeschwerden in Behandlung. Die Untersuchung ergibt rechts hinten unten ganz vereinzelt, klingendes Rasseln. Der Auswurf enthält nur nach Gram-Much darstellbare granuläre Tuberkelbazillen. Im Verlaufe von sechs Wochen bildet sich an der eben erwähnten Stelle eine deutlich nachweisbare Dämpfung aus. Der Auswurf bleibt Ziehl-negativ, Gram-Much-positiv — Tierversuch positiv.

Drei von diesen Fällen kamen wegen Hämoptoë in Behandlung. Bei dem ersten war auskultatorisch und perkutorisch kein für Tuberkulose verwertbarer Befund zu erheben,

der 2. Fall hatte eine sehr geringe Dämpfung links hinten oben¹⁾, beim 3. Fall war perkutorisch nichts, auskultatorisch einzeltes Rasseln am Ende des Inspirium hörbar, Fall 4 stellte physikalisch-diagnostisch eine beginnende Pleuritis und eine beginnende Spitzenaffektion dar, Fall 5 betrifft ein Mädchen, das seit einem halben Jahre hustet und etwas Auswurf hat; die Perkussion ergab eine geringe Dämpfung über der linken Spitze, Fall 6 betrifft eine Frau, die seit zwei Jahren hustet und Auswurf hat; der Auswurf ist im Verlauf dieser zwei Jahre etwa zehnmal nach Ziehl untersucht worden, einigemal von mir persönlich und stets mit negativem Ergebnis. Vor etwa acht Wochen geringe Hämoptoë. Sputum ergibt granuläre Tuberkelbazillen. Dieses ist im Verlauf der letzten Wochen mehrfach untersucht und hat niemals nach Ziehl darstellbare Bazillen ergeben, Fall 7 junger Mann, rechts hinten unten handbreite Dämpfung, darüber konsonierendes Rasseln; auf derselben Seite in der rechten Nierengegend langsam entstandener Abszeß. Das Sputum und der Inhalt dieses Abszesses ergaben keine nach Ziehl darstellbaren, dagegen nach Much darstellbare granuläre Bazillen, Fall 8. Frau, über der rechten Spitze geringe Verkürzung des Perkussionsschalls, darüber unbestimmtes Atmen. Sputum nach Ziehl negativ, nach Gram-Much positiv.

Die ersten sieben dieser Fälle sind durch den Tierversuch als sicher tuberkulös identifiziert. Bei den Versuchstieren sind in jedem Falle bei der Sektion massenhaft nach Ziehl darstellbare Tuberkelbazillen gefunden worden. Bei dem achten Falle steht das Resultat des Tierversuches noch aus.²⁾

Diese sieben resp. acht Fälle prozentualiter auch nur annähernd im Verhältnis mit den übrigen Tuberkulosefällen in Zusammenhang zu bringen, würde zunächst aus besonderen Gründen zu falschen Vorstellungen führen. Jedenfalls scheinen derartige Fälle nicht allzu selten zu sein.

Meine Herren! Bei der Bewertung der Diagnose auf Grund von Muchschen Granula ist natürlich in Erwägung zu ziehen, daß man sich dabei von dem lang erprobten und sicheren Gebiet der säurefesten Darstellung des Tuberkulosevirus abwendet und sich auf ein neues, noch wenig erprobtes, nicht einmal absolut spezifisches Vorgehen verläßt. Mir scheint aber doch sowohl aus der Literatur und auch durch die eben angegebenen Resultate die Zuhilfenahme dieses Verfahrens durchaus angezeigt und auch diagnostisch berechtigt zu sein, wenn uns die alte Ziehlsche Methode im Stiche läßt.