

(Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Graz.
Vorstand: Prof. Dr. F. Reuter.)

Gepufferte Methylenblaulösungen zur Bakterienfärbung in Schnittpräparaten fauler Organe¹.

Von
Priv.-Doz. Dr. W. Laves.

Mit 1 Textabbildung.

Nach *Pischinger* kann man mit Hilfe von Lösungen basischer und saurer Farbstoffe, deren chemische Eigenschaften durch Zusätze von Säuren oder Alkalien nicht bzw. nicht wesentlich verändert werden, die Lage der isoelektrischen Punkte (i. P.) einzelner Gewebsbestandteile auch an fixierten Präparaten indirekt ermitteln.

Dies beruht darauf, daß die Farbstoffbindung durch ein Gewebe bei variiertem Wasserstoffionenkonzentration der Farblösungen innerhalb desjenigen Aciditätsbereiches rasch abnimmt bzw. ganz aufhört, in welchem die als Ampholyte aufzufassenden gewebsbildenden Kolloide eine Umladung ihrer elektrostatischen Eigenschaften erfahren. Bei Verwendung gepufferter Lösungen eines basischen Farbstoffes, z. B. von Methylenblau, erfolgt die Abnahme der Tinktion mit steigender $[H^+]$, also nach der sauren Seite, während bei Anwendung eines sauren Farbstoffes, z. B. Krystallponceau, das umgekehrte Verhalten zu beobachten ist. Die Aciditätsbereiche, in welchen diese Färbungsab- bzw. -zunahme eintritt, sind für saure und basische Farbstoffe die gleichen. Die basophile Färbbarkeit eines Substrates schlägt daher in einem bestimmten p_H -Bereiche in eine acidophile um, und bei dieser $[H^+]$ ist die Lage des isoelektrischen Punktes des betreffenden Gewebes anzunehmen. Da man heute als Wesen der Farbstoffbindung elektrostatische Vorgänge ansieht (elektrostatische Adsorptionsbindung, *Pischinger*), so erklärt sich dieses Verhalten eines Substrates dadurch, daß die positive Ladung der gewebsbildenden Kolloide mit steigender $[H^+]$ verstärkt und daher die Bindung des negativen, sauren Farbstoffes begünstigt wird, während bei Erniedrigung der Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen das Umgekehrte eintritt.

Pischinger, Mommsen, Zeiger und *Schwarz-Karsten* haben nun mit Hilfe dieser Methodik die Lage der Färbungsminima und der isoelektrischen Punkte für eine Reihe verschiedener Gewebs- und Zellbestandteile ermittelt. Die an *normalen* alkoholfixierten Organen bestimmten Werte erfahren jedoch durch Fäulnis und Autolyse, wie *ich* nachweisen konnte, eine fortschreitende Verschiebung nach der alkalischen Seite (Abb. 1, $a \rightarrow b$).

Färbt man daher z. B. Paraffinschnitte einer alkoholfixierten frischen Leber mit einer durch Pufferzusätze auf p_H 4,0 eingestellten Methylenblaulösung, so erhält man eine ziemlich intensive Färbung der Kerne und eine blasse Tinktion des Plasmas der Drüsenzellen. Läßt man das Organ faulen und behandelt Schnittpräparate desselben in der gleichen Weise, so bleiben diese bei p_H 4,0 völlig ungefärbt.

¹ Mitgeteilt auf der 19. Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin in Königsberg, September 1930.

Die gewebsbildenden Kolloide fauler Organe werden also bei variierter $[H^+]$ der Farblösungen frühzeitiger als diejenigen normaler Gewebe, und zwar oft schon nahe dem Neutralpunkt im positiven Sinne umgeladen, so daß Radikale des basischen, elektrostatisch gleichfalls positiven Methylenblaus bei *höherer $[H^+]$ der Lösungen* nicht mehr adsorbiert werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der morphologischen Untersuchungen über den nach dem Tode auftretenden Gewebsabbau ergab sich weiterhin, daß auch die physiko-chemischen Veränderungen in den Organen p. m. verschieden rasch vor sich gehen. So verläuft die Verschiebung der Lage der i. P. in den Zellen der Bauchspeicheldrüse unter Umständen geradezu überstürzt, während sie in der Leber, den

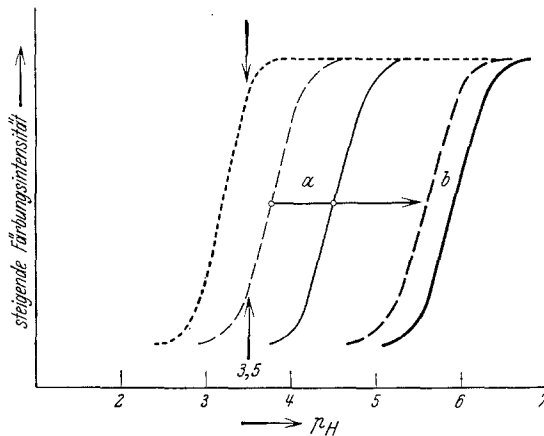


Abb. 1. Schematische Darstellung der Aciditätsbereiche des raschen Färbungsabfalles von Kernchromatinen und Plasma der Drüsenzellen a) einer nicht postmortal veränderten, b) einer faulen Leber bei Färbung der Schnitte mit $\frac{m}{100}$ Methylenblaulösungen in $\frac{m}{100}$ Natriumacetatessigsäurepuffergemischen. --- Kernchromatine der Drüsenzellen, — Plasma der Drüsenzellen; das Verhalten der Bakterien schematisch. Wegen der postmortalen Verschiebung der Lage der Färbungsminima ($a \rightarrow b$) tingieren sich z. B. in Schnitten fauler Lebern bei Anwendung einer durch Pufferzusätze auf p_H 3,5 eingestellten Methylenblaulösung nur evtl. vorhandene Bakterien.

Nieren, dem Gehirn, in den Lungen und in einzelnen Abschnitten des Darmkanals wesentlich langsamer erfolgt. Sehr stark verzögert ist die Umstellung der histologisch nachweisbaren elektrostatischen Eigenschaften u. a. in der Extremitätenmuskulatur, in den Kernen der Lymphocyten und in der Milz.

Bei früheren Untersuchungen konnte ich nun beobachten, daß die Bakterien eine stark negative Ladung besitzen, sodaß sie in Schnittpräparaten bei höherer c_H der Methylenblaulösungen den basischen Farbstoff meist noch intensiv adsorbierten¹. Ganz besonders mußte dieses Ver-

¹ Während der Drucklegung dieser Mitteilung erschien eine Arbeit von E. Püschel über die *Änderung der elektrischen Ladung von Bakterienaufschwemmungen* [Krk.forsch 9, 43, (1931)]. P. fand u. a., daß nicht mit Agglutinin beladene Staphylokokken, Gärtner- und Koli-Bacillen im elektrischen Potentialgefälle selbst bei p_H 1,04 bzw. 1,85 noch zur Anode wanderten. Auf Grund

halten in Schnitten hochgradig fauler Organe auffallen, in welchen es zur Einwanderung von *Fäulnisbakterien* gekommen war. Diese waren z. B. in faulen Lebern bei Verwendung eines basischen Farbstoffes (Methylenblau) bei p_H 3,5 elektiv gefärbt, eine Beobachtung, auf welche schon an anderer Stelle hingewiesen wurde. Unter Zugrundelegung der von *Pischinger* vertretenen allgemeinen Anschauungen über die Färbbarkeit histologischer Substrate erklärte sich das Verhalten der Fäulnisbakterien dadurch, daß sie z. B. in postmortal veränderten Lebergewebe die sauersten von allen in den Schnitten vorkommenden Stoffen enthielten und daher auch am spätesten bei Erhöhung der $[H^+]$ einer Methylenblaulösung umgeladen, d. h. dem Farbstoff gleichgeladen wurden (Abb.1). Es war nun naheliegend, diese Befunde für die *Technik einer elektiven Bakterienfärbung in Schnittpräparaten fauler Organe* heranzuziehen. Im *Prinzip* mußte zur Erzielung eines reinen Bakterienbildes in der Weise vorgegangen werden, daß man die verwendete Methylenblaulösung durch Pufferzusätze auf einen Aciditätsbereich einstellt, in welchem die Bakterien noch elektronegativ, alle anderen Gewebsbestandteile aber bereits elektropositiv geladen sind. Dieses wird, wie zahlreiche Versuche ergaben, in einfacher Weise dadurch erreicht, daß man den p_H -Bereich der $m/500$ -Methylenblaulösung in der kürzlich von *Pischinger* mitgeteilten „*Methode zur elektiven Darstellung der Nissl-Schollen*“ von p_H 4,65 auf p_H 3,5 einstellt. Die *Methode* gestaltet sich daher wie folgt:

1. Härtung kleiner Gewebsstückchen in absolutem Alkohol und Einbettung derselben in Paraffin unter Vermeidung differenter Medien.

2. Färbung der Schnitte mit: 1,0 ccm normal Natriumacetat, 15,81 ccm normal Essigsäure und 0,064 g Methylenblau pur. auf 100 ccm gekochtes destilliertes Wasser, durch 10 Minuten.

3. Kurzes Abspülen mit der Pufferlösung allein. (Die unter 2. angegebene Lösung *ohne* Farbstoff.)

4. Fixierung des Methylenblaus mit 4proz. Ammoniummolybdatlösung nach *Bethe* durch 10 Minuten.

5. Abspülen mit destilliertem Wasser, rasches Entwässern in Alkohol steigender Konzentration und Einschluß in Harz.

Der Vorteil der Methode ist darin zu erblicken, daß sich jedes Differenzieren der Schnitte erübrigt. Man erhält leuchtende, intensiv gefärbte Bilder.

Die *praktische Anwendung* der Färbungstechnik bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener postmortal veränderter Organe führte zu einigen Befunden, auf welche kurz eingegangen sei. *Die Voraussetzung für eine völlig elektive Bakterienfärbung ist, wie erwähnt, nur dann gegeben, wenn die Körper der Spaltpilze tatsächlich die sauersten*

seiner Beobachtungen hält es *Püschel* überhaupt für nicht möglich, daß eine Umladung des elektronegativen Charakters dieser Bakterien durch Änderungen des p_H allein erzielt werden kann (l. c. S. 48).

von allen in den Schnitten vorkommenden Substanzen darstellen. Dieses ist, wie die bisherige Erfahrung gezeigt hat, von dem Fäulniszustand der Gewebe und dem Grade der Verschiebung der Umladebereiche aller jeweils vorhandenen Zellbestandteile nach der alkalischen Seite abhängig. Im allgemeinen ist die Methode daher um so universeller anwendbar, je weiter die Fäulnis einer Leiche vorgeschritten ist. Handelt es sich dagegen um die Untersuchung von Geweben, deren postmortaler Abbau noch nicht sehr hochgradig ist, so können folgende Befunde im färberischen Verhalten beobachtet werden:

1. Eine völlig isolierte Tinktion der *Fäulnisbakterien* erhält man vor allem in Schnitten von Organen, in welchen die isoelektrischen Punkte der Zellelemente nach dem Tode verhältnismäßig rasch und weitgehend nach der alkalischen Seite wandern. Hierzu gehören z. B. Leber, Lunge, Gehirn und Nieren.

2. In anderen Geweben zeigt es sich zuweilen, daß außer den Fäulnisbakterien einzelne Kernchromatine mitgefärbt werden. Das ist aber in jenen Fällen *ohne* praktische Bedeutung, in welchen die Bakterien *topographisch in anderen Teilen des Schnittes als die Kernchromatine liegen*. So können z. B. die völlig ungefärbten Falten eines durch Fäulnis veränderten Dickdarmes oberflächlich mit zahlreichen intensiv tingierten Bakterien besetzt sein, die an dieser Stelle elektiv gefärbt erscheinen, obgleich auch die Kerne der Lymphocyten in den submukösen Lymphknoten den Farbstoff adsorbiert haben.

3. Es ist schließlich noch anzuführen, daß eine histologische Isolierung der *Fäulnisbakterien* auch in faulen Organen mit Hilfe der angewendeten Methodik unter Umständen *nicht* möglich ist. Dieses trifft dann zu, wenn die Spaltpilze in Substanzen eingebettet sind, welche ihnen hinsichtlich ihrer elektrostatischen Eigenschaften nahekommen bzw. gleichen.

Literaturverzeichnis.

Laves, W., Histologische Untersuchungen mit gepufferten Farblösungen zum postmortalen Abbau von Kernchromatinen und Plasma der Drüsenzellen der Leber. Virchows Arch. **279**, H. 2 (1930). — Mommsen, H., Über die elektrostatische Ladung von Zellen des menschlichen Blutes, ein Beitrag zur Frage der Acido- und Basophilie. Fol. haemat. (Lpz.) **34**, 50 (1927). — Pischinger, A., Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. Z. Zellforschg **3**, 169 (1926) — Diffusibilität und Dispersität von Farbstoffen. Z. Zellforschg **5**, 347 (1927) — Über die isoelektrischen Punkte der Muskelbestandteile. Pflügers Arch. **217**, 205 (1927) — Zur elektiven Darstellung der Kerne und Nisslschollen. Mitteilung auf dem 3. Vereinigten internat. Anatomen-Kongreß 1930, erscheint: Anat. Anz. — Schwarz-Karsten, Über Blutfärbungen mit gepufferten Farblösungen. Dtsch. med. Wschr. **1927**, Nr 43. — Zeiger, K., Der Einfluß von Fixationsmitteln auf die Färbbarkeit histologischer Elemente. Z. Zellforschg **10**, 481 (1930) — Zur Frage nach der Wirkungsweise des Formaldehyds bei der histolog. Fixation. Z. Mikrosk. **47**, 273 (1930).