

原 著

Beitrag zur Grössenordnung der Tuberkelbazillen.

Von

Dr. med. E. Klemt.

(Aus dem Arima-Institut in Ōsaka, Japan. Direktor: Prof. Dr. med. R. Arima.)

(Eingegangen am 1. Nov. 1940)

Für Tierversuche mit Tuberkelbazillen, seien es Beobachtungen pathologisch-anatomischer Vorgänge, Arbeiten über Allergie und Immunität oder gar über die therapeutische Wirkung von Seren, Schutzimpfstoffen und anderen Heilmitteln, ist es, um die Ergebnisse des Tierexperimentes auf klinische Verhältnisse übersetzen zu können, unendlich wichtig, zu wissen, welche Mengen von Tuberkelbazillen jeweils dem Versuchstier einverleibt worden sind. Seit wir durch die grundlegenden Forschungen von *Bräuning*, *Hollmann*, *Lange*, *Hipke* u. a. wissen, dass die infizierenden, kleinen Hustentröpfchen der Phthisiker im Durchschnitt nur etwa 20 Bazillen enthalten — grössere Tropfen mit grösseren Bazillenmengen sind glücklicherweise ziemlich selten! —, seit wir aus den Arbeiten von *Selter*, bezw. *Römer* und *Josef* erfahren haben, dass 6–16 Bazillen, bezw. 1/25.000.000 mg Bazillen genügen, um ein Meerschweinchen tuberkulös zu infizieren, dürfte es angebracht sein, gewisse Versuche mit ähnlich kleinen Bazillenmengen auszuführen, um den tatsächlichen, im Leben gegebenen Bedingungen nahe zu kommen; denn sicher erwerben die meisten, nicht an Tuberkulose erkrankenden Menschen ihre Tuberkuloseimmunität durch die einschleichende, die Mikroinfektion, die sog. stille Feiung. Darüber hinaus erscheint es notwendig, sich stets vor Augen zu halten, welche ungeheueren Bazillenmengen in den meisten Tuberkulose-Tierversuchen injiziert werden, um nicht aus den Resultaten unberechtigte klinische Schlüsse zu ziehen.

Diese Überlegungen führten dazu, zu untersuchen, wieviel Bazillen z. B. in der häufig bei uns den Tieren injizierten Menge von 1/1000 mg enthalten sind. Zu diesem Zwecke wurden möglichst homogene Emulsionen mehrerer Tuberkulosestämmen verschiedenen Alters nach folgender Methode untersucht.

Einige kleine Bröckel 4–8 Wochen alter, lebender Kulturen wurden im Mörser unter langsamer Zugabe von 15–20 ccm Aqua dest. zu einer milchigen Emulsion verrieben, diese dann, um feinste Verteilung der Bazillen zu erzielen, 5 Minuten den Schwingungen des Ultraschallwellen-Apparates ausgesetzt und anschliessend im Autoklaven sterilisiert. Nach 24 Stunden wurde im Spitzgläschen 5 Minuten lang bei etwa 500 Umdrehungen

zentrifugiert, die obere Hälfte des Zentrifugats abpipettiert und dieses nochmals zentrifugiert. In der erneut abpipettierten oberen Hälfte der Emulsion waren die Bazillen in feinsten Verteilung, sie lagen bei mikroskopischer Kontrolle einzeln im Gesichtsfeld.

1 ccm der Emulsion wurde nun in kleinen, aus Aluminiumfolie gestanzten Näpfchen, die nur etwa 13–14 mg wogen, obwohl sie etwa 1 ccm fassen konnten, bei 100°C zur Trockne eingedampft, bis zur Gewichtskonstanz im Exsikkator belassen und gewogen. 1 ccm der Emulsion enthielt etwa 2 mg getrocknete Bazillen.

Zur Zählung wurde auf einem gereinigten Objekträger ein Kreis von genau 1 cm Radius leicht eingeritzt, über diese Fläche 0.01 ccm der zehnfach verdünnten Emulsion, dazu zum Zwecke der Fixierung der Bazillen ein winziges Tröpfchen Glycerin-Eiweiss gleichmässig verteilt und das getrocknete Präparat mit Karbolfuchsin und Methylenblau gefärbt. Dann wurden bei Oelimmersion und 15-fach vergrößerndem Okular 100 Gesichtsfelder, gleichmässig über den Kreis verteilt, ausgezählt, nachdem mittels eines Zeisschen Objektivmikrometers mit 0.01 mm-Teilung der Durchmesser und damit die Fläche des Gesichtsfeldes bestimmt waren, und die Zahl der Bazillen auf 1 ccm der auf ihren Tuberkelbazillengehalt geprüften Emulsion, bezw. auf 1 mg Bazillen berechnet.

Eine Untersuchung als Beispiel ergab laut Protokoll folgendes Resultat :

Tiegel	leer	Nach Ein-dampfen von 1 ccm Emulsion	mg Bazillen auf 1 ccm Emulsion
1	0.0135 g	0.0158 g	2.3
2	0.0138	0.0161	2.3
3	0.0139	0.0162	2.3
4	0.0141	0.0164	2.3

Stamm: „Tone 25“, 4 Wochen alte Kultur.

Durchmesser des Objekträgerkreises 20 mm, Radius 10 mm.

Durchmesser des Gesichtsfeldes bei achrm. Zeiss Objektiv HI, 90, 1.25 und bei Zeiss Okular K 12, 15-fach. 12.2 Striche 0.122 mm, Radius 0.061 mm. Verhältnis von Kreis zu Gesichtsfeld $10^2 : 0.061^2 = 26.865$ oder rund 27.000.

Über die Präparatfläche wurden 0.01 ccm der 1:10 verdünnten Emulsion verteilt, gefärbt, 100 Gesichtsfelder ausgezählt. Es fanden sich im Durchschnitt 11.2 Bazillen pro Gesichtsfeld.

In 1 ccm der Emulsion befanden sich also :

11.2×10 (Verdünnung!) $\times 100$ (0.01 ccm auf dem Kreis!) $\times 27\,000$ (Verhältnissfaktor!) = 302.4 Millionen Bazillen, deren Gewicht, wie die Wägung ergeben hatte, 2.3 mg betrug.

1 mg trockner Bazillen enthielt also 302.4 Mill. : 2.3 = 131 Mill. Bazillen! Eine Kontrollzählung der gleichen Emulsion ergab rd. 140 Mill. Bazillen auf 1 mg Bazillen.

In gleicher Weise ergab sich für 1 mg Bazillen einer 4 Wochen alten Kultur des Stammes „Horio“ rd. 120 Mill., einer 7 Wochen alten Kultur des Stammes „Tone 25“

160 Mill. Bazillen. In einer Emulsion einer 8 Wochen alten Kultur des Stammes „Sono“ waren die Bazillen sehr klein, daher nicht exakt auszuzählen.

Es ist nun zu untersuchen, ob grössere Fehlerquellen dem Versuchsergebnis anhaften. Das Gesichtsfeld ist mittels Objektivmikrometer hinreichend genau zu bestimmen. Der Wägefehler bei der Gewichtsbestimmung der Bazillen in 1 ccm der unverdünnten Emulsion dürfte dank des sehr geringen Tiegelgewichtes $\pm 5\%$ nicht überschreiten, ebenso lassen sich mittels einer exakt geeichten Kapillarpipette 0.01 ccm verdünnter Emulsion recht genau auf den Objektträger bringen. Die sicher nicht ganz gleichmässige Verteilung dieser Menge infolge der Adhäsionskräfte (die Zahl der Bazillen nahm von der Mitte des Kreises nach den Rändern zu ab!) kann durch Auszählung einer hinreichend grossen Zahl von Gesichtsfeldern aus allen Teilen des Präparates und Kontrollzählungen weiterer Präparate der gleichen Emulsion ziemlich ausgeglichen werden, sodass die Fehlergrenze des Endresultates $\pm 10\%$ sicher nicht übersteigt.

Berücksichtigt man, dass nach den im *Arima*-Institut von Herrn *Miyamoto* erhobenen Befunden das Trockengewicht der Tuberkelbazillen etwa $1/4$ $1/5$ des Lebendgewichtes beträgt, so ergibt sich aus obigen Zählungen das immerhin bemerkenswerte Resultat, dass bei einer Injektion von $1/1000$ mg lebender Tuberkelbazillen einem Tier etwa 30.000-40.000 Bazillen, eine doch recht grosse Zahl, einverleibt werden, also sicher eine Makroinfektion, wie sie im gewöhnlichen Leben nur selten vorkommt, gesetzt wird.