

Nr.: M 9

Blatt 1 - 7

Lichtmikroskopie

Methode:

Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie

von Bakterien

Literatur: C. REICHERT: Fluoreszenzmikroskopie
mit Fluorochromen. Wien 1963.

Anwendungsbereich:

Ausstriche verschiedenster Art (Sputum, Blut).
Erreger- und Sperrfilter für die Fluorochrome s. M 10.

Mycobacterium tuberculosis

1. Fluorochromieren mit Auramin nach HAGEMANN

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren in der Flamme.
- c) Fluorochromieren 10 Minuten in Mischung:

Wässrige Lösung von Auramin 1:1000	95 ccm
Verflüssigte Karbolsäure (90%ig)	5 ccm
- d) Waschen in fließendem Wasser.
- e) Differenzieren 3 Minuten in Mischung:

Alkohol (70 Vol%ig)	97 ccm
Salzsäure	3 ccm
- f) Waschen in fließendem Wasser.
- g) Trocknen an der Luft.

Tuberkulose-Bakterien gelb.

2. Fluorochromieren mit Auramin mit Gegenfärbung nach HERRMANN (Für viel Schleim enthaltende Ausstriche)

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren in der Flamme.
- c) Fluorochromieren 10 Minuten in Mischung:

Wässrige Lösung von Auramin 1:1000	95 ccm
Verflüssigte Karbolsäure (90%ig)	5 ccm

Die Lösung wird unmittelbar nach dem Aufbringen auf den Objektträger zum Sieden erhitzt und dann 5 Minuten stehengelassen.
- d) Waschen in fließendem Wasser.
- e) Differenzieren 20 Sekunden in Mischung:

Alkohol (70 Vol%ig)	97 ccm
Salzsäure	3 ccm
- f) Waschen in fließendem Wasser.
- g) Baden 5 Sekunden in wässriger Lösung von Kaliumpermanganat 1:1000.
- h) Waschen.
- i) Baden 1 Sekunde in alkoholischer Methylenblaulösung nach Löffler.
- j) Waschen.
- k) Trocknen an der Luft.

Tuberkulose-Bakterien gelb.

3. Fluorochromieren mit Akridingelb extra nach HAITINGER und SCHWERTNER (Schnellverfahren)

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren in der Flamme.
- c) Fluorochromieren 30 Sekunden in wässriger Lösung von Akridingelb extra 1:500.
- d) Waschen.
- e) Differenzieren 15 Sekunden in Mischung:
Alkohol (70 Vol%ig) 97 ccm
Salzsäure 3 ccm
- f) Waschen.
- g) Trocknen an der Luft.

Tuberkulose-Bakterien gelb.

- BACHMANN, W. Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Tuberkelbazillen und anderer Erreger.
Münch. Med. Wschr., 86 (1939), 16: 637.
- BACHMANN, W.; FINKE, L. Über die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tuberkelbazillen im Gewebe.
Dtsch. Med. Wschr., 65 (1939), 38: 1474—1475.
- BEKKER, J. H. Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum.
Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde Infektionskrankheiten, Abt. 1, Orig., 148 (1942), 2/3: 125—131.
- DABELSTEIN, H. Das Fluoreszenzmikroskop in der laufenden Tuberkulosedagnostik.
Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde Infektionskrankheiten, Abt. 1, Orig., 143 (1938/39), 3/4: 242—243.
- DEGOMMIER, J. Nouvelle Technique de Coloration des Bacilles Tuberculeux pour la Recherche en Fluorescence. Annales de l'Institut Pasteur, 92 (1957): 692—694.
- DIDION, H. Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbakterien.
Klin. Wschr., 18 (1939), 40: 1315—1318.
- GÄRTNER, H. Wie hoch ist der Gewinn an positiven Tuberkulosepräparaten durch das Fluoreszenz-Mikroskop?
Z. Tuberkulose, 83 (1939), 1: 27—31.
- HAGEMANN, P. K. H. Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin.
Münch. Med. Wschr., 85 (1938), 28: 1066—1068.
— Über Fluoreszenzmikroskopie.
Arch. Experiment. Zellforsch., 22 (1939): 459—462.
- HERMANN, W. Der Nachweis von Tuberkelbazillen mit dem Fluoreszenzmikroskop.
Dtsch. Med. Wschr., 64 (1938), 38: 1354—1356.
— Die Bedeutung des Fluoreszenzmikroskops für den Tuberkelbazillennachweis.
Umschau Wissensch. Technik, 45 (1941), 23: 256—257.
- JUNG, J. W. Kann die Fluoreszenzmikroskopie den Tierversuch beim Tuberkelbazillennachweis ersetzen?
Dtsch. Tuberkul. Bl., 14 (1940), 4: 65—69.
- KELLER, Ch. J. Vereinfachter Nachweis von Tuberkelbazillen im Fluoreszenzlicht.
Münch. Med. Wschr., 85 (1938), 52: 2024—2028.
- MELDE, G. L. Der Wert der Fluoreszenzmikroskopie für die Diagnostik der Lungentuberkulose und ihrer Verlaufsformen.
Med. Welt, 16 (1942), 4: 86—91.
- PASS, G. Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Tuberkelbazillen im Gewebe.
Wien. Klin. Wschr., 55 (1942), 23: 450.
— Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Bakterien im Schnittpräparat.
Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde Infektionskrankheiten, Abt. 1, Orig., 149 (1943), 1: 52—56.
- POTHMANN, F. J. Vergleichende Untersuchungen mit der Leuchtbildmethode und dem Fluoreszenzmikroskop zum Nachweis der Tuberkelbazillen bei gleichzeitiger Kontrolle im Hellfeld.
Arch. Hyg. Bakteriologie., 125 (1941): 148—161.
- RIHL, H. Erfahrungen über den Tuberkelbazillennachweis mit dem Fluoreszenzmikroskop.
Wien. Klin. Wschr., 53 (1940), 16: 322—323.
- SCHALLOCK, G. Vereinfachter Nachweis von Tuberkelbazillen in histologischen Schnitten durch die Fluoreszenzmethode nach Hagemann.
Münch. Med. Wschr., 87 (1940), 4: 102—103.

Mycobacterium leprae

Fluorochromieren mit Berberinsulfat nach HAGEMANN

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren in der Flamme.
- c) Fluorochromieren 15 Minuten in Mischung:
Wässrige Lösung von Berberinsulfat 1:1000 95 ccm
Verflüssigte Karbolsäure (90%ig) 5 ccm
- d) Waschen in fließendem, heißem Wasser (60 bis 70°C):
Nasenschleim-Ausstrich 15 Sekunden,
Dicktropfenblut 35 Sekunden.
- e) Trocknen an der Luft.

Lepra-Bakterien gelb.

HAGEMANN, P. K. H. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Leprabakterien im Nasenschleim und im Blut. Dtsch. Med. Wschr., 63 (1937), 13: 514—518.
— Die Fluoreszenzmikroskopie in der Tropenmedizin. „Acta conventus tertii des tropicis atque malariae morbis“, 1938, Amstelodami, Societas Neederlandica medicinae tropicae, Pars 1: 452—456.

Corynebacterium diphtheriae

Fluorochromieren mit Coriphosphin O nach KELLER

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren 20 Minuten in Methylalkohol.
- c) Waschen.
- d) Fluorochromieren 10 Minuten in Mischung:
Wässrige Lösung von Coriphosphin O 1:1000 5 ccm
Eisessig 10 ccm
Destilliertes Wasser 85 ccm
- e) Waschen mit destilliertem Wasser.
- f) Trocknen an der Luft.

Diphtherie-Bakterien Körper dunkelgrün, Volutin-körnchen ziegelrot. Andere Bakterien blaßgelb.

KELLER, Ch. J. Der Nachweis von Diphtheriebazillen mit einem neuen Fluoreszenzmikroskop. Wien. Med. Wschr., 89 (1939), 12: 329—332.

Bakterien-Sporen

Fluorochromieren mit Brillantsulfoflavin und Coriphosphin O nach STRUGGER

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren in der Flamme.
- c) Fluorochromieren durch Aufbringen eines Tropfens der Mischung:
Wässrige Lösung (aq. dest.) von Brillantsulfoflavin 1:400 . . . 100 ccm
Verflüssigte Karbolsäure (90%ig) 0,5 ccm
Unmittelbar nach dem Aufbringen des Fluorochroms auf den Objektträger diesen kurz bis zur Dampfbildung über der Flamme erhitzen. Dann 2 Minuten einwirken lassen.
- d) Waschen in destilliertem Wasser.
- e) Fluorochromieren 40 Sekunden durch Aufbringen eines Tropfens der Lösung
Coriphosphin O 1:1000 in destilliertem Wasser.
- f) Waschen mit destilliertem Wasser.
- g) Trocknen an der Luft. Einen Tropfen Paraffinöl aufbringen. Mit einem Deckglas bedecken.

Sporen grüngelb, Bakterien kupferrot.

STRUGGER, S. Der gegenwärtige Stand der Forschungen auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien. Mikroskopie (Wien), 3 (1948), 1/2: 23—38.
— Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. 1949, Hannover, M. & H. Schaper.

Spirochäten und Protozoen

1. Fluorochromieren von Spirochäten und Trypanosomen mit Morin nach HAGEMANN

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und austreichen. An der Luft trocknen (nicht fixieren!).
- b) Fluorochromieren 5 Sekunden in Mischung:
Wässrige Lösung von Aluminiumsulfat (3%ig) 95 ccm
Alkoholische Lösung von Morin 1:500 5 ccm
- c) Waschen mit Wasser.
- d) Trocknen zwischen Fließpapier.

Spirochaeta Obermeieri Cohn (Rückfallfieber) blau-grün. Trypanosoma div. spec. (Schlafkrankheit usw.) blaugrün.

2. Fluorochromieren von Trypanosomen und Plasmodien mit Berberinsulfat nach HAGEMANN

- a) wie bei 1 a.
- b) Fluorochromieren 5 Sekunden in Mischung:
Wässrige Lösung von Berberinsulfat 1:1000 98 ccm
Verflüssigte Karbolsäure (90%ig) 2 ccm
- c) und d) wie bei 1 c und d.

Trypanosoma div. spec. (Schlafkrankheit usw.) gelb. Plasmodium div. spec. (Malaria) gelb.

3. Fluorochromieren von Trypanosomen und Hämatoproten mit Thioflavin S nach HAGEMANN

- a) wie bei 1 a.
- b) Fluorochromieren 5 Sekunden in Mischung:
Wässrige Lösung von Thioflavin S 1:500 50 ccm
Wässrige Lösung von Aluminiumsulfat (6%ig) 50 ccm
(Vor Gebrauch die Mischung einmal aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren.)
- c) und d) wie bei 1 c und d.

Trypanosoma div. spec. (Schlafkrankheit usw.) blau. Haemoproteus oryzivorae Anschütz (aus dem Reisvogel [Padda oryzivorae]) blau.

HAGEMANN, P. K. H. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Virus- und andere Mikroben. Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde Infektionskrankheiten, Abt. 1, Orig., Beihefte, 140 (1937), 3/8: 184—187.

— Die Fluoreszenzmikroskopie in der Tropenmedizin.

„Acta conventus tertii de tropicis atque malariae morbis“, 1938, Amstelodami, Societas Neerlandica medicinae tropicae, Pars 1: 452—456.

MOHRMANN, B; STRUGGER, S. Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Spirochäten (*Spirochaeta pallida*) mittels Akridinorange färbung. Dermatol. Wschr., 115 (1942), 32: 669—673.

Blutparasiten

Fluorochromieren mit Akridinorange NO nach STRUGGER

- Frischen Blutropfen auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen. Fluorochromieren durch Zufügen eines Tröpfchens der Lösung Akridinorange NO 1:20000 in physiologischer Kochsalzlösung. Etwas verreiben und mit einem Deckglas bedecken.

Blutparasiten (Trypanosomen u. dgl.) und Leukozyten grün.

FISCHL, V.; SINGER, E. Die Wirkungsweise chemotherapeutisch verwendeter Farbstoffe. Z. Hyg. Infekt.-Krankheiten, 116 (1935), 4: 348—355.

— Arzneifestigkeit und Chemikaliengewöhnung der Trypanosomen. Z. Hyg. Infekt.-Krankheiten, 116 (1935): 683—685.

STRUGGER, S. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Trypanosomen im Blut. Naturwissenschaftl. Rdsch., 2 (1949), 2: 64—65.

Lebende Bakterien

Fluorochromieren mit Akridinorange NO nach STRUGGER (Schnellverfahren)

Material mit einer Öse auf dem Objektträger in einen Tropfen der Lösung Akridinorange NO 1:30000 in physiologischer Kochsalzlösung eintragen, etwas verreiben und mit einem Deckglas bedecken.

Lebende Bakterien grün. Derbe Membranen, Kapseln usw. kupferrot.

STRUGGER, S. Verfahren zur Kenntlichmachung von lebenden und abgestorbenen Mikroorganismen.

DRP 731 205 (1941).

- Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 49 (1941), 43: 525—527.
- Ein neues Verfahren zur Färbung von Bakterien. Berlin. München. Tierärztl. Wschr. (1943), 33/34: 253—255.
- Neues über die Fluoreszenzfärbung toter und lebender Bakterien. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 50 (1942), 5/6: 51—53.
- Die Untersuchung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung. Mikrokosmos, 36 (1942/43), 2/3: 21—23.
- Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien. Mikroskopie (Wien), 3 (1948), 1/2: 23—38.
- Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. 1949, Hannover, M. & H. Schaper.
- Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien. „Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie“ (1. Sonderband der Zeitschrift „Mikroskopie“), 1949, Wien, Georg Fromme.

Bodenbakterien

Fluorochromieren mit Akridinorange NO nach STRUGGER und ROUSCHAL

- a) Je 1 g gesiebter, frischer Erde in 5 Reagensgläser bringen.
- b) In je eines der Reagensgläser 10 ccm je eine der folgenden Lösungen zufügen:

Wässrige Lösung von Akridinorange NO	1:1000
„ „ „ „	„ 1:2000
„ „ „ „	„ 1:3000
„ „ „ „	„ 1:4000
„ „ „ „	„ 1:5000

und gut durchschütteln.

- c) Jenes Reagensglas zur weiteren Untersuchung auswählen, in welchem nach einigen Minuten ein eben noch bemerkbarer Überschuß an Fluorochromlösung verblieben ist. (Bei völliger Entfärbung in zu schwacher Konzentration bleibt die Fluorochromierung unzureichend, bei kräftiger Färbung bei zu hoher Konzentration stört der Überschuß des Fluorochroms.)
- d) Den Bodensatz zentrifugieren. Mit einer Platinöse etwas vom Satz auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen, in einem Tropfen Paraffinöl verreiben und mit einem Deckglas bedecken.

Lebende Bodenbakterien grün, Humusteilchen kupferrot.

ROUSCHAL, E.; STRUGGER, S. Eine neue Methode zur Vitalbeobachtung der Mikroorganismen im Erdboden. Naturwissenschaften, 31 (1943), 25/26: 300.

STRUGGER, S. Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien. Mikroskopie (Wien), 3 (1948), 1/2: 23—38.

Virus-Elementarkörperchen

1. Fluorochromieren mit Thioflavin S und Resorzin nach HAGEMANN

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und dünn ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren 5 Minuten in Methylalkohol. An der Luft oder über der Flamme trocknen lassen.
- c) Fluorochromieren 30 Sekunden in Mischung:
Wässrige Lösung von Thioflavin S 1:500 100 ccm
Resorzin 0,012 g
- d) Waschen mit destilliertem Wasser.
- e) Trocknen an der Luft.
- f) Untersuchung:
Übersicht mit Trocken-Objektiv 10:1 und Okular 10× (Gesamtvergrößerung 100×).
Detailuntersuchung mit Ölimmersions-Objektiv 100:1 (Fluoreszenzfreies Immersionsöl!) und Okular 10× (Gesamtvergrößerung 1000×).

Virus-Elementarkörperchen bräunlichgelb.

2. Fluorochromieren mit Primulin O nach HAGEMANN

- a) Material auf einen Objektträger aus UV-Glas bringen und dünn ausstreichen. Trocknen an der Luft.
- b) Fixieren 5 Minuten in Methylalkohol. An der Luft oder über der Flamme trocknen.
- c) Fluorochromieren 20 Sekunden in Mischung:
Wässrige Lösung von Primulin O 1:1000 98 ccm
Verflüssigte Karbolsäure (90%ig) 2 ccm
Die Primulinlösung ist nicht haltbar, besonders nicht bei Licht. Daher die Lösung stets frisch bereiten und auch für kurze Zeit in brauner Flasche aufbewahren.
- d) Waschen mit destilliertem Wasser.
- e) Trocknen an der Luft.
- f) Untersuchung wie bei 1f.

Virus-Elementarkörperchen weiß bis bläulichweiß.

- GERLACH, F. Zur Virus-Fluoreszenzmikroskopie.
Wien. Klin. Wschr., 50 (1937), 46: 1576—1577.
- Über Versuche zur Sichtbarmachung und Züchtung spezifischer Mikroorganismen bei Virus-Infektionskrankheiten und bösartigen Geschwülsten.
Wien. Tierärztl. Mschr., 25 (1938), 6: 165—188.
- GERLACH, F. Über den Nachweis granulärer Formen vom Typus der Viruskörperchen bei Maul- und Klauenseuche.
Z. Infektionskrankheiten, Parasitäre Krankheiten Hygiene Haustiere, 54 (1939), 1/2: 8—22.
- HAGEMANN, P. K. H. Virus-Fluoreszenzmikroskopie. Eine neue Sichtbarmachung filtrierbarer Viruskörperchen.
Münch. Med. Wschr., 84 (1937), 20: 761—765.
- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Virus- und andere Mikroben.
Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde Infektionskrankheiten, Abt. 1, Orig., Beiheft, 140 (1937), 3/8: 184—187.
- LEVADITI, C. Ultravirus et fluorescence.
C. R. Séances Soc. Biol., 130 (1939): 605—607.
- Ultravirus et fluorescence. Méthode d'estimation numérique des corpuscules élémentaires de la vaccine.
C. R. Séances Soc. Biol., 130 (1939): 849—852.
- Ultravirus et fluorescence. Constitution complex des suspensions de corpuscules vaccinaux.
C. R. Séances Soc. Biol., 130 (1939): 1175—1179.
- Ultravirus et fluorescence. Constitution complex des suspensions de corpuscules vaccinaux. Ultracentrifugation.
C. R. Séances Soc. Biol., 130 (1939): 1180—1181.
- LEVADITI, C.; KRASSNOFF, D.; REINIÉ, L.; GIUNTINI, J. Ultravirus et fluorescence. Numération des corpuscules élémentaires vaccinaux et ultrafiltration.
C. R. Séances Soc. Biol., 131 (1939): 35—39.
- LEVADITI, C.; LE-VAN-SEN; REINIÉ, L. Ultravirus et fluorescence. Comportement à l'égard du rayonnement ultraviolet, en milieu fluorescent (trypanosomes, bactéries, enzymes).
C. R. Séances Soc. Biol., 131 (1939): 480—482.

Fluorochromierung von Pilzen und Algen mit FUNGIQUAL

KOCH und PIMSLER haben 1986/87 eine neue Fluoreszenzfärbung für den Nachweis pathogener Pilze mitgeteilt, die auch für viele andere Mikroorganismen geeignet ist. Ihre FUNGIQUAL-Färbung hat sich bei der Diagnostizierung von Mykosen, insbesondere Dermatomykosen und Schleimhautmykosen, aber auch beim Nachweis von pathogenen Pilzen im Gewebe und bei der Fluorochromierung von Hefen, Schimmelpilzen und Algen gut bewährt. Die Methode ist sehr einfach:

Hautschuppen, Nagelspäne oder Haare werden auf dem Objektträger mit einem Tropfen ca. 15 %iger Kalilauge bedeckt und in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Etwa 10 Minuten vor der mikroskopischen Auswertung gibt man ein bis zwei Tropfen FUNGIQUAL zu, legt ein ausreichend großes Deckglas auf und saugt die überschüssige Flüssigkeit mit Filtrierpapier ab. Die Präparate können sofort mikroskopiert werden.

Abstriche aller Art werden ohne Zusatz von Kalilauge mit FUNGIQUAL überschichtet, Sputen, Punktate, Suspensionen von Hefen, Schimmelpilzen und Algen mit ein bis zwei Tropfen FUNGIQUAL verrührt und mit einem Deckglas bedeckt.

Ergebnis: Bei Auflicht oder Durchlichtanregung mit blauem bzw. blauvioletttem Licht leuchten Pilze und Algen gelbgrün, bei Anregung mit UV-Licht hellblau. Auch kleinste Pilzelemente sind bei schwacher Vergrößerung (Objektiv 10 x bis 20 x) als leuchtende Partikel sehr auffällig. Im Gegensatz zu vielen anderen Fluorochromen zeigt FUNGIQUAL kein Fading (verblässen der Fluoreszenz). Das ermöglicht lange Betrachtungszeiten und wirkt sich auch bei der Mikrofotografie günstig aus.

Erforderliche Filter: BG 12/4mm oder FITC-Interferenzfilter (Blauviolett- bzw. Blauanregung) mit Sperrfilter OG 530/2 mm. UG 1/2 mm + BG 38/4 mm (UV-Anregung) mit Sperrfilter GG 10/ 2 mm.

Bezugsquelle und Prospekt:

CIBA CORNING DIAGNOSTICS GmbH, Industriestraße 9,
D-6301 Fernwald 2.

Literatur: GIT Supplement 6 / 87 "Pilze bei Kranken und Gesunden", Seite 64 (1987).

MIKROKOSMOS 77, S. 191 (1987): Leser berichten.