[Aus dem Königl. Frederiks-Hospital Abt. A. in Kopenhagen.]

Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum.

(Studien über die physikalischen Verhältnisse bei verschiedenen Homogenisierungs- und Sedimentierungsmethoden. Neue Methoden.)

Von

Dr. V. Ellermann,
Privatdozent, 1. Assistenzarzt.

und

Dr. A. Erlandsen,
Privatdozent, 2. Assistenzarzt.

Der frühzeitige Nachweis von Tuberkelbazillen bei der Lungentuberkulose spielt bekanntlich sowohl in klinisch-therapeutischer als auch in hygienischer Beziehung eine große Rolle. Als Ausdruck hierfür gelten unter anderem die ökonomischen Opfer, welche der Staat mit diesem Zweck vor Augen bringt. Der Nachweis erfolgt in manchen Fällen sehr leicht, indem man sofort die Bazillen in einem einfachen Ausstrichpräparat findet. In anderen, bei weitem nicht seltenen, Fällen gelingt dagegen der Nachweis nicht sofort. Es handelt sich in der Regel um leichtere, entweder im Entstehen begriffene oder mehr weniger geheilte Fälle. Man könnte nun im voraus erwarten, daß sich zwischen den beiden Extremen: sehr zahlreichen und gar keinen Bazillen, alle möglichen Übergänge vorfinden, und dieses wird in Wirklichkeit auch von der Klinik bestätigt. Es existieren in der Tat viele Fälle, in denen es erst nach zahlreichen vergeblichen Untersuchungen glückt, die Tuberkelbazillen nachzuweisen. Die Ursache des negativen Resultates kann sein, daß im ganzen nur wenige Bazillen vorhanden sind, oder daß die Bazillen ungleichartig verteilt sind, indem das Expektorat, außer Sekret von den spezifisch angegriffenen Stellen, Eiter und Schleim aus dem Rachen und den Luftwegen enthält. Von diesem Gesichtspunkte aus sind im Laufe der Zeit eine große Reihe Versuche zwecks Verbesserung der Untersuchungstechnik an-

gestellt worden, indem das Ziel war, solche Methoden herbeizuführen, die sicherere Resultate als das gewöhnliche Verfahren ergaben: die Ausstrichpräparate eines mehr oder weniger zufälligen Teil des Auswurfes zu untersuchen. Alle Methoden haben zwei Ziele erstrebt: 1. das Expektorat zu homogenisieren, d. h. dasselbe aus einer zähen, schleimigen Masse in eine dünne Flüssigkeit umzuwandeln, 2. die Bazillen zu sedimentieren, d. h. sie entweder durch einfaches Hinstellen oder durch Zentrifugieren zum Absetzen zu bringen.

Die Homogenisierung gelangt in verschiedener Weise zur Ausführung, doch haben sämtliche Methoden das miteinander gemeinsam, daß das Muzin gespaltet wird. Bei einigen Methoden werden außerdem Zellprotoplasma und Kerne aufgelöst. Wir werden jetzt zur Besprechung der wichtigsten Methoden schreiten, indem wir sie nach den zugrunde liegenden Prinzipien gruppieren.

Methoden, bei denen Alkalibehandlung angewandt wird.

Biedert (1886) verrührt 15^{cem} Expektorat mit 30^{cem} kaltem Wasser und 8 bis 15 Tropfen Natronlauge. Darauf wird es unter Umrühren gekocht, und es werden fernere 60 bis 90^{cem} Wasser zugesetzt. Das Sedimentieren erfolgt durch Stehenlassen im Spitzglas während zweier Tage. Biedert macht selbst darauf aufmerksam, daß die Natronlauge einen ungünstigen Einfluß auf die Bazillen ausübt, die allmählich ihre Färbbarkeit verlieren. In einer späteren Mitteilung (1891) schreibt er einen geringeren Natronzusatz vor und zwar 4 bis 8 Tropfen. Bei einem Zusatz von 10 Tropfen von 15 Prozent NaOH arbeitet er demgemäß mit einer 0.2 prozentigen Natronlösung. Die Biedertsche Methode wird sehr häufig in der von Mühlhäuser angegebenen Form (1891) angewendet. Da es in manchen Fällen mit Schwierigkeiten verbunden ist, 15^{cem} Expektorat zu bekommen, verwendet Mühlhäuser nur 1 bis 3^{gram}. Ferner verwendet er eine im voraus zubereitete 0.2 prozentige Natronlösung, da die Stärke der Lösung weniger genau wird, wenn starke Lauge tropfenweise zugesetzt wird. Das Verfahren ist wie folgt: 1 bis 3^{gram} Sputum werden sehr stark (100 mal!) mit 6 bis 8 Teilen 0.2 Prozent Natronlauge geschüttelt. Darauf läßt man es einigemal aufkochen; darauf sedimentieren. Mühlhäusers Modifikation wendet dieselbe Natronkonzentration wie die Originalmethode an; die absolute Natronlauge ist jedoch größer, was von Bedeutung sein kann, wenn größere Eitermengen aufgelöst werden sollen. Die Methode ist ferner von Czaplewsky (1900) modifiziert worden, welcher der Vorschrift Mühlhäusers folgt, aber sofort nach dem Natronkochen mit 10 Prozent Essigsäure neutralisiert, die aus einer Tropf-

flasche zugeträufelt wird. Hierauf wird mit Wasser verdünnt und zentrifugiert. Der Vorteil dieses Verfahrens sollte der sein, daß die Bazillen nur während einer kurzen Zeit der schädlichen Einwirkung der Natronlauge ausgesetzt würden.

Nebels Methode (1903): Ein Teil Expektorat wird mit 8 bis 10 Teilen Kalkwasser geschüttelt. Dann zentrifugiert man 2 Minuten lang, filtriert die obenstehende klare Flüssigkeit durch einen Berkefeld-Filter, und das auf dem Filter zurückgebliebene wird zu Präparaten angewandt. Daß Nebel die Flüssigkeit verwendet und nicht den Bodensatz, ist darauf zurückzuführen, daß er beim Zählen nach der Kleinschen Methode (eine Öse voll wird auf einem Deckglas von bekannter Größe ausgebreitet) fand, daß der Zentrifugenbodensatz nur 12 Prozent der Bazillen enthielt.

H. Petersens Methode (1906): Man mischt das Expektorat eines oder mehrerer Tage (5 bis 50 ^{ccm}) mit 10 bis 15 ^{ccm} Kalkwasser. Nach Umrühren wird Kalilauge zugesetzt, so daß die Stärke 1½ bis 3 Prozent beträgt, wonach wiederum ein Umrühren sowie Stehenlassen während einiger Stunden erfolgt. Eventuell eine Verdünnung mit Wasser; Zentrifugieren. Der Verfasser macht darauf aufmerksam, daß nicht allzu lange Zeit vor der Färbung verstreichen darf, da diese sonst leidet.

Methoden, bei denen Fermente verwendet werden.

Spengler (1895) vermischt zu gleichen Teilen Expektorat mit lauwarmem, sodahaltigem Wasser und 0.1 bis 1.0 ^{gmm} Pankreatin. Die Mischung wird in den Thermostaten gestellt, und sofort oder nach Verlauf von 2 bis 3 Stunden setzt man 0.1 bis 1.0 ^{gmm} Phenolkristall zu. Hat sich ein Sediment gebildet, wird die Flüssigkeit abgegossen. Ist das Sediment genügend klein, wird frisches Wasser zugesetzt; falls nötig, wird alkalisiert, und das Verdauen wiederholt. Nach Auswaschen des kleinen Sedimentes wird wieder zentrifugiert. Spengler hebt hervor, daß der Phenolzusatz den Vorteil hat, daß er 1. desinfiziert, 2. den Bodensatz dadurch vermindert, daß es diesen von den Fäulnisbakterien befreit. Ein sorgfältiges Alkalisieren ist notwendig, da sonst die Kerne sich nicht auflösen, und das Sediment in solchem Falle zu groß wird. Verfasser hat durch Versuche mit einer Reinkultur von Tuberkelbazillen nachgewiesen, daß Pankreatin die Bazillen nicht schädigt.

Die Pepsinverdauung soll hier nur mit wenigen Worten genannt werden. Diese ist von Jousset zum Nachweis von Tuberkelbazillen in Exsudaten angewandt worden. Zum Nachweis im Expektorat ist sie nicht zur Anwendung gelangt. Wir haben der Vollständigkeit wegen einige Versuche hiermit angestellt, die in dem folgenden mitgeteilt werden sollen.

Die Philippsche Methode (1886): Das Expektorat wird in einer mit Gaze verschlossenen Flasche bei 37° C hingestellt. Nach 24 Stunden hat sich ein purulentes Sediment gebildet, in dem die Bazillen in vergrößerter Menge vorhanden sind. Verfasser ist der Ansicht, daß die Anreicherung teils auf eine Fällung, teils auf eine Vermehrung zurückzuführen ist.

Jochmann (1902) bringt eine ähnliche Methode zur Anwendung, indem er das Expektorat mit Heyden-Bouillon mischt und dann die Mischung in den Thermostaten stellt. Er glaubt hiermit eine Anreicherung von Bazillen zu erhalten, dadurch, daß sie sich vermehren, eine Auffassung, die spätere Untersucher (Beitzke) nicht haben bestätigen können, und die auch von vornherein als unwahrscheinlich zu verwerfen ist.

Methoden, bei denen schleimauflösende Stoffe verwendet werden.

Stroschein (1892): Das Expektorat wird energisch 1 Minute lang mit 1 bis 3 Teilen verdünnter Borax-Borsäurelösung geschüttelt und zum Sedimentieren hingestellt. (Die Borax-Borsäurelösung wird auf folgende Weise hergestellt: 12 g^{mm} Borax, 12 g^{mm} Borsäure in 100 g^{mm} Wasser aufgelöst. Hiervon 1 Teil + 2 Teile destilliertes Wasser.)

Ketel (1892): 10 bis 15 ccm Expektorat werden mit 10 ccm Wasser und 6 ccm Acid. carbol. liquidum vermischt, dann eine Minute lang geschüttelt und mit Wasser bis 100 ccm aufgefüllt, darauf wieder geschüttelt und in einem Spitzglas hingestellt. Nach 12 bis 24 Stunden werden Präparate aus den tiefsten Schichten hergestellt. Die Präparate sind vor der Färbung mit Äther-Alkohol auszuwaschen.

Sorgo (1903): 5 bis 7 ccm Expektorat werden mit 15 ccm destilliertem Wasser versetzt. Man schüttelt stark (in einem Erlenmeyerschen Kolben) so lange, bis das Expektorat einigermaßen homogenisiert ist. Hierauf werden 5 ccm 12 prozent. Wasserstoffsuperoxydlösung zugesetzt, und der Kolben wird, nachdem er geschüttelt, mit offener Mündung hingestellt. Der Verfasser verwendet in gewissen Fällen den Schaum, in anderen die ganze Flüssigkeit. In beiden Fällen wird mit Alkohol vermischt und zentrifugiert. Jetzt wird nicht das Sediment angewandt, sondern die obenstehende Flüssigkeit, die mit Kalkwasser vermischt und zentrifugiert wird. Dieser letzte Bodensatz wird zu Präparaten verwendet. Der Verfasser erwähnt selbst, daß die richtige Ausführung der Methode etwas Übung erfordert.

Methoden, bei denen Wärme zur Anwendung gelangt.

Dahmen (1891): Das Expektorat wird 15 Minuten lang in kochendem Wasser oder in einem Dampfbad erwärmt. Hierdurch koagulieren die Albuminstoffe der Zellen. Nach erfolgter Abkühlung und leichtem Schütteln sinken die festen Bestandteile zu Boden und reißen die Bazillen mit hinab. Die Flüssigkeit ist milchig, unklar, doch leicht beweglich wie Wasser. Der käsige Bodensatz läßt sich in einem Achatmörser so gleichmäßig verreiben, daß sämtliche Gesichtsfelder ungefähr die gleiche Anzahl Bazillen enthalten. Verfasser hebt die Einfachheit und Schnelligkeit der Methode, sowie die gute Färbung der Bazillen hervor.

Hempel (1902) hat die Einwirkung verschiedener Temperaturen geprüft und gefunden, daß 65 bis 75° C das Optimum war. Bei dieser Temperatur spaltet sich das Muzin, und man erhält eine ganz dünne Flüssigkeit, die zentrifugiert wird. Die Methode ist also ganz einfach: Erwärmung 4 bis 8 Minuten auf dem Wasserbade bei 65 bis 75° C; Zentrifugieren; Präparate vom Bodensatz. Außer dieser einfachen Methode schlägt Verfasser eine etwas kompliziertere vor: 10^{ccm} homogenisiertes Expektorat werden 1^{ccm} $\frac{n}{10}$ — $\frac{n}{1}$ HCl zugesetzt; es wird ungeschüttelt und 1^{ccm} Brückes Reagens zugesetzt. Hierdurch erhält man einen Bodensatz, der sich schnell setzt. Verfasser ist der Ansicht, daß die Methode für stark purulente Expektorate von keiner großen Bedeutung ist, dagegen aber für die mehr muzinösen vorteilhaft ist. In letzterem Falle erhält man einen Bodensatz, der nur ungefähr $\frac{1}{10}$ vom Volumen des Expektorates ausmacht.

Die Sedimentierung: Diese wurde anfänglich einfach dadurch ausgeführt, daß man die Flüssigkeit in einem Spitzglas stehen ließ. Später wurde die Zentrifuge eingeführt, wodurch eine erhebliche Zeitersparnis erzielt wurde. Die homogenisierten Expektorate bilden immer einen Bodensatz, ganz gleich, welche Homogenisierungsmethode man anwendet. Man hat allgemein angenommen, daß die Tuberkelbazillen zu Boden sinken müssen, ebenso, wie der gröbere Bodensatz, vorausgesetzt, daß das spezifische Gewicht der Bazillen höher als das der Flüssigkeit wäre. Es ist ja allerdings richtig, daß das spezifische Gewicht eine Rolle spielt; doch sind andere Verhältnisse vorhanden, die von größerer Bedeutung sind. Es ist eine allgemein bekannte Erfahrung, daß es schwierig ist, Bakterien abwärts zu zentrifugieren. Dasselbe gilt auch von Tuberkelbazillen. Die Ursache ist einfach die, daß Bakterien — wie alle kleinen Körper — eine relativ große Oberfläche haben, wodurch der Reibungswiderstand gegen die Flüssigkeit sehr groß wird. Weitere Faktoren, die

eine Rolle spielen, sind die Viskosität und das spezifische Gewicht der Flüssigkeit. Es will erscheinen, als ob man bisher das recht hohe spezifische Gewicht der Tuberkelbazillen nicht in Übereinstimmung mit der oft spärlichen Ausbeute der Zentrifugierung hat bringen können. Wir glauben, in den obengenannten Verhältnissen eine passende Erklärung dieses scheinbaren Widerspruches gefunden zu haben. Wir werden später bei der Besprechung der Zentrifugierungsversuche näher auf die verschiedenen theoretischen Verhältnisse eingehen.

In der Literatur finden sich einige wenige Arbeiten, die eine Schätzung verschiedener Homogenisierungsmethoden enthalten. So hat Hempel beispielsweise seine Methode (Wärmehomogenisierung — Sedimentierung mit Brückes Reagens) mit derjenigen von Mühlhäuser und Ketel verglichen und gefunden, daß sie 10 mal so hohe Zahlen wie diese Methoden ergab. Sein Verfahren besteht darin, daß er eine Öse voll auf ein Deckglas von bekannter Größe ausbreitet und die Mittelzahlen pro Gesichtsfeld vergleicht. Hempels Arbeit scheint mit großer Klarheit und Genauigkeit ausgeführt zu sein und nimmt im ganzen einen sehr hervorragenden Platz unter den hierher gehörigen Arbeiten ein. Er berücksichtigt den Umstand, der zu Fehlern Anlaß gibt, daß eine Öse voll nicht immer den gleichen Rauminhalt hat, indem dieser von dem spezifischen Gewicht und der Viskosität der Flüssigkeit abhängt. Es scheint indessen nicht, daß er diese Korrektur bei den Zählungen, die zwecks Vergleiches der Methoden vorgenommen sind, eingeführt hat.

Beitzke benutzt dieselbe Meßmethode wie Hempel und findet, daß die Mühlhäuser-Czaplewskysche Methode die beste ist, weit besser als die von Jochmann, Ketel, Spengler und Stroschein angewandten Methoden. Zahlen werden nicht angegeben.

Pinkus vergleicht 14 verschiedene Methoden und findet, daß die Mühlhäuser-Czaplewskysche Methode die beste ist. Danach kommen diejenigen von Stroschein und Serkowsky. Seine Technik ist jedoch recht mangelhaft. Er zählt in einer geringen Anzahl Felder und hat keine Sicherheit dafür, stets mit derselben Präparatdicke zu arbeiten. Man kann somit seinen Zahlen keine größere Bedeutung beilegen. Rosenblatt findet, daß die Mühlhäuser-Czaplewskysche Methode zwei- bis dreimal so viel Bazillen als die von Nebel und die von Dilg (Zentrifugierung in NaCl-Lösung) ergibt. Die beiden letztgenannten Methoden ergaben keine oder nur unbedeutende Konzentrationserhöhung.

Eigene Untersuchungen.

Die Zählmethode. Beim Beginn dieser Arbeit waren wir darüber im klaren, daß die erste Bedingung eines günstigen Resultates eine zuverlässige Meßmethode sein mußte. Wir arbeiteten dann die Methode aus, der wir uns seitdem ständig bedient haben. Die früher angewandten Methoden waren uns damals unbekannt. Es erwies sich nun, daß unsere Methode dasselbe Prinzip wie die Kleinsche anwandte; indessen will es uns erscheinen, daß sie verschiedentlich dieser Methode überlegen ist.

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß eine abgemessene Flüssigkeitsmenge auf eine Fläche bestimmter Größe ausgebreitet wird. Nach Eintrocknen wird die Anzahl von Bazillen pro Gesichtsfeld bestimmt, indem man wegen ungleichartiger Verteilung eine größere Anzahl Felder zählt und die Mittelzahl bestimmt. Zum Abmessen des Tropfens bedienen wir uns einer Leukozytenzählpipette, die bis zur 0.3-Marke gefüllt wird. Wir bekommen hierdurch ein Volumen, das durch Wägen mit destilliertem Wasser auf 9^{mm} bestimmt wurde. Mit Hilfe einer solchen Pipette läßt sich die Abmessung mit großer Genauigkeit vornehmen. Die spezifischen Eigenschaften der abgemessenen Flüssigkeiten machen sich weniger als bei Ösenabmessung geltend; sie bedingen indessen einen Fehler, indem der Rest, der in der Pipette hängen bleibt, nicht immer gleich groß ist. Der Fehler wurde auf folgende Weise bestimmt (Temp. 20° C):

A.

Die Pipette, mit dest. Wasser bis zur 1.0-Marke gefüllt, wiegt	6.7867 ^{gmm}
Die Pipette (leer und trocken) wiegt	6.7569 „
Der abgemessene Rauminhalt dest. Wassers wiegt somit	0.0298 ^{gmm}
Die Pipette wiegt nach erfolgtem Ausblasen des Wassers	6.7571 ^{gmm}
Die Pipette (leer und trocken) wiegt	6.7569 „
Der Rest, der in der Pipette hängen bleibt, wiegt also	0.0002 ^{gmm}

Der Rest ist $\frac{0.0002}{0.0298} \times 100$ Prozent = 0.67 Prozent des abgemessenen Volumens.

B.

Darauf wurde der Rest bei stark klumpigem und viskösem Bodensatz nach der Doppelmethode (betreffs dieser: vgl. später!) bestimmt.

Die Pipette, mit dem Bodensatz bis zur 1.0-Marke gefüllt, wiegt	6.7870 ^{gmm}
Die Pipette (leer und trocken) wiegt	6.7569 „
Der abgemessene Rauminhalt wiegt somit	0.0301 ^{gmm}

Die Pipette wiegt nach erfolgtem Ausblasen des Bodensatzes $6.7577 \text{ g}^{\text{rm}}$
 Die Pipette (leer und trocken) wiegt 6.7569 „
 Der Rest, der in der Pipette hängen bleibt, wiegt also . . $0.0008 \text{ g}^{\text{rm}}$

Der Rest macht $\frac{0.0008}{0.0301} \times 100 \text{ Proz.} = 2.63 \text{ Proz.}$ des abgemessenen Volumens aus.

Da die Ausmessung in allen Fällen eine gleichartige ist, und da die Viskosität und das Anhaften an dem Glase zwischen diesen beiden Außenpunkten sich bewegen dürfte, wird der Verlust somit höchstens

$$2.63 - 0.67 = 1.96 \text{ Prozent}$$

betragen.

Der größte Fehler, den wir auf diese Weise machen, ist demnach ein solcher von ungefähr 2 Prozent. Derselbe wird im wesentlichen diejenige Methode treffen, welche die höchsten Zahlen ergibt, nämlich die Doppelmethode, und die Zahlen 2 Prozent zu niedrig machen.

Die Normalfläche ist $\pi \cdot 100 \text{ mm}^2$ an Areal. Wir verwenden plan-geschliffene Objektträger, auf deren Unterfläche wir vermittelst eines Kautschukstempels eine Zirkelfigur von 20 mm Durchmesser absetzen. Die Oberfläche der Gläser wird mit einer dünnen Schicht Albumin-Glyzerin versehen. Der mit der Pipette abgemessene Tropfen wird auf dem Objektträger angebracht und möglichst gleichmäßig über die Normalfläche vermittelst einer Platinnadel ausgebreitet. Darauf wird der Objektträger auf eine plangeschliffene, wagerechte Glasplatte gelegt, bis der Tropfen eingetrocknet ist.

Das Präparat wird in einer Flamme fixiert, mit kochendem Karbolfuchsin gefärbt, mit Wasser gespült, 10 Sekunden lang mit 25 Prozent Schwefelsäure entfärbt. Nachfärbung mit Methylenblau (1:5000) 2 bis 5 Sekunden.

Der Fehler, welcher auf die Abmessung zurückzuführen ist, hat, wie gesagt, keine große Bedeutung. Es sind andere Fehlerquellen, die von größerer Bedeutung sind, nämlich: 1. die ungleichmäßige Verteilung der Bazillen, 2. die Schwierigkeiten bei der Definition des Objektes. Da die Bazillen verschiedene Länge haben und oft zusammenhängen, kann es Geschmackssache sein, ob man einen oder zwei Bazillen zählt. Wenn man einen Bazillenklumpen vor sich hat, läßt sich schwer sagen, ob darin z. B. 10 oder 12 Einzelindividuen enthalten sind.

Es handelte sich also darum, zu bestimmen, wie viele Felder man zu zählen hätte, um eine verlässliche Mittelzahl zu erhalten. Wir haben 100 Gesichtsfelder gezählt (auf zwei Präparate verteilt, 50 zusammen-

stoßende Gesichtsfelder in jedem). Die Genauigkeit ist aus Tabelle I ersichtlich und zeigte es sich, daß der Mittelfehler beim Zählen in 50 Feldern doppelt so groß war.

Für sämtliche Untersuchungen wurden dasselbe Mikroskop und die gleiche Linsenkombination (Leitz: $\frac{1}{12}$ Immersion, Okular 4, Tubuslänge 175 mm) angewandt.

Tabelle I.

Fehlerberechnung beim Zählen in 100 Gesichtsfeldern.

A. $\frac{1}{10}$ Standardemulsion II, Kulturbazillen. (Klumpen gerechnet = 1.)

5-Zählung.

Bazillen pro Gesichtsfeld	Differenzen	Quadrate
6.3	+ 0.6	0.36
6.7	+ 1.0	1.00
5.5	— 0.2	0.04
5.6	— 0.1	0.01
4.4	— 1.3	1.69
Summa 28.5		3.10

Mittelzahl: 5.7. Mittelfehler: $\sqrt{\frac{3.10}{4}} = 0.9$, d. h. 16 Prozent der Mittelzahl. Die Abweichungen fallen sämtlich innerhalb 2 mal des Mittelfehlers.

B. $\frac{1}{10}$ Standardemulsion II, Kulturbazillen. (Zählen der Einzelindividuen.)

5-Zählung.

Bazillen pro Gesichtsfeld	Differenzen	Quadrate
10.8	+ 0.4	0.16
9.1	— 1.3	1.69
9.8	— 0.6	0.36
11.5	+ 1.1	1.21
10.6	+ 0.2	0.04
Summa 51.8		3.46

Mittelzahl: 10.4. Mittelfehler: $\sqrt{\frac{3.46}{4}} = 0.9$, d. h. 9 Prozent der Mittelzahl. Die Abweichungen fallen sämtlich innerhalb 2 mal des Mittelfehlers.

C. Emulsion III (verdautes Expektorat).

10-Zählung.

Bazillen pro Gesichtsfeld	Differenzen	Quadrate
7.7	+ 0.3	0.09
8.1	+ 0.7	0.49
8.0	+ 0.6	0.36
7.1	— 0.3	0.09
6.8	— 0.6	0.36
7.0	— 0.4	0.16
6.7	— 0.7	0.49
7.1	— 0.3	0.09
7.8	+ 0.4	0.16
7.5	+ 0.1	0.01
Summa 73.8		2.30

Mittelzahl: 7.4. Mittelfehler: $\sqrt{\frac{2.30}{9}} = 0.5$, d. h. 7 Prozent der Mittelzahl. Die Abweichungen fallen sämtlich innerhalb 2 mal des Mittelfehlers.

Es zeigt sich somit, daß wir bei einer Mittelzahl von 7 bis 10 Bazillen pro Gesichtsfeld mit einem Mittelfehler von 0.5 bis 0.9 Bazillen pro Gesichtsfeld arbeiten, d. h. 7 bis 9 Prozent der Mittelzahl. Die Methode ist demnach recht genau; die Genauigkeit ist ungefähr dieselbe wie beim Zählen von Leukozyten in Zählkammer.

Der Fehler war am geringsten beim dritten Versuch. Der Grund hierzu ist ganz einfach der, daß die verwendeten Bazillen viel leichter zu zählen waren, weil sie größer waren und weit mehr getrennt lagen als die kleinen Kulturbazillen, die bei den Versuchen A und B zur Verwendung gelangten. Sämtliche Zahlen, die nachstehend aufgeführt sind, sind Mittelzahlen aus Zählungen von 100 Gesichtsfeldern.

Nachdem wir in dieser Weise eine brauchbare Meßmethode erhalten hatten, konnten wir zu den Untersuchungen selbst schreiten und stellten uns darauf folgende Aufgaben: 1. Untersuchung des Einflusses der Reagenzen auf die Tuberkelbazillen, 2. Untersuchung der verschiedenen Faktoren, von denen angenommen werden konnte, daß sie Einfluß auf die Sedimentierung ausübten, nämlich das spezifische Gewicht und die Viskosität der Flüssigkeit, die Größe des Bodensatzes usw., 3. direkter Vergleich der bekannten Methoden, 4. Untersuchung der Möglichkeit, Methoden mit besonders hoher Konzentrationsfähigkeit auszubilden.

Es ist selbstverständlich, daß alle Abmessungen möglichst sorgfältig mit genauen Pipetten vorgenommen wurden. Zur Abmessung von Ex-

pektoraten wurden jedoch Meßzylinder auf Grund der Konsistenz angewandt. Im übrigen wollen wir nicht auf alle technischen Details, welche die Genauigkeit der Arbeit bedingen, näher eingehen.

Der Einfluß der Reagenzen. Behufs Anstellung der Versuche wurde 1 Teil Emulsion II, verdünnt mit 9 Teilen Reagens, angewandt. Für $\frac{1}{10}$ Emulsion II ist die Mittelzahl der Bazillen pro Gesichtsfeld, wie oben nachgewiesen, 10.4. Der Mittelfehler ist 0.9.

Versuch 1.

Mittelzahl der $\frac{1}{10}$ Emulsion II 10.4.

Kalkwasser			8.4
0.2 Proz. NaOH	} Kochen 15 Minuten		11.5
1.0 „ NaOH			[0.03]
0.2 „ $\text{Ba}(\text{OH})_2$			9.7
1.0 „ $\text{Ba}(\text{OH})_2$			[2.9]
Kalkwasser + KOH (H. Petersen)			[7.4]. Nach 4 Tagen [3.9]
Essigsäure 10 Prozent, Stehenlassen 24 Stunden			10.0
Essigsäure 20 „ „ 48 „			11.3
Phenol . 25 „ „ 24 „			[6.1]
Pepsinverdauung 24 Stunden			12.5
Pankreatinverdauung 24 Stunden			9.3
Borax-Borsäurelösung 5 Stunden			9.1. Nach 16 Std. [6.9] nach 4 Tagen [6.4]

Die eingeklammerten Zahlen fallen außerhalb 3 mal des Mittelfehlers. Es zeigt sich also, daß 1 Prozent NaOH und 1 Prozent $\text{Ba}(\text{OH})_2$ einen ausgesprochenen schädlichen Einfluß ausüben. Ferner wird die Zahl etwas durch Phenol und Boraxborsäure verringert. Die Einwirkung von 1 Proz. KOH in der Kälte (H. Petersen) wirkt langsamer als Kochen mit Alkali.

Von den übrigen Zahlen fallen die 6 innerhalb 2 mal des Mittelfehlers, zwei gerade außerhalb 2 mal des Mittelfehlers. In allen diesen Fällen läßt sich also bei der angewandten Methode keine schädliche Wirkung der geprüften Reagenzen nachweisen. Die Verdauungsfermente, die schwachen Alkalilösungen von 0.2 Prozent, Kalkwasser und Essigsäure haben also keinen schädlichen Einfluß auf die Färbbarkeit der Tuberkelbazillen.

Es ist eigenartig, den großen Unterschied zu sehen, welcher zwischen 1 Prozent NaOH und 0.2 Prozent NaOH ist. In dem ersteren Falle werden fast alle Bazillen vernichtet, im zweiten Falle ist keine nachweisbare Wirkung zu spüren. Außerdem ist hier die Merkwürdigkeit, daß 1 Prozent NaOH die meisten Bazillen vernichtet, jedoch einen Rest von $\frac{1}{347}$ der ursprünglichen Anzahl zurückbleiben läßt. Es besteht also ein Unterschied der Widerstandsfähigkeit der Bazillen Alkali gegenüber.

Von Wichtigkeit ist es, dieses Verhältnis zu kennen, da man sonst, wenn man gut gefärbte Bazillen sieht, zu der Auffassung kommen könnte, daß die Tuberkelbazillen die Alkalibehandlung gut vertragen. Diesen Fehler haben kürzlich Auclair und Paris gemacht, was leicht verständlich ist, wenn keine Zählungen vorgenommen werden.

Wir kommen also zu dem Resultate, daß die meisten der angewandten Methoden an und für sich den Tuberkelbazillen nicht schaden, ausgenommen diejenigen von Ketel und H. Petersen. Bei den vergleichenden Versuchen mit verschiedenen Methoden haben wir natürlich die beiden letztgenannten Methoden ausgeschaltet.

Aus dem Versuche mit 0.2 Prozent NaOH geht hervor, daß Czaplewskys Modifikation (Neutralisierung mit Essigsäure) zwecklos ist. Wir haben ferner einen Versuch gemacht, um dieses direkt zu beweisen.

Wir fanden folgende Zahlen ($1/_{200}$ Emulsion II, Kochen mit 0.2 Prozent NaOH während 15 Minuten, die eine Probe nicht neutralisiert, die andere neutralisiert. Zentrifugierung 1 Stunde).

Versuch 2.

	Baz. pro Normal Gesichtsfeld.
Mühlhäuser	9.5
Czaplewsky	9.2

Wir erhielten also ganz dieselbe Zahl und haben daher immer später Biederts Methode in Mühlhäusers Form angewandt. Es muß übrigens bemerkt werden, daß wir bei diesen Versuchen ein längeres Kochen (15 Minuten) als notwendig anwandten. In Wirklichkeit kann man sich gut damit begnügen, daß man die Flüssigkeit aufkocht und danach abkühlen läßt. Es ist unnötig, aber nicht schädlich, länger zu kochen.

Faktoren, welche die Sedimentierung beeinflussen.

Die Bedeutung des Bodensatzes.

Daß der Bodensatz eine große Rolle bei dem Niederreißen der Bazillen spielt, ist etwas, was verschiedene Untersucher beobachtet und zu schätzen gewußt haben. Bei der Methode Mühlhäusers kann man geradezu sehen, wie die Bazillen in großen Mengen in den Präparaten liegen, in blaugefärbten Flocken eingeschlossen.

Wir haben auch durch direkte Versuche die Bedeutung des Bodensatzes klar zu machen versucht. Das sowohl bei diesen wie bei den späteren Versuchen angewandte Verfahren war folgendes: Es wurden immer

die gleiche Flüssigkeitsmenge (10^{ccm}) und Zentrifugengläser gleicher Form angewandt. Die Zentrifuge ist eine Wasserzentrifuge (Lentz) mit einem Diameter von 27^{cm} und einer Geschwindigkeit von 2- bis 3000 Umdrehungen in der Minute. Es wurde stets eine Stunde lang zentrifugiert. Hierauf wurde die Flüssigkeit abgegossen, und, um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde der Bodensatz mit Wasser verdünnt bis zu einem Volumen von 0.2^{ccm}. (Dieses Volumen war auf den Gläsern bezeichnet.) Nach sorgfältigem Umrühren wurden Proben für die Präparate entnommen.

Nun wurde folgender Versuch gemacht: Eine Bazillenemulsion bekannter Stärke ($\frac{1}{200}$ Emulsion II) wurde in Wasser zentrifugiert, teils allein, teils mit einem Zusatze von Eiter. Hierauf wurden die Bazillenzahl pro Gesichtsfeld, sowie der Idealwert, d. h. die Zahl, welche man erhalten würde, wenn alle Bazillen der Emulsion zu Boden gesunken wären, bestimmt.

Da $\frac{1}{200}$ Emulsion II 0.52 Bazillen pro Gesichtsfeld enthält, sollten bei dem idealen Sedimentieren $\frac{10}{0.2} \times 0.52$ Bazillen = 26 Bazillen pro Gesichtsfeld vorhanden sein.

Unter Ausbeuteprozent verstehen wir denjenigen Prozentsatz des Idealwertes, den die gefundene Zahl ausmacht.

Versuch 3.

	Gefundene Zahl	Idealwert	Ausbeuteprozent
Zentrifugieren in destilliertem Wasser	2.9	26	11
Zentrifugieren in destilliertem Wasser + Eiter .	9.0	26	35

Man sieht hieraus, daß das Vorhandensein eines Bodensatzes die Ausbeute von 11 auf 35 Prozent erhöht.

Ein ähnliches Resultat erhält man, wenn man zwei Proben miteinander vergleicht, von denen die eine nach dem Natronkochen nur eben neutralisiert, die andere dagegen durch Essigsäure übersättigt wird. Im letzten Falle kommt es zu einer Ausfällung, die den Bodensatz bedeutend vergrößert.

Versuch 4.

	Idealwert	Mühlhäuser, neutralisiert	Mühlhäuser, essigsauer
I. $\frac{1}{200}$ Em. II.	26	9.2 B. pr. Gesf. = 35 Proz.	17.5 B. pr. Gesf. = 67 Proz.
II. $\frac{1}{400}$ Em. II.	13	4.9 „ „ = 38 „	8.4 „ „ = 65 „

Bei beiden Versuchen erhält man dasselbe Resultat: Mit zunehmender Größe des Bodensatzes steigt die Anzahl der sedimentierten Bazillen.

Vielleicht ist es notwendig, hier darauf aufmerksam zu machen, daß die gefundenen Zahlen keine Nettozahlen sind, da ja die Bodensätze auf dasselbe Volumen (0.2 ^{cem}) verdünnt werden. Wenn man in der Praxis eine Methode anwendet, wird man selbstverständlich nicht den Bodensatz verdünnen, da hierdurch die Bazillenzahl pro Gesichtsfeld kleiner wird. Da nun die Vergrößerung des Bodensatzes wie eine Verdünnung wirkt, wird es an und für sich nicht vorteilhaft sein, den Bodensatz zu vergrößern. Es kann sich geradezu als schädlich erweisen, sofern die Zunahme des Bodensatzes größer ist als die Steigung des Ausbeuteprozentes. Das, worauf es ankommt, ist, einen Bodensatz zu erhalten, der klein ist, aber dennoch eine große Menge von den Bazillen der Flüssigkeit enthält. Der Wert einer Methode beruht natürlich auf einer hohen Bazillenkonzentration des Bodensatzes.

Die Bedeutung des spezifischen Gewichtes und der Viskosität der Flüssigkeit: Zur Untersuchung der Bedeutung des spezifischen Gewichtes haben wir Kochsalzlösungen von verschiedenen Stärkegraden angewandt und legten besonders Gewicht auf die Anwendung frisch filtrierter Lösungen und sorgfältig abgespülter Gläser, damit die Flüssigkeiten vollkommen flockenfrei sein konnten, da es sich darum handelte, jede „Bodensatzwirkung“ zu vermeiden.

Versuch 5.

¹/₅₀ Emulsion II (Bazillenzahl 2.1). Zentrifugierung 1 Stunde.

	Spezifisches Gewicht	Bazillenzahl	Idealwert	Ausbeuteprozente
Destilliertes Wasser . . .	0.999	22.3	105	21.2 Proz.
Chlornatriumlösung . . .	1.011	13.5	105	12.9 „
desgl.	1.022	10.3	105	9.8 „
desgl.	1.046	7.4	105	7.1 „

Man ersieht aus diesem Versuche, daß die Ausbeute mit steigendem spezifischem Gewicht sinkt. Das Resultat ist zusammen mit dem Ergebnis des folgenden Versuches in nachstehender Figur 1 graphisch dargestellt. Man sieht, daß die Kurve (die gezogene Linie) zuerst recht schroff hinabsinkt, sich dann der Abszissenachse nähert und mit derselben beinahe parallel verläuft.

Behufs Untersuchung der Bedeutung der Viskosität haben wir Gummi arabicum-Lösungen angewandt, deren Stärke derart gewählt wurde, daß sie dieselben spezifischen Gewichte wie die Chlornatriumlösungen des Versuches 5 hatten.

Versuch 6.

 $\frac{1}{50}$ Emulsion II (Bazillenzahl 2.1). Zentrifugierung 1 Stunde.

	Spezifisches Gewicht	Bazillenzahl	Idealwert	Ausbeute-prozente
Destilliertes Wasser . .	0.999	22.3	105	21.2 Proz.
Gummi Auflösung Nr. 1 .	1.011	10.6	105	10.1 „
desgl. Nr. 2 .	1.022	5.2	105	5.0 „
desgl. Nr. 3 .	1.046	2.4	105	2.3 „
desgl. Nr. 4 .	1.074	1.0	105	1.0 „

Fig. 1.

Sowohl aus den Zahlen als aus der Kurve (der punktierten Linie) ist ersichtlich, daß die Viskosität der Flüssigkeit die Ausbeute noch weiter verringert. Die Kurve hat eine ähnliche Form wie „die Kurve des spezifischen Gewichtes“, doch liegt sie niedriger. Da das spezifische Gewicht in den zusammengehörenden Bestimmungen dasselbe ist, und da die Viskosität bei den Versuchen über spezifisches Gewicht außer Betracht gelassen werden kann, hat man in dem Abstände zwischen den Punkten a' und a'' , b' und b'' , c' und c'' ein Maß für die Bedeutung der Viskosität. Beim spezifischen Gewicht 1.011 kann die Wirkung des spez. Gewichtes ausgedrückt werden durch:

$$a - a' = 21.2 - 12.9 = 8.3$$

und die der Viskosität durch

$$a' - a'' = 12.9 - 10.1 = 2.8.$$

Beim spezifischen Gewicht 1.022 wird

$$b' - b'' = 9.8 - 5.0 = 4.8 \text{ usw.}$$

Der Einfluß der Viskosität nähert sich bei einem spezifischen Gewicht von 1.074 dem Punkte, unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Sedimentierung = 0 zu machen.

Aus der Kurve ersieht man, daß der Einfluß des spezifischen Gewichtes bedeutender ist als derjenige der Viskosität. Das Verhältnis zwischen diesen beiden Faktoren ist recht gleichartig für die verschiedenen spezifischen Gewichte, ungefähr wie 3:1. Außerdem kommt noch hinzu, daß es sich in dem Versuche 6 um Lösungen von relativ hoher Viskosität handelt. Wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht, ist eine Gummilösung mit dem spezifischen Gewicht 1.011 viel visköser als die homogenisierten Expektorate, mit denen man zu tun hat.

Versuch 7.

(Viskositätsbestimmung von Gummilösungen.)

	Spezifisches Gewicht	Zeit in Sekunden	ρ
Destilliertes Wasser	0.999	22.8	1.0
Gummilösung Nr. 1	1.011	54.5	2.4
desgl. Nr. 2	1.022	94.0	4.2
desgl. Nr. 3	1.046	249.0	11.4
desgl. Nr. 5	1.099	1521.0	73.4

Die Bestimmungen wurden mit Hilfe eines Viskosimeters von der in Ostwalds „Grundriß der allgemeinen Chemie“ angegebenen Form ausgeführt. Die Dimensionen wurden nach einigen vorläufigen Versuchen mit einem kleineren Apparat berechnet. Das Fassungsvermögen desselben beträgt 12 ^{ccm} von dem oberen Rande des weiten Zweiges bis zur Marke unterhalb der Erweiterung des linken Zweiges. Diese Erweiterung mißt 1.75 ^{ccm}. Die Länge des Kapillares beträgt 25 ^{cm}, der Diameter ca. 1 ^{mm}. Man mißt die Zeit, die die Flüssigkeit gebraucht, um die Erweiterung (dc) oberhalb des Kapillares zu passieren. Die gefundene Zeit ist die Mittelzahl von zwei Bestimmungen. ρ ist die relative Viskosität mit Wasser als Einheit. Diese Größe wird aus der Formel:

Fig. 2

$$\rho = \frac{t \cdot s}{T \cdot S}$$

berechnet, wo t die gefundene Zeit ist, s das spez. Gewicht der Flüssigkeit, T und S die bzw. Werte des Wassers. Die Temperatur wurde während des Versuches konstant gehalten.

Spezifisches Gewicht und Viskosität bei verschiedenen Methoden: Bei den Versuchen wurde die gleiche Verdünnung in allen Fällen angewandt, nämlich 1 Teil Expektorat + 4 Teile Reagens. Die Stoffe sind in der Reihenfolge der Viskositätszahlen aufgeführt.

Versuch 8.
(Muko-purulentos Expektorat.)

	Spezifisches Gewicht	Zeit in Sekunden	ϱ
Destilliertes Wasser (ohne Expektorat) .	0.999	22.8	1.00
Pepsinverdauung in 24 Stunden . . .	1.009	24.0	1.06
Pankreatinverdauung in 24 Stunden . .	1.005	26.0	1.15
Natronkochen (0.2 Prozent) in 15 Min. .	1.006	26.0	1.15
Auto-Digestion ¹ in 24 Stunden	1.003	28.0	1.23
Borax-Borsäure. Schütteln	1.021	28.0	1.26
Destilliertes Wasser. Schütteln	1.002	29.0	1.28
Wasserstoffsuperoxyd	1.002	31.0	1.36

Es zeigt sich also, daß die Behandlung des Expektorates mit Borax-Borsäure oder Wasserstoffsuperoxyd ungefähr dieselbe Viskosität gibt wie das Schütteln mit Wasser. Demnach scheint es, als ob man die „schleim-auflösende“ Fähigkeit der betreffenden Stoffe in Zweifel ziehen darf. Auch die Behandlung mit kohlen-saurem Natron (Auto-Digestion) ergab eine recht visköse Flüssigkeit. Die anderen Stoffe, namentlich Pepsin-Salzsäure, ergaben dagegen eine deutliche Verringerung der Viskosität.

Bei Beurteilung dieser Zahlen muß man aber sicher vorsichtig sein. Es handelt sich ja nicht um homogene Mischungen, sondern um eine Aufschlemmung von festen und halbflüssigen Stoffen. Filtriert man eine solche Flüssigkeit, so erhält man geringere Werte für ϱ , Werte, die den wirklichen Verhältnissen nicht entsprechen.

Vergleicht man die Viskositätszahlen mit den Zahlen, welche wir für die Gummilösungen im Versuch 7 fanden, so zeigt es sich, daß die höchste Zahl im Versuche 8 1.4 ist, während die schwächste Gummilösung (Nr. 1) die Zahl 2.4 hatte. Der Einfluß, den die Viskosität des homogenisierten Expektorates auf die Sedimentierung ausübt, wird also wesentlich geringer.

¹ Auto-Digestion ist der Name einer neuen Homogenisierungsmethode, die folgendermaßen ausgeführt wird. Das Expektorat wird mit einer Lösung kohlen-sauren Natrons gemischt, und zwar so, daß die Mischung 0.2 prozentig wird. Wird 24 Stunden in den Thermostaten gestellt. Durch Bakterienwirkung und Autolyse der Eiterzellen wird das Muzin gespalten, und die Mischung wird dünnflüssig mit einem gelblichen Bodensatz. Es werden keine Fermente oder Antiseptika zugesetzt. Genauere Vorschrift siehe später.

sein als derjenige der Gummilösung Nr. 1. Eine Betrachtung der Kurve zeigt, daß dieser Einfluß im ganzen genommen nur gering ist.

Ausbeute bei den verschiedenen Methoden. Bei dem Versuche wurde ein stark purulentes Expektorat eines Patienten mit fötider Bronchitis verwendet. Bei allen Versuchen wurde die Verdünnung 1:10 angewandt und Bazillenemulsion II zugesetzt.

Versuch 9.
 $\frac{1}{100}$ Emulsion II (Bazillenzahl 1.04).

	Bodensatz in ccm	Bazillen pro Gesichtsfeld	Idealwert	Ausbeute
Biedert-Mühlhäuser . . .	ca. 0.05	15.1	52	30 Prozent
Wasserstoffsuperoxyd . .	„ 0.17	20.2	52	40 „
Spengler	„ 0.17	21.7	52	42 „
Pepsinverdauung	„ 0.10	27.6	52	54 „
Borax-Borsäure	„ 0.20	27.9	52	55 „
Auto-Digestion	„ 0.20	38.3	52	76 „

Man sieht, daß der Bodensatz und das Ausbeuteprozent am geringsten bei Biederts Methode ist; andererseits ist aber die Größe des Bodensatzes nicht das einzige, was für die Ausbeute entscheidend ist. So ist der Bodensatz von derselben Größe bei der Borax-Borsäure-Behandlung wie bei der Auto-Digestion. Die letzte Methode gibt immerhin eine größere Ausbeute, was besonderen Eigenschaften des Bodensatzes zugeschrieben werden muß.

Résumé: Wir gelangen also zu dem Resultat, daß man durch Zentrifugieren von Bazillenemulsion II in destilliertem Wasser in der angegebenen Weise¹ nur ca. 20 Prozent der gesamten Bazillenmenge im Bodensatz findet. Der Grund hierfür liegt in dem großen Reibungswiderstand zwischen der Flüssigkeit und den Bazillen. Eine bei weitem größere Ausbeute erhält man, wenn die Flüssigkeit einen Bodensatz enthält, indem man in diesem Falle bis zu 76 Prozent der Bazillen im Sediment erhält. Das spezifische Gewicht und die Viskosität der Flüssigkeit sind Faktoren, die die Sedimentierung

¹ Durch kräftiges Zentrifugieren mit großen Zentrifugen kann man fast die ganze Bazillenmenge sedimentieren. Durch kurzdauerndes Zentrifugieren mit den gewöhnlichen kleinen Handzentrifugen erhält man eine geringere Ausbeute, als wir bei unseren Versuchen erhielten.

beeinflussen; unter den vorliegenden Bedingungen handelt es sich stets um eine Verringerung der Ausbeute. Der Einfluß der Viskosität ist nur gering, der des spezifischen Gewichtes etwas größer, tritt aber doch zurück im Vergleich mit demjenigen des Bodensatzes.

Die Bedeutung der Bazillenkonzentration: Indem wir davon ausgingen, daß der Bodensatz der wichtigste Faktor beim Sedimentieren der Bazillen wäre, legten wir uns die Frage vor, welche Bedeutung die Bazillenkonzentration hätte. Es war schwierig, im voraus den Einfluß dieses Verhältnisses zu berechnen. Es könnte ja sein, daß ein bestimmter Bodensatz immer dieselbe absolute Bazillenmenge mit niederreißen würde, ob die Bazillenkonzentration groß oder klein wäre. Es wäre ja auch nicht unwahrscheinlich, daß der Bodensatz relativ mehr Bazillen bei schwachen Konzentrationen mit niederreißen würde.

Der Versuch zeigte indessen etwas anderes.

Es wurde die gleiche Expektoratmenge angewandt, so daß der Bodensatz genau der gleiche war bei allen Bestimmungen. Ein Teil tuberkelbazillenfreien Expektorates wurde nach Biedert-Mühlhäuser mit 8 Teilen 0.2 Prozent NaOH und 1 Teil Bazillenemulsion von genau abgemessener Stärke verdünnt. Kochen 15 Minuten. Nach dem Kochen wurde mit destilliertem Wasser bis auf das ursprüngliche Volumen nachgefüllt. Es wurden nun Proben von 10 ^{cem} herausgenommen, die in gewöhnlicher Weise 1 Stunde lang zentrifugiert wurden. Nach dem Abgießen wurde der Bodensatz wie gewöhnlich auf 0.2 ^{cem} verdünnt.

Versuch 10.

Bazillenkonzentration		Anzahl der Bazillen vor der Zentri- fugierung (berechnet)	Idealwert nach der Zentri- fugierung	Gefundene Zahl	Ausbeute- prozente
$\frac{1}{10}$	Emuls. II	10.36	518.0	—	—
$\frac{1}{100}$	„	1.04	52.0	15.1	29 Prozent
$\frac{1}{200}$	„	0.52	26.0	9.3	36 „
$\frac{1}{400}$	„	0.26	13.0	4.9	38 „
$\frac{1}{1000}$	„	0.10	5.2	1.3 ¹	25 „
$\frac{1}{10\ 000}$	„	0.01	0.52	0.17 ²	33 „

¹ 500 Felder gezählt.

² 300 Felder gezählt.

Es zeigt sich, daß die Ausbeute ungefähr gleich (25 bis 38 Prozent) bei den verschiedenen Konzentrationen ist. Wenn man die verschiedenen Fehlerquellen berücksichtigt, muß man zugeben, daß man, praktisch gesehen, stets dieselbe prozentuale Ausbeute erhält. Wir haben also hier ein Gesetz gefunden, das sich in folgender Weise ausdrücken läßt:

Wenn die Größe des Bodensatzes und die Flüssigkeitsmenge konstant bleiben, werden bei einer bestimmten Zentrifugierung Bazillenmengen sedimentiert, die der Bazillenkonzentration proportional sind.

Hieraus folgt nun einfach, daß Verdünnung von sehr schädlichem Einfluß ist, welches auch ganz richtig von Hempel hervorgehoben ist, jedoch ohne genauere Begründung. Nimmt man z. B. ein Expektorat, dessen Bazillengehalt, nach erfolgter Verdünnung mit 9 Teilen 0.2 Proz. NaOH, $\frac{1}{100}$ Emulsion II entspricht, und verdünnt es vor dem Kochen auf das doppelte Volumen, erhält man nur halb so viele Bazillen pro Gesichtsfeld (4.9), wie man ohne Verdünnung bekommen haben würde (9.3). Wir werden später — bei der Besprechung der Doppelmethode — sehen, von wie großer Bedeutung es ist, daß die Ausbeute der Bazillenkonzentration proportional ist. Es geschah im wesentlichen mit Rücksicht auf solche Methoden, daß wir diese Frage untersuchten; klar ist es aber, daß die Bedeutung der Verdünnung etwas ist, was alle Methoden angeht.

Nene Methoden.

(Auto-Digestion. Doppelmethode.)

Schon auf einem frühen Stadium dieser Arbeit erwogen wir die Möglichkeiten für Ausbildung von Methoden mit besonders hohem Konzentrationsvermögen. Der Gedanke, der am nächsten lag, war der, mit einer größeren Menge Expektorat anzufangen, vermitteltst einer oder anderen Methode zu homogenisieren und sedimentieren, und darnach den Bodensatz aufzulösen, um vermöge einer sekundären Sedimentierung noch weiter die Bazillen zu konzentrieren. Man mußte die Forderung an die einleitende Methode stellen, daß der Bodensatz viele Bazillen mit hinabreißen und von einer passenden Größe sein sollte, da es unpraktisch sein würde, mit einem sehr kleinen Bodensatz fortzuarbeiten. Als Nachbehandlung mußte eine Methode zur Verwendung kommen, die imstande wäre, den primären Bodensatz aufzulösen. Von diesen Betrachtungen und den bei vorgenannten Versuchen gewonnenen Erfahrungen ausgehend, wählten wir als erstes Glied die Auto-Digestion, die einen sehr bazillenreichen Bodensatz gibt. Wir konnten darauf rechnen, in diesem Bodensatz 80

bis 90 Prozent¹ der Bazillen des Expektorates zu haben. Als zweites Glied der Methode wurde Natronkochen angewandt. Ferner kam es darauf an, die günstigsten Verdünnungsverhältnisse festzustellen. Wir nahmen aus dieser Veranlassung mehrere Versuche vor zwecks Auffindens des anwendbaren Minimums für die Verdünnung bei der Auto-Digestion. Hier zeigte es sich, daß der Bodensatz in ausgezeichneter Weise noch bei einer Verdünnung: 1 Vol. + $\frac{1}{2}$ Vol. vermindert wurde, wenn nur die Menge von Na_2CO_3 genügend war. Dieses wurde durch Zusatz einer 0.6-prozentigen Lösung erreicht, wodurch die Mischung eine Stärke von 0.2 Prozent erhielt. Es kommt nämlich darauf an, daß die Flüssigkeit während des Aufenthaltes im Thermostaten nicht sauer wird, da sonst der Prozeß aufhört, und man erhält ebenso wie bei der Philippschen Methode einen Bodensatz, der ungefähr $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ des Expektoratsvolumens ausmacht. Bei der Auto-Digestion dagegen erhält man einen Bodensatz, der im allgemeinen nur ungefähr $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Expektoratsvolumens ausmacht.

Was den zweiten Teil der Behandlung anbetrifft, kam es natürlich in besonderem Grade darauf an, nicht zu sehr mit Natron zu verdünnen. Es zeigte sich, daß eine Verdünnung 1:5 verwendbar war, aber darunter konnte man nicht gut gehen. Wir haben 1 Teil Bodensatz + 4 Teile 0.25 Prozent NaOH angewandt, so daß die Mischung demnach 0.2 Proz. enthielt.

Das Verfahren wird also kurz ausgedrückt folgendes:

1. 1 Volum Expektorat (10 bis 15 ccm) wird in einem verkorkten Meßglas mit $\frac{1}{2}$ Volum 0.6 prozentiger Na_2CO_3 -Lösung vermischt. Die Mischung steht 24 Stunden lang in dem Thermostaten bei 37° C.

2. Der größte Teil der obenstehenden Flüssigkeit wird abgegossen und der Bodensatz in einem eingeteilten Zentrifugenglas zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgegossen.

3. 4 Vol. 0.25 Prozent NaOH werden 1 Vol. Bodensatz zugesetzt. Nach sorgfältigem Umrühren läßt man aufkochen.

4. Zentrifugieren.

Punkt 1 und 2 allein repräsentieren die „Auto-Digestion“. Die mit dieser „Doppelmethode“ angestellten Versuche ergaben sofort vorzügliche Resultate, die durch spätere Versuche stets bestätigt wurden. Wir haben

¹ Versuch 9 mit den sehr kleinen Kulturbazillen ergab 76 Prozent bei Auto-Digestion (1 + 9). Wir rechnen deshalb darauf, daß die Ausbeute bei den weit größeren Menschenbazillen größer ist. Die konzentriertere Form der Auto-Digestion (1 + $\frac{1}{2}$) wird auch größere Ausbeute liefern. Bei der Philippschen Methode bestimmten wir in einem einzelnen Versuche die Ausbeute auf 98 Prozent.

außer dieser Methode die meisten denkbaren Methoden-Zusammenstellungen als „Doppel-Methoden“ ausprobiert, und haben unter anderem auch Versuche mit verschiedenen anorganischen Fällungen angestellt. Nur eine einzige Methode: primäre Natronbehandlung, sekundäre Pankreatinverdauung hat gute Resultate ergeben; sie war indessen zu umständlich für den praktischen Gebrauch.

Vergleich verschiedener Methoden.

Bei diesen Versuchen wurde im ganzen dieselbe Technik, wie früher beschrieben, angewandt, nur mit dem Unterschiede, daß die Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren immer vollständig abgegossen und der Bodensatz ohne Verdünnung angewandt wurde, da es die Bazillenzahl des Bodensatzes ist, die interessiert, wenn man den Wert einer Methode beurteilen will, während die absolute Zahl von sedimentierten Bazillen gleichgültig ist.

Wir wollen an dieser Stelle mit einigen Worten das mikroskopische Aussehen des Bodensatzes besprechen, welches bei den verschiedenen Methoden abweichend ist. Bei dem Natronkochen werden die Zellen ganz aufgelöst, und man sieht nur blaufärbte Flocken, welche die meisten der Bazillen einschließen. Bei der Pepsinverdauung wird das Protoplasma aufgelöst, aber nicht die Kerne, welche man stark gefärbt im Bodensatz sieht. Bei der Pankreatinverdauung werden sowohl Zellen wie Kerne aufgelöst, bei der Mikroskopie sieht man wesentlich blaufärbte Körner und Bakterien. Borax-Borsäure- und Wasserstoffsuperoxydbehandlung wirken nicht sonderlich auf die Zellen ein, bei der Mikroskopie sieht man sie recht wohl erhalten. Bei der Auto-Digestion sieht man Bakterien und schwach gefärbte Kernreste.

Wir haben in den Versuchstabellen die Methoden mit dem Verfasser-namen genannt und die Verdünnung nebenbei angegeben. Bei Hempels Methode haben wir nur Wärmehomogenisierung und Zentrifugieren angewandt. Fällung mit Salzsäure und Brückes Flüssigkeit haben wir ausgelassen, da der Bodensatz für die Zählmethode ungeeignet und auch nicht besonders bazillenreich war. Philipps Methode haben wir angewandt nach Angabe des Originals, nur haben wir die Flasche mit einem Korkstöpsel versehen. Das Expektorat wird flüssig und setzt einen Bodensatz von $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ von dem ursprünglichen Volumen. Der Bodensatz läßt sich nicht viel durch Zentrifugieren verringern. Die Flüssigkeit reagiert stark sauer. Spenglers Methode haben wir in verschiedenen Verdünnungen angewandt mit einem Zusatz von 0.2 Prozent Na_2CO_3 und Pankreatin (Merk). Die Stärke der Sodalösung wird von Spengler nicht angegeben. Wir haben nicht, wie Spengler angibt, die Flüssigkeit während der Verdauung gewechselt.

Das Expektorat wurde stets vor den Versuchen sehr sorgfältig im Mörser durchgerührt. In dieser Weise gelang es, die Bazillenverteilung so gleichartig zu machen, daß die Zahlen in den homogenisierten Proben von ca. 10^{cem} gut übereinstimmen (siehe besonders Versuch 13).

Versuch 11.

Lebende Tuberkelbazillen. Muko-purulentos Expektorat.

	Bazillen pro Gesichtsfeld
Bazillenzahl des Expektorates. (Homogen. Philipp)	15.0
Mühlhäuser (1 + 9), vor dem Zentrifugieren	1.4
desgl. nach dem Zentrifugieren	16.3
Auto-Digestion (1 + 4)	26.3
Doppelmethode (1 + 4, 1 + 9)	57.1

Es zeigt sich bei diesem Versuche, daß Mühlhäusers Methode keine Anreicherung der Bazillenzahl ergab; die Zahl ist die gleiche, wie die des Expektorates. Die Auto-Digestion ergab eine Anreicherung von kaum zweimal. Die Doppelmethode ungefähr 4fache Anreicherung. Die Ursache, daß die Doppelmethode keine größere Anreicherung in diesem Versuche ergab, ist die, daß versehentlich die Verdünnung 1:10, anstatt die von 1:5 bei der Natronbehandlung angewandt wurde. Infolgedessen wurde die Zahl nur halb so groß, wie sie hätte sein sollen.

Um die Bazillenzahl des Expektorates (15.0) zu kontrollieren, nahmen wir eine Zählung der Portion vor, die mit Natron gekocht war. Da in dem Verhältnis 1:10 verdünnt war, sollten der Berechnung nach 1.5 vorhanden sein. Der Versuch ergab 1.4, also vollständig übereinstimmende Werte.

Versuch 12.

Muko-purulentos Expektorat (Bazillenzahl 0.1): 8 Teile.

Emulsion III (Bazillenzahl 7.4): 2 Teile.

Zahl des Expektorates $\left(0.08 + \frac{7.4}{5}\right)$	1.6
Schütteln mit Wasser (1 + 3)	0.7
Stroschein (1 + 3)	1.4
Hempel	3.0
Spengler (1 + 1)	3.1
Philipp	3.8
Auto-Digestion (1 + 2)	14.8

Die Emulsion III ist ein sehr bazillenreiches Expektorat, das während 8 Tagen pankreatinverdaut wurde. Es zeigte sich indessen, daß die Ba-

zillen weniger widerstandsfähig als gewöhnlich gegen Natronbehandlung waren; deshalb mußten wir die Versuche mit Mühlhäusers Methode und der Doppelmethode ausfallen lassen. Das Resultat des Versuches ist, daß Stroscheins Methode, wie auch einfaches Schütteln mit Wasser keine Anreicherung ergab. Hempels, Spenglers und Philipps Methoden ergaben 2fache Anreicherung, Auto-Digestion 9fache Anreicherung.

Versuch 13.

Lebende Tuberkelbazillen.

Purulentes Expektorat 1 Teil. Muköses Expektorat 2 Teile.

	Zahl des Expektorats	Zahl der Methode
Mühlhäuser (1 + 9)	2.4	4.4
Hempel	2.5	9.1
Philipp	2.9	22.6
Auto-Digestion (1 + 2)	—	12.9
Doppelmethode (1 + 2, 1 + 4)	—	29.1
Auto-Digestion (1 + $\frac{1}{2}$)	3.1	20.4
Doppelmethode (1 + $\frac{1}{2}$, 1 + 4)	—	61.8
Durchschnittszahl	2.7	

Es zeigt sich, daß die Bazillenzahlen in den verschiedenen Portionen des Expektorats gut übereinstimmen. Die Zahl wurde in den homogenisierten Expektoraten bestimmt. Das Verhältnis zwischen den verschiedenen Methoden ist etwas anders als in dem vorigen Versuche, was damit zusammenhängt, daß das Expektorat mucinöser ist. Philipps Methode gibt daher 8fache Anreicherung, fast dasselbe wie die Auto-Digestion und bedeutend mehr als die verdünnte Auto-Digestion (1 + 2). Mühlhäuser gibt fast 2fache Anreicherung, Hempel 3.4fache, die Doppelmethode 23fache.

Versuch 14.

Lebende Tuberkelbazillen. Muko-purulentes Expektorat.

	Bazillen pro Gesichtsfeld
Zahl des Expektorates	10
Philipp	43
Doppelmethode	210

Philipps Methode ergab hier 4fache Anreicherung, die Doppelmethode 21fache.

Versuch 15.

Lebende Tuberkelbazillen. Muko-purulentos Expektorat.

	Bazillen pro Gesichtsfeld
Zahl des Expektorates (Homogen. Philipp)	7·8
Spengler (1 + 1)	11·4
Auto-Digestion (1 + $\frac{1}{2}$)	29·4
Doppelmethode (1 + $\frac{1}{2}$, 1 + 4)	53·6

Man ersieht, daß die Auto-Digestion eine bedeutend höhere Zahl ergab als Spengler. Die Doppelmethode ergab 7fache Anreicherung.

Versuch 16.

Lebende Tuberkelbazillen. Muzinöseres Expektorat.

	Bazillen pro Gesichtsfeld
Zahl des Expektorates (Homogen. Philipp)	3·0
Spengler (1 + $1\frac{1}{2}$)	4·4
Auto-Digestion (1 + $1\frac{1}{2}$)	7·0
Auto-Digestion (1 + $\frac{1}{2}$)	8·5
Doppelmethode (1 + $\frac{1}{2}$, 1 + 4)	32·5

Auch bei diesem Versuche ist die Auto-Digestion Spengler überlegen. Die Doppelmethode gibt reichlich 10fache Anreicherung.

Versuch 17.

Lebende Tuberkelbazillen. Stark muzinöses Expektorat.

	Bazillen pro Gesichtsfeld
Zahl des Expektorates (Homogen. Philipp)	1·7
Spengler (1 Vol. Exp. + $\frac{1}{2}$ Vol. 0·6proz. Na_2CO_3 + 75 ^{te} Pankreatin)	7·6
Auto-Digestion (1 + $\frac{1}{2}$)	23·2

Der Versuch ergibt ein ähnliches Resultat wie Nr. 16, nur sind die Zahlen etwas größer, weil die Eitermenge gering war.

Um den Überblick zu erleichtern, haben wir in folgender Tabelle diese vergleichenden Versuche zusammengestellt und zwar derartig, daß die Zahlen zu Multipla der Bazillenzahlen des Expektorates umgerechnet sind. Sie geben also direkt an, wievielmals die Bazillenzahl bei den verschiedenen Methoden vermehrt wird.

	Versuch 11	Versuch 12	Versuch 13	Versuch 14	Versuch 15	Versuch 16	Versuch 17	Durchschnittszahl
Mühlhäuser	1.1	—	1.6	—	—	—	—	1
Stroschein	—	0.9	—	—	—	—	—	1
Hempel	—	1.9	3.4	—	—	—	—	3
Spengler	—	1.9	—	—	1.5	1.5	4.5	2
Philipp	—	2.4	8.4	4.3	—	—	—	5
Auto-Digestion	—	9.3	7.6	—	3.8	2.3	13.6	7
Doppelmethode	—	—	22.9	21.0	6.9	10.8	—	15

(In dem Versuch 11 sind die Zahlen für die beiden letzten Methoden ausgelassen, da die Verdünnung eine andere war als bei den späteren Versuchen.)

Man sieht, daß dieselbe Methode nicht immer dieselbe Zahl ergibt. Die Ursache hiervon ist der verschiedene Eitergehalt des Expectorates. Je größer der Eitergehalt, desto niedriger werden im allgemeinen die Zahlen, weil der Bodensatz verhältnismäßig groß wird. Bei muzinöseren Expectoraten kann z. B. Philipps Methode gute Resultate geben, während sie bei den mehr purulenten zurückbleibt, im Vergleiche mit der Auto-Digestion. Bei der Schätzung der Methoden gilt es deshalb festzustellen, welche der Methoden unter den wechselnden Verhältnissen die beste durchschnittliche Ausbeute liefert. Wir haben deshalb auch verschiedenartiges Expectorat bei den Versuchen verwendet. In der letzten Kolonne der Tabelle haben wir die Durchschnittszahlen der gefundenen Werte aufgeführt, die ein ungefähres Maß sind für die Leistungsfähigkeit der Methoden. Wir erhalten also folgende Reihenfolge:

- Nr. 1: Doppelmethode.
- Nr. 2: Auto-Digestion.
- Nr. 3: Philipps Methode.
- Nr. 4: Hempels Methode.
- Nr. 5: Spenglers Methode.
- Nr. 6: Mühlhäusers Methode.
- Nr. 7: Stroscheins Methode.

Wir haben uns nicht gedacht, daß die Doppelmethode als Normalmethode bei allen Expectoraten angewendet werden sollte. Dagegen will es uns vorkommen, daß an Stellen, wo viele Expectorate untersucht werden sollen (Diagnosestationen, Sanatorien usw.), durch Anwendung einer der einfachen Homogenisierungsmethoden, wie Nr. 2, 3, 4 oder 5, Zeit gespart werden kann. Nr. 6 und 7 kann man sicher außer Betracht lassen. Als besonders empfehlenswert heben wir die „Auto-Digestion“ hervor, die

leicht ausführbar ist und hohe Zahlen ergibt. Eine andere Methode, welche bedeutende Vorteile aufweist, ist diejenige Hempels (ohne die sekundäre Fällung angewandt). Sie ist sehr schnell, da sie nur 8 bis 10 Minuten erfordert, und hat außerdem den Vorteil, daß sie das Expektorat sterilisiert. Mit Hilfe eines größeren Wasserbades können eine ganze Anzahl von Expektoraten gleichzeitig behandelt werden.

Im allgemeinen wird man wohl damit anfangen, ein einfaches Ausstrichpräparat zu untersuchen. Sollte das Resultat ein- oder zweimal ein negatives sein, so sind wir der Meinung, daß man die Doppelmethode versuchen sollte, welche mit etwas Übung leicht und schnell auszuführen ist. Hierdurch hat man die 20 bis 30 fach größere Aussicht für ein positives Resultat, wenn sich überhaupt Tuberkelbazillen im Expektorat finden sollten. In dem Falle einer ungleichartigen Verteilung, muß hierzu das Plus gelegt werden, welches die Homogenisierung gibt.

Im Falle eines negativen Resultates wird die Doppelmethode 10 bis 20 gewöhnliche Untersuchungen ersetzen können, unter der Voraussetzung, daß das Expektorat nicht wesentlich hinsichtlich des Bazilleninhaltes variiert, sowie daß immer die gleiche Zeit und die gleiche Sorgfalt auf die Mikroskopie der Präparate verwandt wird. Die Doppelmethode wird also dem Untersucher viel Zeit sparen. Der negative Ausfall wird ein Resultat sein, welches einen gewissen Wert hat, indem es bedeutet, daß sich in dem betreffenden Expekorate keine Tuberkelbazillen oder jedenfalls nur äußerst wenige vorfinden. Im Gegensatze hierzu kann man, wie bekannt, dem negativen Resultate keine Bedeutung irgend welcher Art beimessen, wenn man nur ein gewöhnliches Ausstrichpräparat untersucht.

Wir besitzen keine große Erfahrung mit Bezug auf die praktischen Resultate der Doppelmethode, weil wir nur sehr wenige Patienten mit Lungentuberkulose in der Abteilung A haben. Es ist uns dennoch in einigen Fällen mit Hilfe dieser Methode gelungen, Tuberkelbazillen nachzuweisen, wo das Resultat bei einer Reihe sorgfältiger Untersuchungen früher negativ gewesen war, und wir möchten annehmen, daß in Tuberkuloseanstalten, wo sich immer derartige geeignete Fälle finden, ähnliche Erfahrungen gemacht werden.

Zum Schlusse danken wir unserem Chef, Hrn. Prof. Dr. Chr. Gram, daß er uns Gelegenheit gab, diese Untersuchungen im Laboratorium der Abteilung auszuführen, sowie auch für das Interesse, mit dem er stets unserer Arbeit folgte.

Literatur-Verzeichnis.

- Auclair et Paris, *Arch. de méd. expérim. et d'anat. pathol.* 1907. XIX.
 Beitzke, *Hygienische Rundschau.* 1902. XII. Nr. 1.
 Biedert, *Berliner klin. Wochenschrift.* 1886. Nr. 42. — 1891. S. 31.
 Czaplewsky, *Zeitschrift für Tuberkulose und Heilstättenwesen.* 1906. S. 387.
 Dahmen, *Münchener med. Wochenschrift.* 1891. S. 667.
 Hempel, Untersuchungen über den Nachweis von Tuberkelbazillen. *Inaug.-Diss.* Leipzig 1902.
 Jochmann, *Hygienische Rundschau.* 1902. XII. Nr. 11.
 Jousset, *Semaine médicale.* 1903. p. 14.
 Ketel, *Archiv für Hygiene.* 1892. Bd. XV. S. 109.
 Klein, *Centralblatt für Bakteriologie.* 1900. Abt. I. S. 834.
 Mühlhäuser, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1891. S. 282.
 Nebel, *Archiv für Hygiene.* 1903. Bd. XLVII. S. 57.
 Petersen, *Jahresbericht des Nationalvereins in Dänemark zur Bekämpfung der Tuberkulose.* 1906.
 Philipp, *Edinburgh med. Journal.* 1886. p. 409.
 Pinkus, *St. Petersburger med. Wochenschrift.* 1904. Nr. 33.
 Rosenblatt, *Hygienische Rundschau.* 1904. S. 670.
 Sörgo, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1903.
 Spengler, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1895. S. 244.
 Stroschein, *Mitteilungen aus Dr. Brehmers Heilanstalt.* 1889. S. 289.
-