

Neuere Methoden zum Nachweis von Tuberkelbazillen in Sputum und in pathologischen Sekreten und Geweben

メタデータ	言語: deu 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/38365

Neuere Methoden zum Nachweis von Tuberkelbazillen in Sputum und in pathologischen Sekreten und Geweben.

von

Dr. M. Kawai.

Unter den Methoden, über die wir zur Erkennung von tuberkulösen Erkrankungen verfügen, nimmt der Nachweis von Tuberkelbazillen in pathologischen Sekreten oder in anderem verdächtigen Material eine hervorragende Stelle ein.

Dieser Nachweis kann in dreifacher Weise geführt werden: Entweder auf dem Wege der mikroskopischen Untersuchung, was unter günstigen Verhältnissen sehr rasch und leicht zum Ziele führt, oder durch Einverleibung des verdächtigen Materials in den Körper eines für Tuberkulose empfänglichen Tieres, in welchem Falle aber der Befund erst nach Wochen erlioben werden kann, und schlieslich durch Verimpfung des Materials auf geeignete Nährböden und Züchtung der spezifischen Erreger. Die letzte Methode nimmt infolge des langsamen Wachstums der Tuberkelbazillen ebenfalls längere Zeit in Anspruch, ihr Gelingen hängt überdis von einer Reihe von Nebenumständen ab und sie lässt häufig im Stich. Bei der Wichtigkeit, die eine Frühdiagnose der Tuberkulose für Prophylaxie und Therapie besitzt, hat der direkte Nachweis der Krankheitserreger in Sekreten und Geweben die allergröste Bedeutung und man war daher von jeher bestrebt, die Methode des direkten Nachweises zu verfeinern und zu vervollkommen, um auf diesem Wege möglichst rasch und sicher zu einer Diagnose zu gelangen.

Sind nun die Erreger in dem betreffenden Material nicht allzu spärlich vorhanden, so ist ihr Nachweis, zum mindesten für den Geübteren, eine verhältnissmässig leichte Aufgabe. Aber selbst bei Sputumuntersuchungen, sogar bei Benutzung des gewaschenen Sputumkernes nach der Methode von Kitasato, gelingt das Auffinden von

Tuberkelbazillen nicht immer.

Schwieriger gestaltet sich der Nachweis der Koch'schen Bazillen, wenn sie in dem zu untersuchenden Materiale nur in vereinzelt Exemplaren enthalten sind, und es ist einleuchtend, dass Auffinden solcher spärlichen Individuen, z. B. in einer grossen Menge Sputum, vielfach nur einen Zufall darstellt oder überhaupt nicht möglich ist.

Zur Ueberwindung dieser Schwierigkeiten wurden verschiedenen Anreicherungsverfahren, wie z. B. die Züchtung auf elektiven Nährböden nach Hesse, u. s. w. ausgearbeitet und in Anwendung gebracht, aber wegen ihrer Unzuverlässigkeit bald wieder aufgegeben.

Jochman empfahl das Sputum wie eine Nährflüssigkeit zu behandeln und durch Bebrütung die Tuberkelbazillen anzureichern, jedoch führte auch diese Methode keineswegs immer zum erwünschten Ziele.

Das nächstangewandte Prinzip bestand darin, durch geeignete Prozeduren eine Konzentrierung oder Anhäufung der im Material befindlichen spärlichen Keime auf einen kleinen Raum herbeizuführen, um sie desto sicherer mikroskopisch nachweisen zu können. Eine solche Konzentration konnte nur bewerkstelligt werden entweder durch Aufschliessung der Sputummassen, d. h. durch Lösung des die Bazillen einhüllenden und trennenden Schleimes, oder durch einfache Homogenisierung mit nachfolgender Sedimentierung bzw. Zentrifugierung, so dass die vorhandenen Bakterien sich im Bodensatz angereichert vorfinden.

Von den ältern Anreicherungsverfahren möchte ich hier folgende erwähnen.

Aufschliessung des Sputums durch chemische Mittel mit nachfolgender Zentrifugierung und Untersuchung des Bodensatzes.

1. Biedert bewerkstelligte die Lösung des Sputums durch Kochen in Natronlauge.

2. Die Methode von Czaplewski ist eine Modifikation des Biederschen Verfahrens.

3. Pfuhl u. a. führten die Aufschliessung durch Kochen in Kalkwasser, Soda usw. herbei.

Eine andere Gruppe von Autoren erstrebte eine mechanische

Zerkleinerung der Sputumbestandtheile, so z. B. D a h m e n, I l k o - w i t s c h durch Koagulation vermittelt Säuren oder durch Kochen und nachfolgende Zerreibung des Koagulums.

Philipp, sowie C. Spengler suchten das Sputum mit einem künstlichen Verdauungsmittel aufzulösen und die Bazillen anzureichern.

Ein wesentlich feineres Verfahren der mechanischen Zerteilung des Sputums stellt die Methode von S o r g o und S a c h s - M ü c k e dar, die uns zugleich zur Besprechung der neuern Verfahren überführt.

Die genannten Autoren schüttelten das Sputum mit Wasserstoffsperoxyd aus. Das Wasserstoffsperoxyd besitzt die Eigenschaft, in Gegenwart gewisser organischer Substanzen eine Katalyse durchzumachen, und die bei dieser Reaktion entstehenden Kohlensäurebläschen bedingen bei ihren Aufsteigen eine Zerreiſung der Sputummassen.

Der Methode haftet jedoch der Fehler an, dass die Tuberkelbazillen an zwei Stellen deponiert werden, im Schaum und im Sediment, und dass durch die explosionsartig auftretende Gasentwicklung die ganze Prozedur gefährdet werden kann. S a c h s - M ü c k e hat selbst im J. 1907 mit vollem Recht diese Nachteile seiner Methode hervorgehoben.

Einen sehr wichtigen Fortschritt auf dem Gebiete der Sputumaufschliessung stellt die Methode von L a n g e und N i e t s c h e dar (März 1909). Gelegentlich ihrer Studien über Tuberkelbazillen wurden die Autoren auf das Verhalten dieser Bakterien zu wässrigen Medien aufmerksam. Sie fanden nämlich die auffällige Tatsache, dass in gleichmässigen wässrigen Aufschwemmungen von Tuberkelbazillen und anderen Bakterien beim Schütteln mit einem Kohlenwasserstoff, wie z. B. Petroläther, Benzin, Benzol, Toluol, Xylol, Ligroin u. s. w., eine vollständige Trennung der Tuberkelbazillen von den beigemengten Bakterien in der Weise stattfindet, dass erstere durch die aufsteigenden, spezifisch leichteren Kohlenwasserstofftröpfchen an die Oberfläche geführt werden und nach dem Aufhören der Schaumbildung ausschliesslich dort, an der Grenze zwischen Flüssigkeits- und Kohlenwasserstoffschicht, anzu-treffen sind, während die anderen Bakterien im Sediment abgelagert

werden.

Dieses Phänomen beruht auf der grösseren Adhäsion der die Tuberkelbazillen umgebenden Wachshülle zu den Kohlenwasserstoffen als zu der Suspensionsflüssigkeit.

Lange und Nietzsche suchten nun weiterhin auf Grund dieser Erscheinung, welche am besten bei Benutzung des Ligroins wegen seines entsprechenden spezifischen Gewichtes sich zeigte, eine Anreicherung der Tuberkelbazillen im Sputum durchzuführen. Dazu aber war die Homogenisierung des Sputums die notwendige Vorbedingung.

Als Homogenisierungsmittel wählten die Autoren Normal-Kalilauge, weil Kohlenwasserstoffe in diesem Medium sich am besten emulsiren lassen.

Im einzelnen gestaltet sich diese Methode in folgender Weise.

1) 5 cc. Sputum werden mit 50 cc. Normal-Natronlauge versetzt und bis zur Homogenisierung des Gemisches stehen gelassen.

2) Zusatz von 50 cc. Leitungswasser zu dem homogenisirten Produkte. Kräftiges Schütteln.

3) Zusatz von 2 cc Ligroin. Kräftiges Schütteln.

4) Erwärmen im Wasserbade auf 60–65° C. bis scharfe Abscheidung zwischen Ligroin und Flüssigkeit eingetreten.

5) Entnahme des Materials an der Grenzschicht zwischen Ligroin und Flüssigkeit und Uebertragung auf vorgewärmten Objektträger.

6) Färbung nach üblichen Methoden.

Im Verlaufe ihrer Untersuchungen fanden die Autoren weiterhin, dass auch Diphtherie- und Pseudodiphtheriebazillen sich ähnlich wie Tuberkelbazillen verhalten, wahrscheinlich ebenfalls infolge ihrer fettkörperhaltigen Membran.

Von weittragender Bedeutung und zwar nicht nur für den Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum allein, ist die von Uhlenhuth und Xyländer ausgearbeitete Antiforminmethode.

Das Antiformin ist eine Mischung von Alkalihyperchlorid und Alkalihydrat im Verhältnis von 1:1,5 oder von Eau de Javelle mit Zusatz von freiem Alkali. Wegen seiner stark schleimlösenden Wirkung

und seiner Fähigkeit, organische Substanzen verschiedener Art in kurzer Zeit zu zerstören, wurde das Antiformin schon früher von den Erfindern, den Ing. Victor Törnell und Axel Sjöo in Stockholm in Brauereibetrieben zur Reinigung und Desinfektion von Bierleitungen und Gährbottichen eingeführt.

Diese Wirkung beruht hauptsächlich auf dem Gehalt des Antiformins an unterchloriger Säure, die eine intensive Oxydation bedingt. Uhlenhuth fand nun die merkwürdige Tatsache, dass, während viele Bakterien, wie z. B. Typhus, Paratyphus, Diphtherie, Coli, Pneumokokken, Staphylokokken, Streptokokken u. s. w. in 2½ bis 5% Antiforminlösung in 5–10 Minuten wie Zucker restlos aufgelöst werden, die Tuberkelbazillen auch in stark konzentrierten Lösungen und selbst nach tagelangem Verweilen darin nicht angegriffen werden.

Diese Resistenz haben die Bazillen dem sie umhüllenden Wachspanzer zu verdanken, da Wachssubstanzen von Antiformin nicht angegriffen werden.

Uhlenhuth baute nun zunächst auf diese Beobachtung eine Methode auf, Tuberkelbazillen aus einem Gemenge von andern Bakterien z. B. im Sputum, im Eiter, in Organen u. s. w., zur Reinzüchtung zu bringen, was früher nur mit den allergrößten Schwierigkeiten erreicht werden konnte, ihm aber mittelst seiner Methode in vorzüglicher Weise gelang. Schliesslich benutzte Uhlenhuth das Verfahren, um mit seiner Hülfe eine Anreicherung der Tuberkelbazillen im Sputum zum Zwecke des mikroskopischen Nachweises herbeizuführen.

Dieses Verfahren ist von verschiedenen Autoren (Hüne Thilenius, Meyer, Seeman u. a.) vielfach nachgeprüft und vollauf bestätigt worden.

Die Methode wird im Allgemeinen in der Weise geübt, dass das zu untersuchende Material in eine verdünnte Antiforminlösung verwandelt und nach erfolgter Homogenisierung, zur Gewinnung eines Bodensatzes, centrifugirt wird.

Für den mikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum fügt man letzterem soviel Antiformin hinzu, dass eine 20–25% Antiforminsputumlösung entsteht, centrifugirt diese nach vollendeter

Homogenisirung, wäscht den Bodensatz wiederholt mit Kochsalzlösung aus, breitet ihn auf einen Objektträger aus und lässt das Präparat, am besten bei Brutraumtemperatur, trocknen. Schliesslich ist noch zu bemerken, dass die Antiforminsputumlösung so dünnflüssig beschaffen sein muss, dass die Tuberkelbazillen nicht durch eine zu starke Viskosität des Lösungsmittels am Absinken behindert sind. Wo es daher notwendig erscheint, kann jeweils der erwünschte Zustand durch einen weitem Zusatz von Wasser oder Antiformin erreicht werden.

Mittelst des in der geschilderten Weise ausgeübten Verfahrens war es auch uns gelungen, in Sputa, in welchem mit Hilfe der direkten mikroskopischen Untersuchung auch nach sorgfältigster Durchmusterung mehrerer Präparate Tuberkelbazillen nicht nachgewiesen werden konnten, die wenigen spezifischen Erreger verhältnissmässig leicht aufzufinden.

Die praktische Ausführung der Methode verläuft in folgender Weise.

- 1). 5 cc Sputum worden mit 12 cc Leitungswasser versetzt und dazu 3 cc (15%) Antiformin hinzugefügt.
- 2). Centrifugierung der homogenisirten Masse und wiederholtes Auswaschen des Bodensatzes mit physiologischer Kochsalzlösung.
- 3). Ueberbringen des Bodensatzes auf einen Objektträger.
- 4). Färbung der bei Brutraumtemperatur getrockneten Präparate.

Zur weiteren Fixirung können die Präparate nach den Angaben von Liemanns mit einer Lösung überstrichen werden, die aus 1 Theil geschlagenem Hünereiwiss und 20 Theilen Wasser besteht und welcher, um sie haltbar zu machen, 1% Formaldehyd beigegeben ist.

Bernhard hat die Methode der Isolirung der Tuberkelbazillen von Lange und Nietsche mit dem Verfahren von Uhlenhuth kombiniert. Anstatt der Natronlauge benutzte Bernhard für die Auflösung des Sputums das Antiformin, weil es viel rascher und energischer homogenisirt als Laugen, schüttelt aber die Lösung mit Ligroin aus. Die Anhäufung der Tuberkelbazillen findet bei diesem Verfahren, wie bereits früher erwähnt, an der Oberfläche statt, und zwar an der Grenzschicht des Ligroins und der Flüssigkeit, wo die Bakterien zum Zwecke des mikroskopischen Nachweises aufgesucht werden.

Das Verfahren wird wie folgt geübt.

- 1). Herstellung einer 15% Sputumwasserantiforminlösung.
- 2). Langsames Zusetzen von 2 cc. Ligroin zu 20 cc. Lösung. Kräftiges Schütteln.
- 3). Stehenlassen der homogenisirten Masse bei Zimmertemperatur oder bei 60° im Wasserbade bis scharfe Abscheidung erfolgt. Entnahme des Materials an der Grenzschicht. Uebertragung auf Objektträger.

Es empfiehlt sich, die Aufschüttelung des Sputums in einem Gefäße von nicht zu weitem Lumen vorzunehmen, damit die nach oben steigenden und dort sich ansammelnden Bakterien nicht auf eine zu ausgedehnte Fläche verteilt sind.

Das Ligroinverfahren kann natürlich für die Gewinnung von Material zu Kulturzwecken nicht benutzt werden, weil Tuberkelbazillen im Ligroin schon nach 20 bis 30 Minuten absterben.

Als dritte und letzte Methode sei an dieser Stelle das Verfahren von Hammerl genannt. Hammerl schliesst das Sputum mit Ammoniak auf, welchem 1% Kalilauge beigegeben ist. Zur Erniederung ihres spezifischen Gewichtes erhält die homogenisirte Masse einen Zusatz von Aceton.

Diese Methode arbeitet etwas prompter und rascher als die oben skizzierten Verfahren und wird in nachstehender Weise ausgeführt.

- 1). 5 cc. Sputum werden mit 25 cc. Ammoniak versetzt, welcher 1% Kalilauge enthält. Kräftiges Schütteln bis vollständige Homogenisierung eingetreten.
- 2). Zusatz von 5 cc. Aceton zu je 15 cc. dieser Lösung.
- 3). Zentrifugieren.
- 4). Uebertragung des Bodensatzes auf Objektträger, trocknen und färben.

*

*

*

Nachdem ich im Vorstehenden die älteren Methoden des direkten Nachweises der Tuberkelbazillen kurz gestreift und die wichtigeren neueren Verfahren und ihre theoretischen Grundlagen, soweit als es für

die gegenwärtige Arbeit notwendig erschien, dargelegt habe, gehe ich zu meinen eignen Versuchen über.

Auf Anregung des Herrn Prof. Kolle habe ich unter seiner Leitung und unterstützt von Herrn Dr. Tomarkin, Vorsteher der Untersuchungsstation des Institutes, die im einleitenden Teile erwähnten drei Methoden, die Antiforminmethode, das Antiformin-Ligroinverfahren und die Ammoniakmethode einer vergleichenden Prüfung unterzogen, um diejenige Methode ausfindig zu machen, die sich für den Gebrauch an der Untersuchungsstation des Institutes sowohl in betreff ihrer Resultate wie hinsichtlich ihrer leichten Ausführbarkeit am besten eignet.

Die Versuche sind seit August 1909 an einem verhältnissmässig reichem Material verschiedener Herkunft ausgeführt worden.

I

Der Nachweis von Tuberkelbazillen in Sputum und in anderem Material.

Die Untersuchung von Sputum mittelst der oben genannten Methoden erstreckte sich im Ganzen auf 112 Proben; von anderweitigem Material wurden 42 Proben untersucht. Als Beispiel der von mir befolgten Versuchstechnik und als Illustration für die Leistungsfähigkeit der einzelnen Verfahren führe ich folgende Fälle an.

1). Zähes Sputum; in den direkten Ausstrichen sind keine Tuberkelbazillen nachweisbar.

10 cc Sputum werden mit 32,5 cc. Leitungswasser und 7,5 cc. Antiformin versetzt, entsprechend einer 15% Antiforminlösung. Die Mischung wird für 2 Stunden stehen gelassen. Schon nach 15 Minuten ist fast vollständige Homogenisirung eingetreten. Die Hälfte der Lösung wird 30 Minuten centrifugirt, der Bodensatz mit gewöhnlichem Wasser ausgewaschen, auf einen Objektträger ausgebreitet und nach dem Trocknen mit Eiweisswasser bestrichen. Färbung nach Ziehl-Neelsen und mikroskopische Untersuchung mit dem Ergebniss, dass nunmehr Tuberkelbazillen in einer Anzahl gefunden werden, welche der 7.ten Stufe

der Gaffkyschen Skala entspricht.

Die andere Hälfte der Sputumantiforminlösung wird in ein ziemlich weites Reagenzglas gefüllt und nach Zusatz von 2 cc Ligroin kräftig geschüttelt. Die Emulsion bleibt 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, worauf von der Zwischenschicht 5 Oesen Material auf einen Objektträger übertragen werden. Bestreichen des getrockneten Präparates mit Eiweis, Färbung und mikroskopische Untersuchung.

Resultat: Der Gehalt an Tuberkelbazillen entspricht der 5 ten Stufe der Gaffkyschen Skala.

2). Dickes, geballtes Sputum. In den direkten Ausstrichen keine Tuberkelbazillen nachweisbar.

Herstellung einer 15% Antiforminlösung, 9 Stunden stehen gelassen, zentrifugiert u. s. w. Resultat: in 4 Präparaten nur vereinzelte Tuberkelbazillen nachzuweisen.

Das mit dem gleichen Sputum eingeleitete Ligroinverfahren ergab ein negatives Resultat.

3). Schleimiges Sputum. In direkten Ausstrichen keine Tuberkelbazillen.

Antiforminverfahren. Es fällt auf, dass die Sputumlösung dunkelgrün gefärbt erscheint.

Resultat: 4-5 Tuberkelbazillen in jedem Präparat. In den Präparaten, welche nach dem Ligroinverfahren hergestellt waren, konnte nur ein einziger Tuberkelbazillus gefunden werden.

In betreff der Ammoniakmethode ist zu bemerken, dass mitunter, trotz längerer Einwirkung des Lösungsmittels und gründlichem Schütteln, keine vollständige Homogenisierung der schleimigen Beimengungen erfolgt. In solchen Fällen muss durch einen weiteren Zusatz von Ammoniak nachgeholfen werden, bis völlige Lösung eintritt.

Was die Gesamtleitung der Anreicherungsverfahren bei dem von mir untersuchten Material anbetrifft, so gibt darüber die nachstehende Tabelle I Auskunft, in welcher alle Proben, die nach sämtlichen Methoden, inbegriffen der direkten Untersuchung, entweder ein positives oder ein negatives Resultat ergeben hatten, derjenigen Gruppe von Proben gegenübergestellt sind, bei denen nur vermittelt der Anreicher-

ung Tuberkelbazillen gefunden wurden.

Tabelle I

Resultat der mikroskop. Unters.	Sputum		Anderes Material	
Alle Methoden +	31		12	
Alle Methoden -	67		20	
Direkt Antiformin u. s. w. +	14		5	
Direkt Antiformin u. s. w. -	0		5	
Im Ganzen	112		42	

Diese Zusammenfassung besagt, dass in 14 unter insgesamt 112 Sputumuntersuchungen (12,5%) ein positiver Befund einzig mit Hilfe der Anreicherungsverfahren erhoben werden konnte.

Bei der Untersuchung des anderweitigen Materials ergab sich die paradoxe Tatsache, dass zwar in 5 Proben bloss durch die Anreicherungsverfahren die Anwesenheit von Tuberkelbazillen nachgewiesen werden konnte, dass hingegen in drei anderen Proben die direkte Untersuchung positiv ausfiel und die Anreicherung zu negativen Ergebnissen führte. Vielleicht kann dieser widersprechende Befund dadurch erklärt werden, dass die Tuberkelbazillen durch die nachhaltige Verreibung im Porzellanmörser bei der Vorbereitung des Materials in dem Masse beeinflusst wurden, dass sie nachträglich der auflösenden Wirkung des Antiformins verfielen.

Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Bazillen in solchen Produkten gar nicht selten in deformiertem und gekörntem Zustande angetroffen werden.

Dass Tuberkelbazillen in der That trotz ihrer Resistenz unter dem Einflusse des Antiformins gewisse Veränderungen erleiden, habe ich bei Sputumuntersuchungen mehrfach beobachtet, indem in dem Sediment häufig körnig deformierte Bazillen gefunden

wurden, während das Ausgangsmaterial hauptsächlich normal beschaffene Individuen enthielt.

Die Tabelle II giebt Aufschluss über den Anteil der einzelnen Verfahren an den ausschliesslich mit ihrer Hilfe ermittelten positiven Befunden. Obwohl die Zahl der Untersuchungen, bei welchen die verschiedenen Methoden in Wettbewerb traten, keine grosse ist, so lässt sich doch daraus mit einiger Deutlichkeit der Wert der einzelnen Verfahren erkennen.

Tabelle II

Antiformin +	1	
Ligroin u. Ammoniak -		
Ligroin +	0	
Antiformin u. Ammoniak -		
Ammoniak +	4	
Antiformin u. Ligroin -		
Antiformin u. Ligroin +	2	
Ammoniak(nicht ausgeführt)		
Antiformin u. Ammoniak +	3	
Ligroin -		
Antiformin +	3	
Ammoniak u. Ligroin -		
Alle Methoden +	1	
Im Ganzen	14.	

Man ersieht hieraus, dass das Antiformin an diesen 14 positiven Fällen 10 mal beteiligt ist (71%), das Ligroin nur 3 mal (21%), während mittelst des Ammoniakverfahrens, das wegen zu geringen Mengen des zur Verfügung stehenden Materials nur in 9 Fällen von 14 zur Anwendung kam, 8 mal (88%) ein positiver Befund erhoben wurde. Das Ligroinverfahren scheint demnach die geringste Leistungsfähigkeit zu besitzen, während die Ammoniakmethode dem Antiforminverfahren zum mindesten gleichkommt.

Die folgende Tabelle III enthält das Material für die genauere Bewertung der einzelnen Verfahren nach dem Grad der mit ihrer Hilfe

herbeigeführten Anreicherung der Tuberkelbazillen, und die Tabelle IV dient dem gleichen Bestreben, nur dass hier eine Gruppe von Fällen ausgewählt wurde, welche auch bei der direkten Untersuchung sich als positiv erwiesen hatte, um den Vorzug der Anreicherungsverfahren gegenüber dem direkten Nachweis auch in quantitativer Beziehung zu illustriren. Als Masstab des quantitativen Befundes dienten die Zahlen der Gaffkyschen Skala.

Aus der Tabelle III kann ein sicherer Schluss in betreff der quantitativen Leistungsfähigkeit der einzelnen Methoden nicht gezogen werden, hingegen ergibt sich aus Tabelle IV die grosse Ueberlegenheit der Anreicherungsverfahren gegenüber dem direkten Nachweis auch mit Bezug auf die quantitative Leistung. Die grösste Anhäufung der Bazillen scheint im Ammoniak- und im Antiforminsediment statzufinden.

Tabelle III

No	Direkt	Antiformin	Ligroin	Ammoniak
b.	--	+VII		
K.	—	+ 1—2 Bazillen in vielen Präp.	—	
S.	—	+V	+III	
C!	—	+VI	+IV	+IV
H!	—	—	—	+I
N!	—	+VIII	—	—
S.	—	—	—	+I
T!	—	+ 2 Bazillen in 3 Praep.	—	+VII
12.	—	—	—	+IV
13.	—	—	—	+V
110.	—	+I		+IV

122	—	+II	+II	
131	—	+II		
6	—	+V	—	+V

Tabelle IV.

No	Direkt	Antiformin	Ligroin	Ammoniak
	IX	2mal soviel wie direkt.	2mal soviel wie direkt	
T.	VII	VIII	VIII	
L.	X	2mal soviel wie direkt.	2mal soviel wie direkt	
T.	V	X	VIII	
V.	VII	X	IX	
P.	IX	X	X	X
Y.	VII	VII	VII	VIII
25	VII	IX	VIII	X
101	II	II	VIII	V
104	VII	X	IX	VIII
143	VI	VII		
144	I	VI		
153	I			II

II.

Ueber das Schicksal der Begleitbakterien in
Sputumantiforminlösungen.

Nach den Untersuchungen von Uhlenhuth werden die meisten Bakterien, mit Ausnahme der Säurefesten, schon durch schwache Antiforminlösung „restlos wie Zucker“ in kürzester Zeit aufgelöst.

So werden z. B. Staphylokokken in 2% Antiformin schon nach ca. 7 Minuten, in 1% Lösung nach etwa 16 Minuten zerstört.

Sehr leicht lösen sich ferner Streptokokken, Pneumokokken, Meningokokken und Gonokokken. Etwas resistenter verhalten sich Rothlauf- und Milzbrandbakterien. Junge Kulturen des Milzbrandes lösen sich in 2% Antiformin erst nach 20 bis 45 Minuten.

Eine solche Auflösung von Bakterien durch chemische Agentien ist ein sehr auffallendes und interessantes Phänomen und wird mit Recht als eine „sichtbare Desinfektion“ bezeichnet.

Meine Untersuchungen in dieser Richtung beziehen sich auf Sputa, die in 15% Antiforminlösungen umgewandelt und der Einwirkung des lösenden Mittels 30 Minuten bis 2 Stunden ausgesetzt waren. Die Resultate dieser Untersuchung sind in der folgenden Tabelle V. enthalten.

Tabelle V.

No	Bakterien in direkt. Ausstr.	Bakterien in Antiformin	No	Bakterien in direkt. Ausstr.	Bakterien in Antiformin
1	Coccen Stäbchen	—	26	viele Coccen	—
2	zahlreiche Diplococcen	—	27	Stäbchen Coccen	—
3	Diplococcen	—	28	Diplococcen	Culturen positiv
4	Coccen Stäbchen	—	29	Diplococcen Staphylococcen	—
5	Pneumococcen	—	30	Streptococcen Staphylococcen	—

6	Diplococcen	einige Diplococcen	31	Streptococcen Staphylococcen	—
7	Diplococcen	—	32	Diplococcen Stäbchen	—
8	Diplococcen	—	33	Staphylococcen Diplococcen	—
9	Diplococcen	vereinzelte Diplococcen	34	Staphylococcen Diplococcen	—
10	Coccen	—	35	Diplococcen	—
11	Streptococcen	—	36	Stäbchen	—
12	Diplococcen Tetragenus	—	37	Diplococcen Staphylococcen	—
13	Coccen	—	38	Diplococcen	—
14	Diplococcen Tetragenus	—	39	Diplococcen	—
15	Staphylococcen	Wenige Sta- phylococcen	40	Diplococcen Stäbchen	—
16	Diplococcen	—	41	Diplococcen Stäbchen	—
17	Coccen	—	42	Pneumococcen	—
18	Coccen	—	43	Diplococcen	—
19	viele Coccen	—	44	Streptococcen Diplococcen.	—
20	viele Diplococcen	—	45	Diplococcen	—
21	Diplococcen	—	46	Diplococcen	—
22	viele Coccen	—	47	Diplococcen Streptococcen	—
23	viele Coccen	—	48	Diplococcen	—
24	Stäbchen Staphylococcen	—	49	Diplococcen Streptococcen	—
25	Diplococcen	—	50	Stäbchen Coccen	wenige Stäbchen

Tabelle V.
(Fortsetzung)

No	Bakterien in direkt. Ausstr.	Bakterien im Antiformin
51	Stäbchen Coccen	—
52	Diplococcen Staphylococcen	—
53	Staphylococcen Stäbchen	—
54	Staphylococcen	—
55	Staphylococcen Stäbchen	—
56	Diplococcen Streptococcen	—
57	Diplococcen Staphylococcen	—
58	Diplo-, Staphylococcen Tetragenus	—
59	Diplococcen Staphylococcen	—
60	Diplococcen Streptococcen	—
61	Diplo-, Staphylo-, Streptococcen	—
62	Diplococcen	—
63	Diplococcen	—

Man ersieht hieraus, dass unter 64 mit Antiformin behandelten Sputa nur 4 mal die Begleitbakterien mittelst Färbung, und nur 1 mal durch Kultur nachgewiesen werden konnten. Die Ligroinmethode verhielt sich ganz gleich, hingegen blieben die Bakterien in den Ammoniakbodensätzen meistens intakt.

III.

Der Nachweis von Tuberkelbazillen in
tierischen Organen und in patholo-
gischen Sekreten.

Uhlenhut empfahl für die Auflösung von festem pathologischem Material eine 15% Antiforminlösung. Mit dieser Lösung gelang es ihm, sogar kompakte Kothballen schon 8 Stunden aufzulösen. Ich habe mittelst der Anreicherungsverfahren in 26 Fällen Organe von Tieren untersucht, die mit tuberkelbazillen-haltigem Material geimpft worden waren, und in 20 Fällen verschiedene menschliche Sekrete.

A. Die Untersuchung von Organen.

Das Verfahren zur Auflösung von Organen ist nicht so leicht durchzuführen, wie Homogenisierung des Sputums. Es bedarf vor der Einleitung des eigentlichen Auflösungsprozesses gewisser Vorbereitungen, die hier erwähnt sein mögen.

1. Zunächst werden die Organstücke mit Scheere oder Messer möglichst fein zerschnitten. Bei chronischen Prozessen, wo die verkästen oder verkalkten Knoten von einer bindegewebigen Kapsel umgeben sind, muss diese Hülle entfernt werden, weil sie sich im Antiformin schlecht löst.

2. Das zerkleinerte Material wird im Porzelmörser gründlich verrieben.

3. Zusatz von 20% Antiformin zu dem Verreibungsprodukt in 5—7 facher Menge.

4. Centrifugieren der homogenisierten Lösung u. s. w. wie bei Sputumuntersuchungen.

Organe, welche festes, elastisches Bindegewebe enthalten, wie z. B. Lungen oder Drüsen sind entweder schwer verreibbar oder schwer löslich, weshalb häufig nach 5 stündiger, ja sogar nach 10 stündiger

Einwirkung des Lösungsmittels noch hellgequollene Gewebsetszen in den Lösungen wahrgenommen werden können. Sehr leicht in dieser Beziehung ist die Verarbeitung von Niere, Leber und Milz.

Organe, die in Fettgewebe eingebettet sind, müssen vor der Verarbeitung von dieser Hülle befreit werden, weil sich im Antiformin nicht löst und als seifenähnliche Masse zurückbleibt. Derartige Fetzen und Partikel können nachträglich noch durch Filtration mittelst entfetteter Watte, die für Tuberkelbazillen nicht durchgängig ist, aus der Flüssigkeit entfernt werden.

In der beschriebenen Weise habe ich im ganzen 26 Fälle untersucht, meistens tuberkulöse Drüsen, aber auch andere tuberkulöse Tiere, wie Milz, Leber, Lungen, Niere, Nebenhoden u. s. w. In einem Fall wurde ein Perlsucht-knoten vom Rinde untersucht.

Das untersuchte Material stammte hauptsächlich von Meerschweinchen, in einer kleineren Anzahl der Fälle von Kaninchen und in je einem Falle vom Rinde und vom Menschen.

Wie die Tabelle VI zeigt, wurden unter 13 Fällen, bei welchen die direkte Untersuchung ein negatives Resultat ergeben hatte, mittelst der Antiforminmethode 5 mal Tuberkelbazillen nachgewiesen. Auch war die Zahl der im Anreicherungsverfahren ermittelten Bakterien eine bedeutend grössere als beim direkten Nachweis.

Dem gegenüber stehen die bereits früher erwähnten Fälle, wo die direkte Untersuchung positiv und das Anreicherungsverfahren negativ war. Die mutmassliche Ursache für dieses Verhalten ist bereits früher angedeutet worden.

Tabelle VI.

No	Art d. Organe	Tier	Direkt	Antiformin
1	Milz	Meerschweinch.	—	+ X
2	Drüsen	„	—	—
3	Perlsucht-knoten	Rind	+ VIII	+ X

4	Lunge	Kaninchen	+	—
5	Niere	„	+IV	+VI
6	Nebenhoden	„	+V	+IX
7	Perlsucht-knoten	Rind	+IX	+IX
8	Drüsen	Meerschweinch.	—	+VII
9	Drüsen	„	+X	+VII Ligroin
10	Leber	Kaninchen	—	+VII
11	Pleura	„	—	—
12	Drüsen	Meerschweinch.	—	+VII
13	Drüsen	„	+III	+VI
14	Drüsen	„	—	—
15	Drüsen	„	—	—
16	Drüsen	„	—	—
17	Lunge	Kaninchen	—	—
18	Drüsen	Meerschweinch.	+V	—
19	Lunge	„	+I	+I
20	Lunge	„	+IX	+ wie Reincultur
21	Drüsen	„	+V	+ körnig
22	Niere	„	+IV	+X
23	Leber	„	—	+I
24	Leber	„	—	—
25	Drüsen	Mensch	—	—
26	Leber	Meerschweinch.	+I	—

B. Die Untersuchung von
pathologischen Sekreten.

Wie aus der nachfolgenden Tabelle VII zu ersehen ist, erstreckte sich die Untersuchung hauptsächlich auf Urin und Eiter, je einmal auf Cerebrospinal- und Ascitesflüssigkeit und ein mal auf Stuhl.

Urine und die anderen Körperflüssigkeiten wurden zuerst zentrifugirt und die Sedimente mit Antiformin behandelt, Eiter und Stuhl hingegen gelangten ohne weiteres zur Verarbeitung.

Tabelle VII.

No	Art des Materials	Direkt	Antiformin
1	Eiter einer Pyonephrose	—	—
2	Urin	—	—
3	Urin	—	—
4	Ascites	—	—
5	Absesseiter	—	—
6	Drüseneiter	—	—
7	Urin	—	—
8	Urin	—	—
9	Urin	—	—
10	Drüseneiter	—	—
11	Stuhl	—	—
12	Urin	+ VII	+ VII
13	Urin	—	—
14	Drüseneiter	+ I	+ VI

15	Cerebrospinalflüssigkeit	—	—
16	Drüsengewebe.	—	—

Diese Untersuchung hat nichts Bemerkenswertes gebracht, da die beiden einzigen positiven Ergebnisse auch durch die direkte Untersuchung ermittelt wurden. Ich habe den Eindruck gewonnen, dass die Anreicherungsverfahren für die Untersuchung von dickflüssigem Material, wie z. B. Eiter, sich sehr gut eignen; hingegen scheint mir ihre Anwendung bei leicht zentrifugirbarem Material, wie Urin, überflüssig.

IV.

Die Widerstandsfähigkeit der Tuberkelbazillen gegenüber Antiformin.

Uhlenhuth und Kersten hatten bei ihren Versuchen wiederholt aus Sputum und Organen, die mit Antiformin aufgelöst waren, Kulturen des Tuberkelbazillus gezüchtet.

Im einzelnen sollen sich Tuberkelbazillen in 20% Antiformin 4 Tage und in 8% Lösungen 8 Tage lebensfähig und infektionstüchtig erhalten können.

Bei meinen Versuchen habe ich das Infektionsmaterial— 5 Sputa und einmal Drüse einer perlsüchtigen Kuh— in eine mehr oder weniger konzentrierte Antiforminlösung verwandelt und das Sediment, nach verschieden langer Einwirkungsdauer des Lösungsmittels, wiederholt ausgewaschen und empfänglichen Tieren, vorwiegend Meerschweinchen unter die Bauchhaut in der Inguinalgegend verimpft.

Im nachstehenden führe ich die einzelnen Versuche an und die tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Versuch.

Eiteriges Sputum. Direkte Ausstriche positiv.

Behandelt mit 15% Antiformin

während 1 Stunde.

Bodensatz verimpft auf

Meerschweinchen a) Gew. 620 gr.

Nach 6 Wochen getötet.

Sektion : Inguinal- und Mediastinaldrüsen vergrößert.

Alle Organe frei von tuberkulösen Veränderungen.

Meerschweinchen b) Gew. 580 gr.

Nach 6 Wochen getötet.

Sektion : Tracheal- und Inguinaldrüsen vergrößert.

Alle Organe frei.

2. Versuch.

Dickgeballtes Sputum. Direkte Ausstriche positiv.

Behandelt mit 10% Antiformin

während 2 Stunden.

Bodensatz verimpft auf

Meerschweinchen Gew. 270 gr.

Nach 4 Wochen spontan eingegangen.

Sektion : Leistendrüsen beiderseits vergrößert.

Sonst keine Veränderungen.

3. Versuch.

Eiteriges Sputum. Direkte Ausstriche positiv.

Behandelt mit 10% Antiformin

während 2 Stunden.

Bodensatz verimpft auf

Meerschweinchen

Nach 13 Tagen spontan eingegangen.

Sektion : Pneumonie. Keine tuberkulöse Veränderungen.

4. Versuch.

Drüse einer persüchtigen Kuh Tuberkelbazillenbefund : Gaffky IX.

Material während 2 Tage im Brutschrank aufbewahrt.

Behandelt mit 20% Antiformin

während 3 Stunden.

Bodensatz verimpft auf

Kaninchen. Gew. 1280 gr.

Nach 50 Tagen getötet.

Sektion : Lungen unverändert. In der Leber deutliche Knoten, käsige Eiterherde und Narbenbildungen.

5. Versuch.

Sputum. Direkte Ausstriche positiv.

Behandelt mit 20% Antiformin

während 3 Stunden.

Bodensatz verimpft auf

Kaninchen Gew. 1300 gr.

Nach 40 Tagen spontan eingegangen.

Sektion : Hochgradige käsige Pleuritis. Alle Organe intakt.

6. Versuch.

Dünneitriges Sputum. Direkte Ausstriche positiv.

Behandelt mit 15% Antiformin

während 6 Stunden.

Bodensatz verimpft auf

Meerschweinchen a. Gew. 510 gr.

Nach 6 Wochen getötet.

Sektion : Inguinaldrüsen ziemlich stark vergrößert.

Sonst keine Veränderungen.

Meerschweinchen b. Gew. 630 gr.

Nach 6 Wochen getötet.

Sektion : Linke Inguinaldrüse deutlich vergrößert; im Antiforminsediment derselben zahlreiche Tuberkelbazilen nachweisbar.

7. Versuch.

Eitriges Sputum. Direkte Ausstriche positiv.

Behandelt mit 15% Antiformin

während 24 Stunden.

Bodensatz verimpft auf

Meerschweinchen a. Gew. 560 gr.

Nach 6 Wochen getötet.

Sektion : An der Injektionsstelle ein erbsengrosses käsiges Knötchen, Retroperitonealdrüsen, vergrössert. Im Antiforminsediment dieser Drüsen Tuberkelbazillen nachweisbar.

Meerschweinchen b. Gew. 580 gr.

Nach 6 Wochen getötet.

Sektion : Inguinaldrüsen vergrössert. Deutliche Peritonitis tuberkulosa.

8. Versuch.

Sputum. Direkte Ausstriche positiv.

Behandelt mit 15% Antiformin

während 48 Stunden.

Bodensatz verimpft auf

Meerschweinchen a.

Nach 10 Tagen spontan eingegangen.

Sektion : Keine pathologische Veränderungen.

Meerschweinchen b.

Nach 4 Wochen spontan eingegangen.

Sektion : Inguinal- und Mediastinaldrüsen deutlich vergrössert.

Milz und Leber zeigen deutliche tuberkulöse Knötchen.

Tabelle VIII.

No	Art der Tiere		Art des Stammes	Concentration der Antiforml.	Einwirkungszeit	Getötet nach	Resultat.
1	Meerschw.	a.	Typ. hum.	15%	7 St.	6 W.	+ nicht deutlich
	"	b.	"	"	"	"	+ "
2	"		"	10%	2 St.	4 W.	+ "
3	"		"	"	"	2 W.	- Pneumonie
4	Kanin.		Typ. bov.	20%	3 St.	7 W.	+ hochgradig
5	"		Typ. hum.	"	"	7 W.	+ "

6	Meerschw.	a.	„	15%	6 St.	6 W.	+ nicht deutlich
	„	b.	„	„	„	„	+ deutlich
7	„	a.	„	„	24 St.	„	+ hochgradig
7	Meerschw.	b.	Typ. hum	15%	24 St.	4 W.	+ hochgradig
8	„	a.	„	„	48 St.	10 Tage	?
	„	b.	„	„	„	4 W.	+ deutlich

Aus den obigen Zusammenstellung ergibt sich, dass Tuberkelbazillen vom Typus humanus im Allgemeinen noch nach 48 Stunden in 10 bis 20% Antiforminlösungen lebensfähig und infektionstüchtig bleiben. Die Bazillen des Typus bovinus in einem einzigen Versuch geprüft wurde, scheinen ebenfalls mit einer hohen Widerstandskraft gegenüber dem Antiformin begabt zu sein.

Parallel mit den Tierversuchen, habe ich mit dem gleichen Material jeweils Züchtungsversuche vorgenommen, ohne leider dabei, mit wenigen Ausnahmen, zu klaren Ergebnissen zu gelangen, weil die Kulturen meistens im Laufe der Beobachtungszeit von sporentragenden Bakterien überwuchert wurden.

V.

Die Widerstandsfähigkeit der Reinkulturen von Typhus- und Tuberkelbazillen gegenüber dem Antifomin.

Nach den Versuchen von Hüne werden Staphylokokken von 1% Antiforminlösungen schon nach 15 Minuten in der Weise beeinflusst, dass Culturversuche nicht mehr gelingen.

Ich habe meinen Versuchen als Testobjekte Reinkulturen von Typhus- und Tuberkelbazillen gewählt. In der Versuchsanordnung folgte

ich genau den Angaben von Hüne.

Der Versuch verlief in folgender Weise. Zunächst wurden vermittelst physiologischer NaCl-Lösung verschiedene Verdünnungen des Antiformins bereitet und in Quantitäten von je 1 cc. in Reagenzgläser gefüllt. Diese Röhren, in welchen die verschiedenen Verdünnungen des Antiformins enthalten waren und zu denen noch 0,3 cc. Bouillon als Nährflüssigkeit hinzukam, wurden nun weiterhin mit 0,1 cc. einer Aufschwemmung des Tesmaterials — einer 24 stündigen Typhusagarkultur in der Verdünnung von 1 : 10,000 — beschickt und die Gemische in den Brutraum gestellt. In bestimmten Zeiträumen erfolgte die Entnahme des Proben aus den Röhren und ihre Uebertragung in Fleischwasserbouillon, die zu Kulturzwecken diente.

Die Resultate dieses Versuches sind in unten stehender Tabelle enthalten.

Tabelle IX.

Zeit Concentrat.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
0,5%	+	+	+	+
1%	+	+	—	—
5%	+	+	—	—
10%	+	—	—	—
20%	+	—	—	—

Es ergibt sich aus diesem Versuche, dass Typhusbazillen in 0,5% Antiformin nach 2 Stunden nicht abgetötet werden. Die 1% Lösung tötet die Bakterien nach 30 Minuten ab, die 5% nach der gleichen Zeit, die 10 und 20% nach 15 Minuten.

In einem weiteren Versuche, welcher in ganz gleicher Weise angeordnet war, nur dass ich hier mit Rücksicht auf die höhere

Widerstandskraft des gewählten Testobjektes längere Einwirkungszeiten und stärkere Konzentrationen des Desinfektionsmittels benutzte, sollte die Resistenz von Tuberkelbazillen in wässriger Aufschwemmung gegenüber dem Antiformin ermittelt werden. Als Testmaterial benutzte ich eine 3 Wochen alte Tuberkelbazillenkultur vom Typus humanus.

Tabelle X.

Zeit Concentrat.	1 St.	3 St.	6 St.	12 St.	24 St.	48 St.
5 ½	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	?	?
50%	+	?	+	+	+	+

Aus diesem Versuch geht die ausserordentlich hohe Resistenz der Tuberkelbazillen gegenüber dem Antiformin sehr deutlich hervor. Man sieht, dass auch eine konzentrierte Lösung selbst nach tagelangem Einwirken nicht im Stande ist, Lebens- und Entwicklungsfähigkeit der Tuberkelbazillen aufzuheben.

Die grosse Resistenz der Tuberkelbazillen im Sputum gegenüber dem Antiformin — nach Hüne sollen sie sich in 20 bis 25 % Lösungen noch nach 4 Tagen lebend erhalten — wird von allen Autoren übereinstimmend angegeben, hingegen weichen meine Befunde von den Angaben, dass wässrige Aufschwemmungen des Tuberkelbazillus bereits nach 6 bis 12 Stunden der Einwirkung einer 15% Antiforminlösung erliegen, erheblich ab.

Zusammenfassung.

Meine Versuche führten zu folgenden Ergebnissen.

1). Die in obiger Arbeit näher beschriebenen und geprüften Anreicherungsverfahren sind als wesentliche Fortschritte auf dem Gebiete des direkten Nachweises der Tuberkelbazillen zu betrachten. In etwa 13% der Fälle war es ihrer Hilfe möglich, die spezifischen Erreger da nachzuweisen, wo die direkte mikroskopische Untersuchung negativ ausfiel.

2). Die Ammoniakmethode scheint unter den von mir geprüften Verfahren die besten Resultate zu liefern: es ist jedoch zu bemerken, dass der Erfolg der Untersuchung von der Vollständigkeit der Homogenisierung des Materials und der Herstellung eines geeigneten spezif. Gewichtes der Lösung abhängt. In den zu stark konzentrierten Lösungen ist die Bildung des Bodensatzes behindert und in zu hohen Verdünnungen gewinnen Sputa eine gummi-artige Beschaffenheit.

3). Das Antiforminverfahren kommt hinsichtlich der Ergebnisse dem Ammoniak fast gleich. Antiformin wirkt aber nach meinen Erfahrungen energischer und rascher lösend als Ammoniak und besitzt zu dem grossen Vorteil, dass die Sedimente zu Kulturzwecken und zu Verimpfung auf Tiere benutzt werden können.

4). Die Ligroinmethode hat sich bei meinen Versuchen am wenigsten bewährt. Das Verfahren bietet jedoch im Hinblick auf das ihm zugrunde gelegte Prinzip grosses Interesse. Auch hier kann das Abscheidungsprodukt nur für die mikroskopische Untersuchung verwendet werden.

6). Alle Begleitbakterien der Tuberkelbazillen werden in den gebräuchlichen Antiforminlösungen mit wenigen Ausnahmen, abgetötet und aufgelöst.

7). Das Antiformin eignet sich sehr gut zur Auflösung von Organen und Sekreten. Mit Hilfe dieser Methode ist es miunter möglich, leicht und rasch auch ganz spärliche Tuberkelbazillen aufzufinden, wo bisher histologische Untersuchungen und Tierimpfungen nötig waren.

8). Tuberkelbazillen bleiben in 15% Antiforminlösungen noch

48 Stunden infektiönchtig. Die 48 stündige Einwirkung einer 50% Lösung hebt ihre Lebensfähigkeit nicht auf.

Literatur.

- 1) Deutsche mediz. Wochenschr. N. 10, 09.
 - 2) Mediz. Klinik, N. 35, 09.
 - 3) Deutsche mediz. Wochenschr. N. 33, 09.
 - 4) Centrbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bb. 42.
 - 5) Berl. Klin. Wochenschr. N. 29, 08.
 - 6) Dasselbst N. 14, 09.
 - 7) Dasselbst N. 25, 09.
 - 8) Tuberkulosis N. 2, 09.
 - 9) Hyg. Rdschau, N. 18, 08.
 - 10) Experimentelle Pathologie und Therapie, 09.
 - 11) Münchner mediz. Wochenschr. N. 38, 09.
 - 12) Hygienische Rundschau, N. 23.
 - 13) Münch. mediz. Wochenschr. N. 50, 06.
 - 14) Sahli, Klinische Untersuchungsmethoden. V. Aufl, 09.
 - 15) Berl. Klin. Wochenschr. N. 42 und 43, 1886.
-