

AUS DEM BAKTERIOLOGISCHEN INSTITUT DER LANDWIRTSCHAFTS-
KAMMER FÜR DIE PROVINZ BRANDENBURG ZU BERLIN
DIREKTOR: DR. SCHARR

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FÄRBEMETHODEN DER TUBERKELBACILLEN BEIM RINDE

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER WÜRDE

EINES DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE

DER

TIERÄRZTLICHEN HOCHSCHULE

ZU BERLIN

VORGELEGT

VON

ERICH HETZEL

TIERARZT UND ABTEILUNGSVORSTEHER AM INSTITUT

BERLIN IM MAI 1921

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG

DER TIERÄRZTLICHEN HOCHSCHULE ZU BERLIN

BERICHTERSTATTER: GEH. MEDIZINALRAT PROF. DR. FROSCH

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH 1921

NW, UNTER DEN LINDEN 68

ISBN 978-3-662-22830-2 ISBN 978-3-662-24763-1 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-24763-1

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsübersicht.

- Einleitung** (S. 1). **Material und Technik** (S. 3). **Färbemethoden** (S. 4).
- A. Färbemethode nach Ziehl-Neelsen (S. 4). I. Originalmethode (S. 4). II. Abänderung der Farblösung (S. 5). III. Abänderung der Beizung (S. 6). IV. Abänderung der Temperatur der Farblösung (S. 8). V. Abänderung der Entfärbung (S. 8). VI. Abänderung der Nachfärbung (S. 11). VII. Entfärbung und Nachfärbung in einer Handlung (S. 13). VIII. Ergebnis dieser Prüfungen (S. 14).
- B. Färbemethoden nach R. Koch und P. Ehrlich (S. 14).
- C. Färbemethode nach Hermann mit ihren Abänderungen nach Berka und Caan (S. 15).
- D. Färbemethoden nach C. Spengler (S. 16). I. Pikrinmethode (S. 16). II. Hüllenmethode (S. 18).
- E. Färbemethoden A und B nach Gasis mit ihren Abänderungen nach Eisenberg und Telemann (S. 19).
- F. Färbemethode nach von Betegh (S. 21). I. b-Tolinmethode (S. 21). II. Silbernitratmethode (S. 21).
- G. Muchsche Gramfärbemethoden (S. 21). I. Originalmethoden a, b, c (S. 21). II. Abgeänderte Muchsche Gramfärbemethoden (S. 23). a) Zwei-zeitige Doppelfärbungen (Berger, Fontes) (S. 23). b) Einzeitige Doppelfärbungen (Weiss, Wehrli-Knoll, von Betegh-Dahlmethode) (S. 24).
- Zusammenfassung** (S. 25). **Zahlenzusammenstellung** (S. 26). **Quellennachweis** (S. 29).

Einleitung.

Der färberische Nachweis der Tuberkelbacillen in den Ausscheidungen des Rindes hat eine erhöhte Bedeutung erlangt, seitdem die Bekämpfung der Rindertuberkulose durch das neue Viehseuchengesetz, das am 1. V. 1912 in Kraft getreten ist, einheitlich für das Deutsche Reich geregelt worden ist.

Nach dem Gesetz ist die Tuberkulose beim Rinde erst dann als festgestellt anzusehen, wenn neben den klinisch nachweisbaren tuberkuloseverdächtigen Krankheitserscheinungen die Tuberkelbacillen in den Ausscheidungen aus den erkrankten Organen ermittelt sind. Das Gesetz berücksichtigt also nur die mit der Ausscheidung der Tuberkelbacillen verbundenen, d. h. die offenen Formen der Tuberkulose, von denen beim Rinde die Tuberkulose der Lungen, der Gebärmutter und des Euters die größte Bedeutung haben.

Der Nachweis der Tuberkelbacillen geschieht im allgemeinen durch die Färbung nach dem Ziehl-Neelsenschen Verfahren. Es hat sich aber bei den Untersuchungen am menschlichen Material ergeben, daß damit zuweilen weniger Tuberkelbacillen gefunden werden als bei der Färbung nach anderen Methoden.

Der Zweck dieser Arbeit ist, zunächst zu prüfen, ob diese Beobachtung auch für die Rindertuberkelbacillen zutrifft, und dann ob nicht eine andere Färbemethode mehr Tuberkelbacillen nachzuweisen imstande ist. Von dieser Färbemethode ist zu fordern, daß sie in ihren Feststellungen die gleiche Sicherheit und Zuverlässigkeit hat wie die Ziehl-Neelsensche Methode. Die Diagnose „Tuberkelbacillen“ muß besonders deswegen einwandfrei feststehen, weil nach dem Gesetz die als tuberkulös festgestellten Rinder getötet werden. Fehldiagnosen würden wegen der Tötung nicht tuberkulöser Rinder einen erheblichen Schaden für den Besitzer und die Volkswirtschaft bedeuten.

Die Möglichkeit, mehr Tuberkelbacillen als durch die Ziehl-Neelsensche Färbung nachzuweisen, hat eine mehrfache Bedeutung. Zunächst kann durch den mikroskopischen Nachweis der Tuberkelbacillen die Diagnose sofort gestellt werden, ohne daß der kostspielige Tierversuch mit seiner langen Zeitdauer (4—10 Wochen) angewandt zu werden braucht. Es werden also Zeit und Kosten erspart. Die größere Bedeutung liegt aber auf seuchenpolizeilichem Gebiete, denn das Rind wird bei schleuniger Ausmerzung nach der Feststellung der Tuberkulose als Seuchenverbreiter unschädlich gemacht. Ist die tuberkulöse Erkrankung außerdem mit fortschreitender Abmagerung verbunden, so wird bei der sofortigen Feststellung der Seuche die Verwertung des getöteten Tieres erheblich günstiger sein als bei der Feststellung nach Verlauf eines oder mehrerer Monate. Die beschleunigte Feststellung der Seuche liegt also auch im volkswirtschaftlichen Interesse.

Über die Färbung der Tuberkelbacillen des Menschen sind zahlreiche Abhandlungen veröffentlicht worden (Amann, Böhm, Berka, Czaplowski, Caan, Dordt, Frei, B. Fränkel, H. Kayser, R. Koch, Konrich, Kühne, Leichtweiss, H. Lipp, Marx, Pappenheim, L. und M. Weiss, Wehrli-Knoll u. a.). Für das Rind sind

diese Prüfungen an den Ausscheidungsstoffen in geringerer Zahl erfolgt (v. Betegh, Eisenberg, C. Spengler), während die Mehrzahl der Autoren sich auf den Nachweis der Tuberkelbacillen im tuberkulös veränderten Gewebe und auf Reinkulturmaterial beschränkt (R. Koch, Adam, Berger, Bittrolf und Momose, Dold, Levy, Rosenblat).

Ich habe es daher unternommen, die bekanntesten Färbemethoden einer vergleichenden Prüfung an den Ausscheidungen des tuberkulösen Rindes zu unterziehen. Da das Institut amtliche Untersuchungsstelle bei der Bekämpfung der Rindertuberkulose ist, steht das Untersuchungsmaterial im reichen Maße zur Verfügung.

Material und Technik.

Zur Untersuchung kamen Lungenauswurf (Reihe 1—8 der Tabelle), Gebärmutterausfluß (Reihe 9 und 10) und Milch (Reihe 11—15) von Rindern mit Tuberkulose dieser Organe. Ergänzend wurde Material aus den tuberkulös veränderten Lymphknoten vom Meerschweinchen (Reihe 16—20) herangezogen. Im ganzen wurden 20 verschiedene Reihen von Ausstrichen für die Prüfungen verwendet.

Der Lungenauswurf war nach dem von Scharr und Opalka angegebenen Verfahren unmittelbar aus der Luftröhre mittels Seidenbüschels (Scharr) entnommen, der an einem langen Draht durch eine Luftröhrenkanüle von besonderer Konstruktion eingeführt wird. Der Auswurf war flockig und eitrig. Die Milch aus den tuberkulös erkrankten Eutern war bereits flockig und eitrig verändert, der Gebärmutterausfluß zähschleimig, glasig und mit Eiterflöckchen durchmischt. Die tuberkulöse Infektion der Meerschweinchen war durch Lungenauswurfmaterial des Rindes hervorgerufen. Nur die käsig veränderten Teile der Meerschweinchenlymphknoten wurden untersucht.

Zur Herstellung der Ausstriche jeder Versuchsreihe konnte bei Milch und Gebärmutterausfluß das Material ein und derselben Probe verwandt werden. Beim Lungenauswurf und bei dem Material aus den Lymphknoten der Meerschweinchen wurden dagegen mehrere Proben für jede Versuchsreihe gebraucht, weil jede Probe nur 10—20 Ausstrichpräparate lieferte.

Um nach Möglichkeit Fehlerquellen auszuschließen, die jedem Ausstrichverfahren infolge der wechselnden Verteilung der Tuberkelbacillen anhaften, wurde nur solches Material ausgewählt, das sich in zahlreichen Vorprüfungen als gleich tuberkelbacillenhaltig erwies und in dem die Tuberkelbacillen etwa gleich verteilt waren. Es wurde ferner nur Material mit geringem Tuberkelbacillengehalt verwendet. Das stark tuberkelbacillenhaltige Material mußte nach anfänglichen Versuchen ausgeschlossen werden, weil sich hieran nur feststellen läßt, ob ein Färbeverfahren viel oder wenig Tuberkelbacillen sichtbar macht.

Geringgradige Unterschiede im Wert der einzelnen Methoden lassen sich dagegen an diesem Material nicht ermitteln.

Die Ausstriche sind auf Objektträgern möglichst dünn, gleichmäßig und durchsichtig hergestellt worden, wodurch eine einwandfreie Färbung und gleichmäßige Entfärbung des Präparats gewährleistet ist. Das Material wurde mit dem Spatel auf Objektträgern verteilt oder, wo es sich um zähen Schleim und dicken Eiter handelte, zwischen zwei Objektträgern gequetscht und ausgezogen.

Als Vergleichsmaßstab für die Auszählung der Tuberkelbacillen in jedem Präparat wurden 150 Gesichtsfelder angenommen. Die Besichtigung erfolgte mit dem Zeiss-Mikroskop Stativ I B bei Verwendung der Ölimmersion 1,8 mm n. A. 1,3 und Okular 2 bei etwa 500facher Vergrößerung.

Folgende Färbemethoden wurden der Reihe nach geprüft: A. Ziehl-Neelsen; B. Koch-Ehrlich; C. Hermann; D. C. Spengler; E. Gasis (A und B); F. von Betegh; G. Muchsche Grammethoden.

Die Zahlenergebnisse sind in einer Tabelle am Schluß der Arbeit zusammengestellt. Bei den einzelnen Färbemethoden wurden außerdem die wichtigsten Abänderungen berücksichtigt, die zur Verbesserung der Methode vorgeschlagen waren. Besonders eingehend wurde die Ziehl-Neelsensche Methode geprüft, da dieses Färbeverfahren sehr einfach und zuverlässig und für den Nachweis der offenen Rindertuberkulose vorgeschrieben ist, so daß es zugunsten anderer Methoden nicht ohne zwingenden Grund aufzugeben sein wird.

Die Färbemethoden.

A. Färbemethode nach Ziehl-Neelsen.

I. Originalmethode.

Färbung mit Carbofuchsinlösung (Fuchsin 1,0; Alkohol 10,0; Carbonsäure 5,0; Aqua destillata 84,5) unter Erwärmen bis zur Dampfbildung, abspülen, entfärben in 25 proz. Schwefelsäure¹⁾ und in 60 proz. Alkohol¹⁾ so lange, bis das Präparat ganz entfärbt ist oder nur noch einen rosaroten Anflug hat, Methylenblaulösung 15—30 Sekunden, abspülen, trocknen.

Von wesentlicher Bedeutung für das Gelingen der Färbung ist die Beschaffenheit der Carbofuchsinlösung, deren Bereitung besondere Aufmerksamkeit zu schenken ist. Die Lösung wird folgendermaßen hergestellt: Die Fuchsinkristalle (Diamantfuchsin [Pappenheim], nicht Fuchsin-S) werden in einer großen Reibschale fein gepulvert und mit Alkohol zusammen unter allmählichem Zusatz der Carbol-

¹⁾ Die Entfärbung geschah regelmäßig durch Eintauchen des Objektträgers in die Entfärbungslösung (Säure, Alkohol usw.).

säure und etwas Wasser mit dem Pistill bis zur vollständigen Lösung verrieben. Nach dem Zusatz der ganzen Wassermenge dürfen beim Ausgießen keine ungelösten Fuchsinkristalle in der Reibschale zurückbleiben. Die sorgfältig unter ständigem Verreiben des Bodensatzes bereitete Carbofuchsinlösung erscheint auch in dicker Schicht bei durchfallendem Lichte gleichmäßig klar und setzt beim Stehen keinen Bodensatz ab. Die Farblösung wird unfiltriert durch Abheben mit der Bürette auf den Objektträger aufgetragen.

Die Tuberkelbacillen erscheinen nach dieser Färbung als kräftig leuchtend rot gefärbte Stäbchen, die sich bei der Nachfärbung mit Methylenblau auf dem blauen Grunde deutlich abheben. Die Tuberkelbacillen des Rindes sind verschieden geformt. Die verschiedensten Formen finden sich besonders im Lungenauswurf tuberkulöser Rinder, in dem sie entweder als homogen gefärbte und scharf berandete oder lückenhaft gefärbte Stäbchen mit entsprechend unregelmäßigem Rande (Perlschnurform) sichtbar sind. Ihre Form ist entweder schlank, fein und meist leicht gekrümmt oder kurz und verhältnismäßig dick und gerade. Das Einzelstäbchen ist in der ganzen Länge im wesentlichen gleich breit, seine Enden sind abgerundet. Zuweilen werden auch lange, sehr kräftige, meist etwas gekrümmte Stäbchen mit deutlich runden Enden beobachtet. Messungen sind im vorliegenden Falle nicht angestellt worden.

Die Zahl der nach Ziehl-Neelsen darstellbaren Tuberkelbacillen entspricht bei weitem nicht der tatsächlich vorhandenen Menge (Boit, Jötten und Haarmann, Porges, Leichtweiss, Ingwersen, Kronberger). Meine eigenen Untersuchungen haben diese Feststellung insofern bestätigt, als durch Abänderung der Originalmethode bessere Ergebnisse erhalten werden. In erster Linie konnte durch eine gewisse Vorsicht und Schonung bei der Ausführung der Färbung und Entfärbung die Zahl der mit dieser Methode darzustellenden Tuberkelbacillen wesentlich erhöht werden. Zur Erreichung dieses Zieles ist demnach bei den folgenden Untersuchungen das Färbeverfahren, wie folgt, abgeändert worden:

Nur einmaliges Erwärmen der Farblösung bis zur Dampfbildung und 4—5 Minuten langes Einwirkenlassen der Farblösung, nur kurzes Eintauchen des Präparates in 10 proz. Schwefelsäurelösung.

II. Abänderung der Farblösung.

a) Verstärkung der Carbofuchsinlösung nach Malowan:

Zur Färbung Mischung von 3 Teilen Carbofuchsinlösung und 1 Teil Anilinschwarzlösung (Anilinschwarz 1,0; Alkohol 5,0; Carbonsäure 1,0; Aqua destillata 20,0) erhitzen zum Sieden, Entfärbung und Nachfärbung wie bei der Originalmethode. (Ob ein besonderes Fabrikat für

die Färbung zu verwerten ist, ist nicht angegeben; ich habe das Anilinschwarz in Pulverform der Firma Kahlbaum verwandt.)

Die Tuberkelbacillen erscheinen nach dieser Färbung gleichmäßig dunkelrot bis schwarzrot gefärbt und ohne Strukturzeichnung. Die Zahl der sichtbar gemachten Tuberkelbacillen war weit größer als nach der Ziehl-Originalmethode. Die Unterscheidung der Tuberkelbacillen von den säurefesten Saprophyten, die schon bei der einfachen Färbung nach Ziehl-Neelsen schwer ist, scheint jedoch beinahe unmöglich, da die differentialdiagnostisch sehr wichtige Strukturzeichnung der Tuberkelbacillen ausbleibt.

b) Ersatz des Fuchsin durch andere Farbstoffe.

Grünfärbung durch Carbolmethylgrün (Ziehl) und Carbol-Bindscheidlers Grün (Eisenberg), sowie Gelbfärbung mit Carbol-safranin (Eisenberg). Die Tuberkelbacillen erscheinen bei den Grünmethoden leuchtend grün auf rosarotem Grunde bei Eosinnachfärbung. Die Zahl der Tuberkelbacillen war jedoch bei meinen Versuchen so gering, daß diese Methoden keine praktische Bedeutung für die klinische Diagnostik haben.

Auch mit der Gelbmethode ließen sich bessere Ergebnisse nicht erzielen, da die Zahl der darstellbaren Tuberkelbacillen im Vergleich zur Ziehlmethode zu gering ist.

III. Abänderung der Beizung.

a) Ersatz der Carbolbeizung durch Kreosot nach Ogawa.

Die von Ogawa mitgeteilte gute Wirkung des Kreosots in einem Zusatz von 1% zur Fuchsinlösung war zu bestätigen, jedoch wurden nicht mehr Tuberkelbacillen sichtbar gemacht. Da das Kreosot außerdem sehr teuer ist, liegt keine Veranlassung vor, die Carbonsäure durch Kreosot zu ersetzen.

b) Verstärkung der Carbolbeizung:

1. Verstärkung durch Lugolsche Lösung (Ph. Eisenberg). Färbung mit Carbol-fuchsin unter Erhitzen, zur Beizung mit Lugolscher Lösung erwärmen und die Lösung 2—3 Minuten einwirken lassen, Entfärbung wie gewöhnlich, keine Nachfärbung.

Nach Eisenberg erscheinen die Tuberkelbacillen damit stärker rot gefärbt, wobei oft eine Differenzierung des Zellinhalts beobachtet und ferner mehr Tuberkelbacillen dargestellt werden sollen.

Diese Angaben konnten unter der Voraussetzung bestätigt werden, daß die Einwirkungs-dauer der Lugolschen Lösung auf 5—10 Sekunden abgekürzt und vorsichtig bis zur leichten Dampfbildung erhitzt wird. Die Tuberkelbacillen heben sich als rotviolett und dunkelviolett gefärbte Stäbchen von dem blaßvioletten Grunde ab. Die Zahl der so sichtbar gemachten und als Tuberkelbacillen angesprochenen Stäbchen

übertraf die der Originalmethode von Ziehl-Neelsen bei weitem. Infolge der Dunkelfärbung ist es jedoch schwer und häufig unmöglich, mit Sicherheit die Tuberkelbacillen als solche zu erkennen, da sich auch andere Stäbchen rotviolett und dunkelrot färben. Da die Körnchenzeichnung als wesentliches Unterscheidungsmerkmal nicht immer nachzuweisen ist, so kann es leicht vorkommen, daß auch andere Stäbchen als Tuberkelbacillen angesprochen werden. Es erscheint deshalb gewagt, auf Grund eines spärlichen Bacillenbefundes die Diagnose Tuberkelbacillen mit dieser Methode zu stellen.

2. Verstärkung durch Jodtinktur nach Porges.

Färbung mit Carbofuchsin unter Erwärmen, Jodtinktur 10%, ohne Nachfärbung.

Nach Porges färben sich die Tuberkelbacillen rot, ihre Granula schwarz, das Gewebe gelb. Porges berichtet, damit bei menschlichem Material in 25% der Fälle häufiger Tuberkelbacillen nachgewiesen zu haben als durch die einfache Ziehlfärbung. Lipp bestätigt diese Angaben im wesentlichen, hat aber nur in 10% der Fälle häufiger als nach Ziehl Tuberkelbacillen nachgewiesen. Nach meinen Ergebnissen ist diese Abänderung als Fortschritt zu bezeichnen, da die Zahl der dargestellten Tuberkelbacillen größer war. Als störend wurden jedoch die Jodflecken empfunden, die trotz der Filtration und des Abspülens mit kräftigem Wasserstrahl nicht zu vermeiden waren.

3. Verstärkung durch Chromsäure nach Eisenberg.

Färbung mit wässriger Chromsäurelösung nach der Carbofuchsinfärbung und 5 Minuten lang einwirken lassen, keine Nachfärbung.

Die Tuberkelbacillen sollen mit dieser Doppelbeizung dunkelviolett, der Untergrund mit Ausnahme der Hefezellen dagegen hellrot erscheinen.

Die Färbung gelang mir nur bei 5 Sekunden langer Anwendung der Chromsäurelösung. Nach längerer Einwirkung waren die Ausstriche so stark überfärbt, daß eine Entfärbung nicht mehr möglich war. Zahlenmäßig waren die Ergebnisse unbefriedigend, sie blieben hinter denen der Ziehlschen Originalmethode zurück.

4. Verstärkung durch Pikrinsäure nach Claudius-Eisenberg.

Zur Färbung gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung heiß 2—3 Minuten lang nach der Carbofuchsinlösung einwirken lassen, ohne Nachfärbung.

Die Tuberkelbacillen treten mit dieser Färbung kräftig rot auf dem blassen Grunde hervor. Es empfiehlt sich jedoch, die Einwirkungs-dauer der Pikrinsäure auf 10 Sekunden herabzusetzen, um das Präparat einigermaßen gleichmäßig entfärben zu können. Bei längerer Einwirkung wirkt die Beize so stark, daß trotz längerer Dauer eine gleichmäßige Entfärbung nicht gelingt.

Nach meinen Versuchen ist diese Abänderung nicht einmal der Ziehlschen Originalmethode gleichzustellen.

IV. Abänderung der Temperatur der Farblösung.

a) Kaltfärbung.

Die Kaltfärbung bis zur Dauer von 24 Stunden — wie sie ursprünglich angewendet wurde, bis Rindfleisch die Erhitzung der Farblösungen einfuhrte — hat bei meinen Versuchen nicht annähernd die günstigen Ergebnisse in bezug auf die Zahl und die Form der Tuberkelbacillen geliefert. Die Zahl der Bacillen war erheblich kleiner. Ein Unterschied in der Form der mit heißer Lösung bei kurzer Einwirkung und der kalt gefärbten Tuberkelbacillen war auch deutlich sichtbar. Nach der Kaltfärbung waren die Tuberkelbacillen schlank, fein und hatten oft unregelmäßige Ränder, während die Tuberkelbacillen nach der Heißfärbung allgemein kräftiger entwickelt erschienen und meist glattrandig waren.

b) Warmfärbung ohne Aufkochen der Farblösung.

Es hat sich vielfach der Brauch eingestellt, die Ausstrichpräparate bis zum Aufkochen der Farblösung zu erhitzen — ein Verfahren, das auch vom Reichsviehseuchengesetz für die Färbung der Tuberkelbacillen bei der Bekämpfung der Rindertuberkulose vorgeschrieben wird —, anstatt die Farblösung entsprechend der Originalvorschrift nur bis zur Dampfbildung zu erwärmen. Cornet und Kossel, sowie Fitschen weisen auf die nachteiligen Folgen des Aufkochens der Farblösung für das Gelingen der Färbung hin. Die Nachteile bestehen zunächst in den vielfach auftretenden Schrumpfformen der Tuberkelbacillen, dann aber werden auch weniger Tuberkelbacillen sichtbar. Demgegenüber werden beim Erwärmen nur bis zur Dampfbildung nicht nur mehr Tuberkelbacillen sichtbar, ihre Form tritt auch kräftiger und deutlicher hervor, und Schrumpfformen fehlen. Zur Schonung der Tuberkelbacillen empfiehlt daher C. Spengler für seine Färbemethoden, das Carbolfuchsin nur gelinde und so weit zu erwärmen, bis über dem aus der Flamme herausgeführten Präparat leichte Dämpfe aufsteigen.

Ich konnte diese Beobachtungen vollauf bestätigen. Die besten Ergebnisse wurden bei dem im hiesigen Institut täglich zur Untersuchung eingehenden Auswurfmaterial nach 4 bis spätestens 5 Minuten langer Einwirkung der bis zur Dampfbildung erwärmten Carbolfuchsinlösung erzielt.

V. Abänderung der Entfärbung.

a) Abänderung der Säureentfärbung.

Für die getrennte Entfärbung mit Säure und Alkohol wurde von Ziehl-Neelsen die Schwefelsäure, von anderen Untersuchern (Berka,

Brieger, Ehrlich) die Salpetersäure empfohlen. Die Beobachtung Berkas, daß bei der Entfärbung mit der Salpetersäure um so mehr Tuberkelbacillen sichtbar sind, je stärker die Säure verdünnt werde, konnte ich nach meinen Ergebnissen insofern bestätigen, als bei der Anwendung einer 5proz. Salpetersäurelösung mehr Tuberkelbacillen darzustellen waren als mit der 10proz. Lösung. Die Versuche mit der Schwefelsäure fielen gerade entgegengesetzt aus. Der Grund ist anscheinend darin zu suchen, daß die Schwefelsäure in 5proz. Lösung das Präparat in den dickeren Schichten nicht genügend entfärbt, so daß Teile des Präparates für die Auszählung der Tuberkelbacillen ausfielen, während bei der 10proz. Lösung die Entfärbung vollständig ist.

Ein Vergleich beider Säuren in ihrem Verhalten gegenüber den Tuberkelbacillen fiel bei weitem zugunsten der Schwefelsäure aus. Die mit der 10proz. Schwefelsäure erzielten Ergebnisse waren weit besser als die mit der 5proz. Salpetersäure erzielten. Für die Untersuchung auf Rindertuberkelbacillen ist daher der Schwefelsäure unbedingt der Vorzug zu geben.

b) Die Abänderung der Alkoholentfärbung.

Die Anwendung des 60-volumprozentigen Brennspiritus ist der Entfärbungskraft des reinen Alkohols in der gleichen Stärke ebenbürtig. Nachteile waren damit nicht zu beobachten. Infolgedessen wird der Brennspiritus im hiesigen Institut bei den laufenden Untersuchungen der Ausscheidungen tuberkuloseverdächtiger Rinder auf Tuberkelbacillen seit über Jahresfrist angewandt.

c) Einzeitige Säure-Alkoholentfärbung.

Die von den verschiedenen Autoren empfohlene einzeitige Säure-Alkoholentfärbung (Salpetersäure-Alkohol nach Rindfleisch, Salzsäure-Alkohol nach Günther und Orth) fand ich der zweizeitigen Säurealkoholentfärbung nicht gleichwertig. Die Zahl der Tuberkelbacillen war wesentlich geringer.

d) Besondere Entfärbungsmethoden.

1. Entfärbung mit gesättigter wässriger Eisenchloridlösung nach de Giacomini-Gottstein.

Eisenberg empfiehlt diese Methode als ein mit Unrecht vernachlässigtes Verfahren. Nach meinen Versuchen war die Wirkung der Lösung bei Einwirkung von 1 Minute auf dünne Ausstriche gut. Die Tuberkelbacillen hoben sich kräftig rot aus der Umgebung heraus.

Bei längerer Einwirkung machte sich jedoch ein schädigender Einfluß des Eisenchlorids auf die Tuberkelbacillen insoweit bemerkbar, als deren Zahl erheblich abnahm. Da eine vollständige Entfärbung des Ausstrichpräparates in seinen dichteren Abschnitten in der kurzen Zeit einer Minute nicht erzielt wird, ist die Eisenchloridlösung für Auswurfmaterial nicht geeignet. Die von Eisenberg gleichfalls empfohlene

Entfärbung mit 40 proz. Formalin ergab bei meinen Versuchen nur bescheidene Ergebnisse.

2. Entfärbung mit Fluoresceinalkohol nach E. Czaplewski.

Färbung mit Carbofuchsin unter Erwärmen, Farbstoff abgießen (nicht abspülen!), eintauchen in die Fluoresceinlösung 6—10 mal hintereinander (gelbes Fluorescein, Grübler-Leipzig, 1 g in 100 ccm Alkohol gelöst, 1—2 Tage lang stehen lassen, vom Bodensatz abgießen und Methylenblau 5,0 zusetzen, schütteln, 1 Tag stehen lassen und vom Bodensatz abgießen), eintauchen in die alkoholische Methylenblaulösung 10—12 mal hintereinander (5 proz. alkoholische Methylenblaulösung, zum Gebrauch vom Bodensatz abheben oder abgießen, nötigenfalls filtrieren), abspülen. Bei ungenügender Entfärbung sind Entfärbung und Gegenfärbung zu wiederholen.

Czaplewski hat das Fluorescein als milderes Entfärbungsmittel empfohlen, um eine Schädigung der Tuberkelbacillen oder deren vollständige Entfärbung bei der Anwendung der Säure zu verhüten.

Berger und A m a n n bestätigen die mildere Wirkung des Fluoresceins, weisen jedoch auf die mangelhafte Entfärbung des Präparates hin, so daß das Verfahren keinen Vorteil bietet.

Auf Grund meiner Versuche kann ich mich dieser Ansicht nur anschließen. Eine genügende Entfärbung erfolgt nur bei Verwendung sehr dünner Ausstriche, in den dickeren Ausstrichen jedoch versagt die Methode, da viele Zellen und Gewebsteile sich nicht entfärben. Sonst bieten die Tuberkelbacillen mit ihrer leuchtend hellroten Farbe und ihrer dunkelroten Innenzeichnung auf dunkelblauem Grunde sehr klare und eindeutige Bilder. Trotzdem war das Zahlenergebnis dem der Ziehlschen Originalmethode nur annähernd gleich.

3. Entfärbung mit Korallin (Pappenheim).

Zur Färbung erhitzen in Carbofuchsin, Farbstoff abgießen (nicht abspülen), eintauchen 3—5 mal hintereinander in Korallinlösung (gesättigte alkoholische Methylenblaulösung 100 ccm, Korallin 1 g, Glycerin 20 ccm) abspülen, trocknen.

Lipp hat diese Methode nachgeprüft und festgestellt, daß sich alle Stäbchen mit Ausnahme der Tuberkelbacillen entfärben.

Bei meinen Prüfungen erschienen die Tuberkelbacillen kräftig rot gefärbt, ihre Zahl war jedoch nicht größer als bei der Ziehlschen Originalmethode.

4. Entfärbung mit Natriumsulfitlösung (Konrich).

Nach Konrichs Versuchen mit menschlichem Material wurden die Tuberkelbacillen durch Natriumsulfitlösung auch bei stundenlanger Einwirkung nicht entfärbt.

Bei meinen Versuchen mit Material vom Rinde erschienen die Tuberkelbacillen nach vollständiger Entfärbung des Präparates mit

10proz. Lösung schwach rot gefärbt, während bei der Entfärbung mit 5proz. Lösung die Tuberkelbacillen ausgesprochen rot erschienen. Die Zahlenergebnisse waren hier sehr gut und glichen den mit der 10proz. Schwefelsäureentfärbung erzielten.

Das Mittel ist also in 5proz. Lösung für die Untersuchung auf Rindertuberkelbacillen als gutes und billiges Entfärbungsmittel anzusehen.

VI. Abänderung der Nachfärbung.

Aus den Mitteilungen über den Wert der zur Gegenfärbung verwendeten verschiedenen Farbstofflösungen ergibt sich einwandfrei, daß das Methylenblau nicht die Vorteile bietet, die man früher davon erwartet hat (Boit, Jötten und Haarmann, Marx, Weiss). Diese Erscheinung wird darauf zurückgeführt, daß das Methylenblau wegen seines dunklen Farbentons imstande ist, das Rot mancher Tuberkelbacillen zu verdecken (Marx).

Als Ersatz für die Blauachfärbung sind folgende Verfahren zur Nachfärbung vorgeschlagen worden:

- a) 2proz. wässrige Malachitgrünlösung,
- b) Vesuvיןlösung nach Marx (Vesuvין 2 g, Alkohol 60 ccm, Aqua destillata 40 ccm),
- c) Chrysoidinlösung nach Marx (1 : 300 kochendes Wasser),
- d) Kaliumpermanganatlösung (1 : 2000) nach Weiss,
- e) Jodtinktur nach Kronberger, mit der vierfachen Menge 60proz. Alkohols verdünnt,
- f) Chromsäurealkohol nach Ulrichs (1 : 100 60proz. Alkohol),
- g) gesättigte alkoholische Tropäolinlösung nach Lipp.
- h) Endlich wurde von Marx nach dem Vorbilde von Gaffky das Fortlassen der Nachfärbung empfohlen.

Die besten Ergebnisse sind nach der vorliegenden Literatur am menschlichen Material meist mit der Kronbergerschen Methode erzielt worden. Nach Leichtweiss wurden mit der Kronbergerschen Methode noch in 17%, nach Ingwersen sogar in 19% nach der Ziehfärbung negativer Ausstriche Tuberkelbacillen nachgewiesen. Jötten und Haarmann fanden diese Methode als besser geeignet als die mit Kaliumpermanganat oder Vesuvין oder Chrysoidin. Fitschen hält dagegen die Kronbergersche Methode nicht für vorteilhafter als die Ziehlsche, vorausgesetzt daß das Carbofuchsin der Ziehfärbung nur vorsichtig ohne Aufkochen erwärmt wird. Die von Kronberger vertretene Ansicht, daß mit seinem Färbeverfahren eine Unterscheidung der säurefesten Saprophyten von den Tuberkelbacillen möglich ist, trifft jedoch nach den Mitteilungen von Dold, Lipp und Rosenblatt nicht zu.

Meine Vergleichsprüfungen haben ergeben, daß von den Nachfärbungsmitteln das Kaliumpermanganat und das Vesuvin am besten geeignet sind. Diesen Mitteln folgen in absteigender Reihe Tropäolin, Malachitgrün, Chrysoidin, Methylenblau, Jodtinktur, Chromsäure, sowie endlich das Verfahren ohne Nachfärbung.

Bei der Färbung mit Kaliumpermanganat nimmt das Präparat eine blaßviolette, bei der mit Vesuvin eine gelbbraune Farbe an. Die Tuberkelbacillen heben sich bei diesen Färbungsarten gut ab. Das Tropäolin färbt den Grund dunkelgelb mit rötlichem Schein, die Hülle der Tuberkelbacillen blaßrot bis rot, während die intracellulären Granula dunkelrot erscheinen (Lipp). Malachitgrün ist als Komplementärfarbe zur Rotfärbung der Tuberkelbacillen brauchbar, außerdem hält Konrich das Malachitgrün als Nachfärbungsmittel für besonders geeignet wegen seiner geringen Färbekraft den Bakterien und Gewebsteilen gegenüber. Das Chrysoidin gibt einen hellgoldgelben Präparatengrund.

Aus meinen Feststellungen geht hervor, daß die hellen Farben (Kaliumpermanganat, Vesuvin, Tropäolin) sich zur Erkennung der Tuberkelbacillen besser eignen, als die dunkleren Farben (Malachitgrün und Methylenblau).

Die Zahlenergebnisse waren bei Verwendung des Kaliumpermanganats und des Vesuvins besonders günstig und übertrafen die der Methylenblauachfärbung bei weitem. Die Annahme von Marx, daß das Methylenblau zahlreiche Tuberkelbacillen zu verdecken imstande ist, ist also vollauf bestätigt worden. Da mit der Kaliumpermanganat- und Vesuvinnachfärbung 399 und 403, also rund 400 Tuberkelbacillen, bei der verbesserten Blaumethode dagegen nur rund 310 gezählt wurden, so ergibt sich gegenüber der verbesserten Ziehlmethode mit Blaunachfärbung ein Mehr von 90 Bacillen und gegenüber der Ziehlischen Originalmethode mit rund 260 nachgewiesenen Tuberkelbacillen ein Mehr von 140 Bacillen. Die Zahl der darstellbaren Tuberkelbacillen scheint daher in erster Linie von der Nachfärbung und erst in zweiter Linie von der Temperatur der Fuchsinlösung und der Säureentfärbung abhängig zu sein.

Daß trotz des hellgoldgelben Grundes nach der Färbung mit dem Chrysoidin verhältnismäßig wenig Tuberkelbacillen gezählt wurden, ist damit zu erklären, daß dieser Farbstoff dünne und feine Ausstriche nur sehr schwach färbt.

Eine Ermüdung des untersuchenden Auges tritt bei der Vesuvinfärbung nach meinen Beobachtungen nicht ein. Dagegen ermüdet das Auge leicht bei der Besichtigung der mit Kaliumpermanganat und Chrysoidin gefärbten Präparate. Das Kaliumpermanganat scheint mir daher trotz der günstigen Bacillenzahl kein allgemein verwendbares Nachfärbungsmittel zu sein. Am meisten geschont wird das Auge bei

den dunklen Gegenfarben (Malachitgrün, Methylenblau). Das Methylenblau hat außerdem noch den Vorteil, daß das Zellmaterial und die Begleitbakterien kräftig und deutlich gefärbt werden.

Meine Ergebnisse mit der Kronbergerschen Methode blieben hinter denen der Ziehlschen Originalmethode zurück. Dies ist jedoch damit zu erklären, daß ich nur die durch die gemeinsame Hülle als Stäbchenverband erkennbaren Körnerreihen, sowie die homogen rot gefärbten Stäbchen als Tuberkelbacillen anerkannt habe, während die Körnerreihen ohne Rotfärbung unberücksichtigt geblieben sind.

VII. Entfärbung und Nachfärbung in einer Handlung (einzeitig).

Die Vereinigung der Entfärbung und Nachfärbung in einer Handlung findet Anwendung in den sog. Schnellfärbemethoden. Von diesen wurden geprüft die Methoden von Weichselbaum, B. Fränkel, Gabbet, Mori und Tarchetti.

! a) Weichselbaum: Carbofuchsin wie bei der Ziehlmethode, konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung (ohne Säureanwendung).

b) B. Fränkel: Carbofuchsin erhitzen, Methylenblaulösung von folgender Zusammensetzung (50 ccm Aqua destillata, 30 ccm Alkohol, 20 ccm Salpetersäure, Methylenblau bis zur Sättigung), 1—2 Minuten lang unter Erwärmen einwirken lassen.

c) Gabbet: Carbofuchsin erhitzen, saure Methylenblaulösung (Methylenblau 1—2 g, 25 proz. Schwefelsäure 100).

d) Mori: Färben in Carbofuchsin (Fuchsin 0,5 g, Alkohol 10 ccm, Carbonsäure 2,5 ccm, Aqua destillata 100 ccm) ohne Erwärmen $\frac{1}{4}$ Minute; saure Methylenblaulösung (Schwefelsäure 1 ccm, Methylenblau 1,5 g, Aqua destillata 100 ccm) $\frac{1}{2}$ Minute lang einwirken lassen.

e) Tarchetti: Färben in Carbofuchsin ohne Erwärmen 1—2 Minuten, gesättigte alkoholische Pikrinsäurelösung 5 Minuten einwirken lassen.

Die über diese Methoden in der Literatur niedergelegten Urteile sind im allgemeinen wenig günstig.

Berka bemängelt bei der Weichselbaumschen Methode die mangelhafte Grundentfärbung und die geringe Zahl der sichtbar zu machenden Tuberkelbacillen, die um die Hälfte im Vergleich zur Hermannschen Methode geringer ist. Von der Fränkelschen Methode berichtet Böhm, daß bei lebhafter Rotfärbung der Tuberkelbacillen auch Kokken und Stäbchen rötlichblau gefärbt erscheinen. Die Gabbetsche Methode lehnt A mann ab, da über die wichtigste Handlung des Färbeverfahrens, die Entfärbung, keine Kontrolle möglich ist. Über die Tarchettische Methode urteilt Böhm in ähnlicher Weise wie über die Fränkelsche; außerdem bemängelt Böhm, daß die Zahl der dargestellten Tuberkelbacillen geringer ist als bei der Ziehlschen Färbung.

VIII. Ergebnis.

Die Ergebnisse meiner Prüfung waren insofern günstig, als die Zahl der dargestellten Tuberkelbacillen bei den Methoden nach B. Fränkel und Gabbet recht groß war, während die Methoden nach Mori, Tarchetti und Weichselbaum darin erheblich zurückstanden.

Das günstige Ergebnis bei den Methoden nach B. Fränkel und Gabbet ist verständlich, weil die Entfärbung des Präparatengrundes mit starker Säurelösung (20—25%) ziemlich ausgiebig ist und die Gegenfarbe auf dem vollkommen entfärbten Grunde rein zur Beobachtung kommt.

Bei den Methoden nach Weichselbaum, Mori und Tarchetti war die Entfärbung unzureichend. Es wurden außer einwandfrei erkennbaren Tuberkelbacillen zahlreiche rot und rötlich gefärbte andere Keime (Stäbchen, Kokken, Hefen) beobachtet, die das Bild ungünstig beeinflussen und daher die Diagnose erschweren. Die Tarchettische Methode lieferte die ungünstigsten Ergebnisse.

Ungeachtet der günstigen Zahlenergebnisse der Methoden nach B. Fränkel und Gabbet erscheint es aber nicht angezeigt, diese Methoden für die Untersuchung des Lungenauswurfs und der anderen Ausscheidungsstoffe des Rindes allgemein einzuführen. Diese Methoden sind differentialdiagnostisch nicht als einwandfrei anzusehen, weil sie die grundlegenden Charaktereigenschaften des Tuberkelbacillus, seine Säurefestigkeit und Alkoholfestigkeit, gar nicht oder nicht genügend berücksichtigen. Da auf Grund der einwandfrei färberisch dargestellten Tuberkelbacillen die Tötung der Rinder gesetzlich angeordnet wird, ist zur Sicherheit daran festzuhalten, daß diese zwei Hauptforderungen unbedingt erfüllt werden.

Die Morische und Tarchettische Methode kommen für die Untersuchung der Auswurfstoffe ferner deswegen nicht in Betracht, weil sie das Carbofuchsin kalt und nur während kurzer Zeitdauer anwenden und infolgedessen zu wenig Tuberkelbacillen zur Darstellung gelangen.

B. Färbemethoden nach R. Koch und P. Ehrlich.

I. Färbemethode nach R. Koch.

Färben mit folgender Farblösung 20—24 Stunden lang bei Zimmer-temperatur oder $\frac{1}{2}$ —1 Stunde bei 40° C: 1 ccm gesättigte alkoholische Methylenblaulösung wird in 200 ccm destilliertem Wasser unter Schütteln gelöst und der Lösung 0,2 ccm einer 10 proz. Kalilauge unter wiederholtem Schütteln zugesetzt.

Abspülen mit Wasser und Nachfärben mit einer gesättigten wässrigen Vesuvinlösung, abspülen und trocknen.

Nach R. Koch sind die Tuberkelbacillen blau gefärbt, die übrigen Stäbchen und das Gewebe braun. Die mit Methylenblau gefärbten Tuberkelbacillen sollen dünner als die mit Violett und Fuchsin

gefärbten und nicht sehr intensiv gefärbt erscheinen, so daß es auch eine gewisse Übung erfordert, sie überall nachzuweisen.

Bei meinen Prüfungen wurden die Tuberkelbacillen wechselnd als heller und dunkler blau gefärbte Stäbchen ermittelt. Die Zahl der sichtbar gemachten Tuberkelbacillen war jedoch ziemlich gering. Da R. Koch vielfach massenweise Tuberkelbacillen beim Material vom Rinde mit dieser Methode nachgewiesen hat, mir dies aber auch bei tuberkelbacillenreichem Material nicht gelang, so ist mit Sicherheit ein technischer Fehler bei der Ausführung meiner Färbung anzunehmen.

II. Färbemethode nach P. Ehrlich.

Färbung mit Anilinwasserfuchsin- oder Anilinwassermethylviolett- oder Anilingentianaviolettlösung mindestens 12 Stunden kalt oder bei Erwärmen kürzere Zeit, abspülen mit Wasser, Entfärbung in 25 proz. Salpetersäurelösung, behandeln mit 60 proz. Alkohol, nachfärben mit Methylenblau bei Fuchsinfärbung, mit Vesuvin bei Violettfärbung.

Nach Böhm ist die Zahl der mit dieser Methode dargestellten Tuberkelbacillen ungefähr die gleiche wie bei der Ziehlschen Methode mit dem Unterschied, daß durch die Ehrlichsche Färbung auch die granulierten Formen sichtbar werden. Der Nachteil der Färbung ist die lange Färbungsdauer (15—20 Minuten) und die Notwendigkeit, stets frische Anilinwasserfarbstofflösungen zu bereiten.

Bei meinen Untersuchungen wurden die Tuberkelbacillen bei der Färbung nach dieser Methode als leuchtend dunkelrot gefärbte Stäbchen mit ausgeprägter Körnchenzeichnung erkannt. Zahlenmäßig erreichten meine Ergebnisse bei der Warmfärbung eben die der Original-Ziehlmethode, während sie bei der 24stündigen Kaltfärbung geringer waren.

C. Färbemethoden nach Hermann.

I. Originalmethode: Färben mit einer Mischung von 3 Teilen Ammoniumcarbonatlösung (1%) und 1 Teil alkoholischer Krystallviolettlösung (3 : 100 ccm 95 proz. Alkohols) unter Erwärmen bis zur Dampfbildung 1 Minute lang, kurzes Eintauchen in 10 proz. Salpetersäure, abschwenken in 96 proz. Alkohol, bis das Präparat eine blaßblaue Farbe annimmt, abspülen, nachfärben mit wässriger oder alkoholischer 1 proz. Eosinlösung.

II. Abänderung nach Berka: Nachfärbung mit Vesuvinlösung (Vesuvin 2,0 g, 96 proz. Alkohol 60 ccm, Aqua destillata 40 ccm) an Stelle der Eosinlösung.

III. Abänderung nach Caan: Vorfärben mit salzsaurem Carmin (nach Paul Mayer, Neapel), zur Entfärbung in 1 proz. Salzsäurealkohol, abspülen, Färbung und Säureentfärbung wie bei der Originalmethode, Alkoholentfärbung, bis der Carminton wiederkehrt. Abspülen.

Die Hermannsche Färbung soll nach den zahlreichen Untersuchungen wesentlich günstigere Ergebnisse als die Ziehlfärbung liefern (Berka, Frei, Caan, Kayser, Kongstedt u. a.). Caan hat 5—6 mal so viel Tuberkelbacillen gefunden wie nach Ziehl, Kayser fand in 8% der nach Ziehl negativen Fälle nach Hermann noch Tuberkelbacillen. Böhm zählt die Hermannsche Methode zu den besten, hält sie jedoch der Ziehlschen nicht für überlegen.

Da verschiedentlich festgestellt wurde, daß die Ausführung der Färbung unter Umständen Schwierigkeiten bereitet, empfiehlt Frei, den Farbstoff bis zum vollständigen Aufkochen zu erhitzen. Kongstedt erhitzt mehrere Male hintereinander bis zum Aufkochen, läßt den Farbstoff 1 Minute lang einwirken und verwendet den Farbstoff außerdem in der Mischung mit der Beize von 1 : 3 statt 1 : 4 mit möglichst kurzer Entfärbung.

Meine Nachprüfung hat ergeben, daß zuweilen ein außerordentlich starker Bacillenverlust zu beobachten ist, namentlich wenn nicht kräftig genug erhitzt war und die Farblösung nicht genügend eingewirkt hatte, ferner wenn nicht vorsichtig und kurz entfärbt wurde. Andermal konnte eine besondere Empfindlichkeit des Violettfarbstoffes gegen die Entfärbungsmittel nicht festgestellt werden. Das Alter der Ammoniumcarbonatlösung scheint hierbei die entscheidende Rolle zu spielen, was sich daraus ergab, daß bei der Verwendung älterer Beizlösungen der Farbstoff wenig haftete und sehr schnell ausgezogen wurde, so daß nur wenige Tuberkelbacillen sichtbar waren, während bei frischer Beizlösung die Färbung ohne Schwierigkeit mit gutem Erfolge gelang.

Es empfiehlt sich daher, die Ammoniumcarbonatlösung jedesmal frisch vor der Verwendung anzusetzen. Das Zahlenergebnis meiner Prüfungen der Hermannschen Originalmethode war weit besser als das der Ziehlschen Originalmethode. Ein noch günstigeres Ergebnis wurde mit der Nachfärbung durch Vesuvin nach Berka erzielt. Durch diese Abänderung ist die Zahl der Tuberkelbacillen derartig vermehrt, daß diese Methode zu den besten zu zählen ist.

Die von Caan empfohlene Vorfärbung des Präparatengrundes mit salzsaurem Carmin an Stelle der diffusen Plasmafärbung mit Eosin gibt zwar abwechslungsreiche und lebhaft bunte Bilder, die Zahl der dargestellten Tuberkelbacillen war jedoch sehr gering.

D. Färbemethoden nach C. Spengler.

I. Pikrinmethode.

Methode a): Färben mit Carbofuchsin unter vorsichtigem Erwärmen, bis über dem aus der Flamme herausgeführten Präparat leichte Dämpfe aufsteigen, Abgießen der Farblösung, nachfärben mit Pikrin-

säurealkohol (gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung oder Esbachs Reagens und Alkohol $\bar{a}\bar{a}$ 50 ccm) 2—3 Sekunden lang, dazu 3—4 Tropfen 15proz. Salpetersäurelösung und wieder Pikrinsäurealkohol (5—10 Sekunden lang) bis zur schwachen Gelbfärbung des Präparates, abspülen, trocknen.

Methode b): Färben mit Carbofuchsin und Pikrinsäurealkohol wie bei der Methode a), abspülen in 60proz. Alkohol, entfärben in Salpetersäure einige Sekunden bis zur schwachen Gelbfärbung, entfärben in 60proz. Alkohol, nachfärben mit Pikrinsäurealkohol bis zur Gelbfärbung, abspülen, trocknen.

Nach C. Spengler sollen sich mit der Pikrinmethode mehr Tuberkelbacillen darstellen lassen als mit den anderen Färbemethoden. Dieser Vorteil der Pikrinmethode wird von Spengler damit erklärt, daß neben den kräftig entwickelten Vollstäbchen andere Formen der Tuberkelbacillen sichtbar werden. Spengler will damit auch solche darstellen, deren Hülle bereits eine sehr starke Schädigung erlitten hat, daneben auch die von ihm als Jugendformen der Tuberkelbacillen bezeichneten Stäbchen und die sog. Tuberkelbacillensplitter.

Bei den Nachprüfungen der Spenglerschen Pikrinmethode wird allgemein in Übereinstimmung mit C. Spengler die Überlegenheit der Methode gegenüber den anderen Verfahren betont (Kirchenstein, H. Wilson, Jötten und Haarmann, von Betegh). Als gleichwertig mit der Ziehlschen Methode wird die Methode nur von wenigen Untersuchern bezeichnet (Böhm, Adam).

Bei meinen Nachprüfungen konnte die große Überlegenheit der Pikrinfärbung über alle anderen Methoden ebenfalls bestätigt werden. Die Pikrinmethode ist im hiesigen Institut praktisch im größeren Maßstabe an dem laufend eingehenden Untersuchungsmaterial vergleichend mit der Ziehlschen Methode angewandt worden. Dabei wurden von 602 Tuberkulosefällen 98 lediglich durch die Pikrinmethode festgestellt, während in diesen Fällen die Ziehlsche Methode versagt hat. Daß diese Tiere tatsächlich auch tuberkulös waren, wurde durch die bisher aufgenommenen Schlachtbefunde bestätigt. Der Vorsprung der Pikrinmethode vor der Ziehlschen Methode hat also 16,3% betragen.

In der Mehrzahl dieser Fälle wurden ausgewachsene, aber stark hüllengeschädigte Tuberkelbacillen nachgewiesen, in geringerer Zahl auch Jugendformen der Tuberkelbacillen, die als glatte gleichmäßig und lückenlos gefärbte, nicht granulierte, meist sehr feine und kleine, zuweilen auch als größere leuchtend rosarot gefärbte und scharf abgesetzte Stäbchen in Erscheinung traten. Soweit in den Ausstrichen mit der Spenglerschen Färbung kräftig entwickelte Vollstäbchen nachzuweisen waren, wurden auch regelmäßig durch die Ziehfärbung Tuberkelbacillen ermittelt. Den Spenglerschen Splittern konnte am

Rindermaterial eine entscheidende Bedeutung für die Diagnose nicht zuerkannt werden.

Die unter b) beschriebene Methode wurde von mir mit Vorliebe angewandt, weil die Säureentfärbung hierbei kräftiger und die Möglichkeit der Rotfärbung der säurefesten Saprophyten wesentlich verringert ist. Für die Ausführung dieser Färbemethode ist noch zu bemerken, daß bei der Carbofuchsinfärbung nur 2 Min. vorsichtig bis zur Dampfbildung erwärmt wird und der Pikrinsäurealkohol nach dem Abgießen des Fuchsin nur bis 10 Sekunden einwirken darf. Hierauf wird das Präparat in 60proz. Alkohol abgespült, in 15proz. Salpetersäure kurz, nach Bedarf auch mehrmals eingetaucht und schließlich in 60proz. Alkohol oder Brennspritus bis zur vollständigen Verdrängung der Rotfärbung entfärbt. Die Färbung hat sorgfältig unter genauer Beobachtung dieser Färbezeiten zu erfolgen (Verwendung der Färbeuhr). Besonders zu beachten ist, daß das Fuchsin nicht länger als 2 Minuten und die Beizung mit dem Pikrinsäurealkohol nicht länger als 10 Sekunden dauert, um nicht die Entfärbung zu erschweren oder unmöglich zu machen.

Aus meinen Ergebnissen ist zu schließen, daß die Spenglersche Pikrinmethode ebensoviel Tuberkelbacillen in Form der Vollstäbchen darstellt wie die Ziehlmethode, darüber hinaus aber noch die hüllengeschädigten Tuberkelbacillen und die Jugendformen der Tuberkelbacillen sichtbar macht. Daß deren Feststellung eindeutig ist, beweisen die Schlachtbefunde der als tuberkulös bezeichneten Rinder. Zugegeben muß jedoch werden, daß die Diagnose „Tuberkelbacillen“ nicht immer leicht ist und besondere Erfahrung und Übung voraussetzt. Die Musterung der Präparate unter dem Mikroskop bereitet keine Schwierigkeit, wenn das Material gleichmäßig, aber nicht allzu dünn ausgestrichen wird.

II. Hüllenmethode.

Alkalisieren des Untersuchungsmaterials mit einer geringen Menge $\frac{1}{2}$ —1proz. Kalilauge (oder Natronlauge), Herstellen eines Trockenpräparates unter äußerst schonender Erwärmung, färben mit Löfflerschem Methylenblau, abspülen, spezifische Färbung mit Carbofuchsin, bis leichte Dämpfe über dem aus der Flamme herausgeführten Präparat aufsteigen, abspülen, Methylenblau unter langsamem Zusatz von 1—2 Tropfen 15proz. Salpetersäure einige Sekunden lang einwirken lassen, abspülen, trocknen.

Nach C. Spengler erscheinen die damit gefärbten Rindertuberkelbacillen in geradezu riesenhafter Größe, weit größer als Tuberkelbacillen menschlichen Ursprunges. Jedoch soll die Darstellung der Tuberkelbacillen in dieser Größe nur dann gelingen, wenn das Untersuchungs-

material feucht erhalten, vor dem Austrocknen geschützt wird und wenn die Hülle intakt ist.

Bei Verwendung von frischem Material habe ich die Spenglersche Beobachtung bestätigen können. Da es sich jedoch bei den vorliegenden Vergleichsprüfungen, dem Zweck dieser Untersuchungen entsprechend, nur um Ausstriche handelt, die auf gewöhnliche Weise hergestellt und fixiert waren, erschienen die Tuberkelbacillen nur in der gewöhnlichen Größe. Die Zahl der als Tuberkelbacillen gezählten Stäbchen war größer als bei der Ziehl-Methode. Für laufende Untersuchungen hat diese Methode jedoch zur Feststellung der Tuberkelbacillen in den Ausscheidungen tuberkulöser Rinder nur beschränkte Bedeutung. Die Art der Entfärbung durch eine schwache Säurelösung ohne Alkohol läßt die allgemeine Einführung der Methode zur Diagnose der Rindertuberkulose daher nicht angezeigt erscheinen.

E. Färbemethoden nach Gasis.

I. Färbemethode A.

Herstellung der Farblösungen.

a) Farblösung: Eosin kryst. 1,0; Alkohol 5,0; Aqua destillata 95,0 (5 ccm dieser Lösung werden mit einem linsengroßen Stück Quecksilberchlorid im Reagensglas langsam unter Umschütteln bis zur Lösung des Quecksilberchlorids gekocht, wodurch der Farbstoff einen hellroten Ton annimmt und in Schwebefällung tritt).

b) Entfärbungsmittel: (Natriumhydrat 0,5; Jodkalium 1,0; 50 proz. Alkohol 100,0).

c) Nachfärbungsmittel: (Methylenblau 1,0; Alkohol absol. 10,0; Salzsäure 0,5; Aqua destillata 90,0).

Zur Färbung Farblösung erhitzen und 1—2 Minuten lang einwirken lassen, abspülen, in die Entfärbungslösung solange eintauchen bis das Präparat einen weißgrünen Farbenton annimmt, entfärben mit absolutem Alkohol, abspülen, nachfärben 2—3 Sekunden, abspülen. Falls das Präparat noch rot gefärbt ist, ist die Entfärbung zu wiederholen.

II. Färbemethode B.

Herstellung der Farblösungen.

a) Farblösung: 3 g krystallisiertes Quecksilberchlorid werden in 100 ccm Aqua destillata, das 5 ccm absoluten Alkohol enthält, gelöst, 1 ccm Cedernöl zugesetzt und das Ganze aufgeköcht. Die so erhaltene milchartige Flüssigkeit wird warm filtriert. In einem anderen Glase wird 1 ccm krystallisiertes Eosin in einigen Kubikzentimetern Aqua destillata gelöst. Beide Lösungen werden miteinander vermischt. Das abgekühlte Gemisch wird filtriert, 24 Stunden stehengelassen, dann nochmals filtriert.

b) Entfärbungsmittel: (Natriumhydrat 1,0; Jodkalium 0,5; 50 proz. Alkohol 100,0).

c) Nachfärbungsmittel: (Methylenblau 0,1; Aqua destillata 80,0; Alkohol absol. 20,0; Salzsäure 1,0).

Zur Färbung Farblösung vor dem Gebrauch umschütteln, Farblösung erhitzen und 5—15 Minuten lang stehenlassen, abspülen, entfärben solange, bis die rote Farbe durch eine tiefgrüne ersetzt wird, abspülen in 90 proz. Alkohol, abspülen mit Wasser, nachfärben 2—3 Sekunden lang, abspülen, trocknen.

Die Färbemethoden nach Gasis, die sich auf die Alkalifestigkeit der Tuberkelbacillen stützen, haben die von Gasis gehegten Erwartungen nicht erfüllt. Gasis ist nämlich der Auffassung gewesen, in der Alkalifestigkeit der Tuberkelbacillen ein sicheres Unterscheidungsmerkmal zwischen den Tuberkelbacillen und den anderen säurefesten Stäbchen gefunden zu haben. Dieser Auffassung tritt Adam bei. Levy, Köhler, Dold und Rosenblat haben dagegen berichtet, daß die Methode nicht spezifisch für die Tuberkelbacillen sei, weil nach ihren Beobachtungen die Alkalifestigkeit im gleichen Maße wie die Säurefestigkeit auch den nicht pathogenen Stäbchen im wechselnden Grade zukommt. Gleichzeitig berichten diese Untersucher, daß durch die Gasis-Methoden nicht mehr Tuberkelbacillen sichtbar gemacht werden als nach Ziehl. Rosenblat hält die Methode sogar wegen der Unsicherheit der Differentialdiagnose für die Untersuchung von Sputum des Menschen und anderen Bakterienmischungen für nicht brauchbar.

Bei meinen Prüfungen der Methode A waren annähernd so viel Tuberkelbacillen sichtbar zu machen wie bei der Ziehlschen Methode, bei der Methode B dagegen erheblich weniger. Die Farbe der Tuberkelbacillen war bei beiden Methoden leuchtend rosarot. Die Tuberkelbacillen waren verhältnismäßig leicht zu finden, da sie häufig dicker, größer und homogen gefärbt erschienen als man sie sonst zu sehen gewöhnt ist. Voraussetzung für die kräftige Rosarotfärbung war jedoch bei der Methode A, daß die heiße Farblösung 5 Minuten lang einwirkte, während bei nur 1—2 Minuten langer Einwirkung entsprechend der Gasisschen Vorschrift ein blasses Rosarot erzielt wurde. Nach der Methode B zeigten die Tuberkelbacillen eine dunklere Randschicht und leichte Körnchenfärbung.

III. Modifikation nach Eisenberg.

Mit der von Eisenberg vorgeschlagenen Modifikation (Ersatz des Sublimat eosins durch Carbolcyanosin und Carbolsublimatcyanosin) konnten nur wenige leuchtend rotgefärbte Tuberkelbacillen dargestellt werden.

IV. Modifikation nach Telemann.

Die Entfärbung mit Alkalialkohol nach Telemann (1 Teil 30 proz. Kalilauge und 3 Teile 60 proz. Alkohol) an Stelle des sonst üblichen Säurealkohols ist nach dem Ergebnis meiner Versuche unzureichend und genügt nur bei ganz dünnen Ausstrichen. Die Zahl der dargestellten Tuberkelbacillen erreichte die der Methode A nach Gasis.

F. Färbemethoden nach von Betegh.

I. b-Tolinfärbung (Fuchsinmethylenblaumethode).

Beizung des Präparates mit 2—3 Tropfen 15 proz. Salpetersäure unter Erwärmen über der Flamme bis zur Dampfbildung, abspülen, färben mit einer Farbmischung von einem großen Tropfen Löffler-schen Methylenblau mit 2—3 Tropfen Carbofuchsin oder Löffler-schem Methylenblau und Carbofuchsin zu gleichen Teilen, erwärmen über der Flamme, bis leichte Dämpfe aufsteigen, gründlich mit Wasser abspülen, vollständige Entfärbung mit 60 proz. Alkohol, abspülen mit Wasser, nachfärben in der Weise, daß auf das Präparat eine dicke Schicht Wasser und darauf ein Tropfen Malachitgrünlösung gegeben wird, abspülen, trocknen.

Die Färbung der Tuberkelbacillen gelang gut. Es wurden übersichtliche Bilder dargestellt. Nach der Zahl der gefundenen Tuberkelbacillen bleibt die Methode jedoch hinter der Ziehlschen Originalmethode zurück.

II. Silbernitrat-Fuchsinfärbung.

Beizen mit 10 proz. Silbernitratlösung über der Flamme bei 80—90°, höchstens 1 Minute lang (nicht sieden lassen!), Rodinallösung (50%) 20—30 Sekunden bis die Schicht braun bis schwarzbraun erscheint, abspülen, färben mit Carbofuchsin 1—2 Sekunden ohne Erwärmen.

Die Methode lieferte nur wenig zufriedenstellende Ergebnisse. Es wurden nur wenige Granulareihen dargestellt. Auch war die Hüllenfärbung mit dem Fuchsin nicht deutlich ausgesprochen.

G. Modifikationen der Grammethode nach Much.

I. Originalmethode.

a) Modifikation I: Färben mit Anilinwassergentianaviolett, beizen mit Lugolscher Lösung, entfärben in absolutem Alkohol und Nelkenöl.

b) Modifikation II: Herstellung der Farblösung: Carbolmethyl-violettlösung (Mischung von gesättigter alkoholischer Lösung von Methylviolett BN (Grübler) 10 g und 2 proz. Carbolwasser (90 ccm); die filtrierte Lösung wird in hohen zylindrischen Gläsern einige Tage stehengelassen, damit sich der überschüssige Farbstoff am Boden und an den Wänden des Glases absetzt, und ist vor dem Gebrauch nochmals

zu filtrieren. Die Lösung ist zur Färbung der Granula nur brauchbar, wenn sie dunkelviolett ist, und am besten jedesmal neu anzusetzen.

Zur Färbung Farblösung dreimal bis zum Aufkochen erhitzen, beizen mit Lugolscher Lösung 1—5 Minuten, abspülen mit Wasser, entfärben mit 5proz. Salpetersäurelösung, dann 3proz. Salzsäurelösung und schließlich mit Acetonalkohol aa unter Schwenken bis der Ausstrich blaßblau erscheint.

c) Modifikation III: Färbung mit Methylviolettlösung nach Modifikation II, aufkochen oder längere Zeit bei 37° C einwirken lassen, entfärben in Jodkaliumwasserstoffsperoxydlösung (Jodkalium 5 g, 2proz. Wasserstoffsperoxydlösung 100 ccm) bis zu 2 Minuten und absolutem Alkohol.

Von diesen drei Färbemethoden wurde die erste nicht geprüft, da sie nur für Reinkulturmaterial in Frage kommt. Die dritte Methode wurde nach anfänglichen Versuchen aufgegeben, weil die Entfärbung nicht mit der genügenden Kraft erfolgte und die Anzahl der Tuberkelbacillen auch hinter der zweiten Methode zurückblieb.

Es wurde daher für die Vergleichsprüfungen lediglich die zweite Methode verwandt.

Ein Vergleich der kurzen Heißfärbung mit der 24stündigen Kaltfärbung und der Brutschrankfärbung (Much) hat die Überlegenheit der Heißfärbung ergeben. Es lassen sich auf diese Weise mehr Körnerreihen zur Darstellung bringen, die Tuberkelbacillen erscheinen durchweg auch kräftiger als bei der Kalt- und Brutschrankfärbung, und die Zahl der sichtbaren Tuberkelbacillen ist etwas größer als bei der Ziehl-Methode. Es muß aber dabei hervorgehoben werden, daß mangels näherer Erfahrungen mit der Gramfärbung nur solche Stäbchen als Tuberkelbacillen angesprochen wurden, die mehrere Granula im Stäbchen enthielten. Vier Granula wurden als Mindestzahl angenommen, weil die Stäbchennatur der Körnerreihe erst bei etwa vier hintereinanderliegenden Körnchen deutlich und einwandfrei erkennbar ist. Rechnet man die Stäbchen mit weniger als vier Granula zu den Tuberkelbacillen, so wird die Zahl der nach Much darzustellenden Tuberkelbacillen bei weitem größer.

Auch von anderen Untersuchern (Bittroff und Momose, Collmann, Dold, Rosenblat, Eisenberg) sind mit der Ziehl- und Much-Methode etwa gleichwertige Zahlen erhalten worden, während Frei, Böhm, Adam mit der Much-Methode bessere Erfolge erzielt haben. Zur Differentialdiagnose werden die Much-Methoden für wenig geeignet gehalten. Für den Nachweis der Tuberkelbacillen in Bakteriengemischen sind die Much-Methoden nur dann brauchbar, wenn sie mit Antiformin vorbehandelt worden sind (Caan, Bittroff und Momose, Collmann, Kronberger, Dold, Frei, Böhm). Um die Methode

für die Diagnose der Tuberkelbacillen auch in Bakteriengemischen zu verwenden, sind Doppelfärbungen empfohlen worden, durch die die Granula und die Bakterienhülle dargestellt werden sollen.

II. Abgeänderte Gramfärbemethoden nach Much.

a) Zweizeitige Doppelfärbung.

1. Modifikation nach Berger.

Färben nach Much II, dann kaltes Carbofuchsin 10—60 Sekunden lang einwirken lassen, entfärben in 1proz. Salzsäurealkohol bis der Ausstrich blaßrot erscheint.

Die Vereinigung der Muchschen Färbung mit der Hüllenfärbung durch Carbofuchsin stellt nach meinen Versuchen eine wesentliche Verbesserung der Muchschen Methode dar. Es fanden sich vorherrschend homogen rot gefärbte Tuberkelbacillen und Körnerreihen, die durch eine gemeinsame rosarote Hülle den Stäbchenverband erkennen ließen. Körnerreihen und homogene Stäbchen, die nicht Spuren der Fuchsinfarbe aufwiesen, waren nur vereinzelt sichtbar. Die Zahl der Tuberkelbacillen war wesentlich größer als nach der einfachen Ziehl-Färbung. Die Methode gehört daher mit zu den besten Färbemethoden.

Berger betont, daß die Fuchsinfärbung zweckmäßig am Schluß der Muchschen Färbung zu erfolgen hat, da bei der Vorfärbung mit Fuchsin die Rotfärbung der Hülle bei weitem nicht so ausgeprägt ist, selbst wenn zur Entfärbung an Stelle der Mineralsäure die mildere Essigsäure verwendet wird.

Dieses Urteil konnte bestätigt werden.

2. Die Modifikation nach Fontes.

Färben mit Ziehlschem Carbofuchsin unter Erwärmen, abspülen, färben mit Carbolkrystallviolett- oder Carbolgentianaviolettlösung unter Erwärmen, dann 2 Minuten lang stehenlassen, beizen in Lugolscher Lösung bis kein Metallspiegel mehr auftritt, entfärben in Acetonalkohol aa, abspülen mit Wasser, nachfärben mit Methylenblau.

Nach Fontes gefärbt sollen die Tuberkelbacillen als rote Stäbchen mit violetten Körnchen erscheinen, während die säurefesten Saprophyten violett gefärbt sein und dichtere Granulationen aufweisen sollen als die Tuberkelbacillen (Fontes). Fontes spricht daher seiner Methode eine entscheidende differentialdiagnostische Bedeutung zu. Dold hat bei seinen Prüfungen an Reinkulturmaterial von Tuberkelbacillen und anderen säurefesten Stäbchen beide Bakterien als rotgefärbte Stäbchen mit dunkelvioletten Körnchen nachgewiesen. Ein Unterschied zwischen beiden war nur insofern festzustellen, als die Zahl der homogenen und granulierten roten Stäbchen bei den Nichttuberkelbacillen geringer war als bei den Tuberkelbacillen. Sonstige Unterschiede konnte Dold nicht feststellen.

Die ausgesprochene Rotfärbung und Violettfärbung der Körnchen war bei meinen Prüfungen nicht besonders ausgeprägt. Vielfach wurden Farbenübergänge beobachtet, so daß ein klares Bild über die Leistungsfähigkeit der Methode nicht gewonnen wurde.

b) Einzeitige Doppelfärbungen.

1. Modifikation nach Weiss.

Färben mit einer Farbmischung von $\frac{3}{4}$ Carbofuchsinlösung und $\frac{1}{4}$ Muchscher Methylviolettlösung ein- bis zweimal 24 Stunden bei Zimmertemperatur, beizen mit Lugolscher Lösung 5 Minuten, entfärben mit 5proz. Salpetersäurelösung 5 Minuten, 3proz. Salzsäurelösung 10 Sekunden und Acetonalkohol \overline{aa} .

Nach Weiss erscheinen die Tuberkelbacillen als rötlich bis mattviolett gefärbte Stäbchen mit dunkelvioletten Körnchen, die meist dicker sind als die Tuberkelbacillen. Bei meinen Untersuchungen waren die Tuberkelbacillen leuchtend rosarot gefärbt, die Granula hoben sich dunkelviolet und deutlich aus dem Bacillenleib hervor. Die so gefärbten Tuberkelbacillen zeichneten sich scharf von der Umgebung ab, so daß sie nur schwer übersehen werden konnten. Die Zahl der dargestellten Tuberkelbacillen erreichte fast die bei der Ziehlschen Originalmethode.

2. Die Modifikation nach Wehrli-Knoll.

Färben mit einer Farbmischung von Carbofuchsinlösung und Muchscher Methylviolettlösung \overline{aa} unter Erwärmen bis Dämpfe aufsteigen, dann 4 Minuten lang stehen lassen, 10 Minuten lang beizen mit Lugolscher Lösung (oder Jodkaliumwasserstoffsperoxydlösung wie bei Much III), entfärben in $1\frac{1}{2}$ —2proz. Säurealkohol solange bis nach der Fuchsinentfärbung bläuliche Wolken auftreten, und Alkoholfärbung unter mikroskopischer Kontrolle.

Die Methode nach Wehrli-Knoll bleibt in der Deutlichkeit und in der Zahl der dargestellten Tuberkelbacillen erheblich hinter der Methode nach Fontes zurück. Der Unterschied zwischen dem Rot der Tuberkelbacillenhülle und dem Violett der Körnchen war bei meinen Versuchen nicht sonderlich ausgeprägt.

3. Modifikation nach von Betegh.

Färben mit Carbofuchsinlösung unter öfterem Erwärmen, ohne zu kochen, dann mit Carboldahlialösung (Dahlia 2,0; 95proz. Alkohol 20,0; Aqua destillata 50,0; konzentrierte Carbolsäurelösung 4—5 Tropfen, umschütteln und filtrieren) 2—5 Minuten bei Zimmertemperatur färben, abspülen mit Wasser, beizen mit Jodjodkalilösung (1 : 2 : 100) 10—15 Minuten, entfärben in Acetonalkohol 1 : 2, abspülen mit Wasser, nachfärben mit 1proz. wässriger Pikrinsäure oder Malachitgrünlösung.

Die Tuberkelbacillenhülle ist blaurot (venösrot) gefärbt, die Körnchen dagegen erscheinen schwarz auf gelbem oder grünem Grunde.

Die mikroskopischen Bilder sind lebhaft bunt, jedoch konnten nur wenig Tuberkelbacillen nachgewiesen werden.

Zusammenfassung.

A. Die Färbemethode nach Ziehl-Neelsen.

I. Meine vergleichenden Untersuchungen haben ergeben, daß die Leistungsfähigkeit der Methode ohne Schwierigkeit erheblich gesteigert werden kann, wenn nach folgenden Verfahren gefärbt wird:

a) Erwärmen der Fuchsinlösung bis zur Dampfbildung unter Vermeidung des Aufkochens und Einwirkung der erwärmten Farblösung während 4—5 Minuten.

b) Entfärbung mit 10 proz. Schwefelsäurelösung und 60 proz. Alkohol oder Brennspritus.

c) Nachfärbung mit Vesuvinlösung.

II. Die Kurzfärbung mit erwärmter Farbstofflösung (Carbolfuchsin bei der Methode Ziehl-Neelsen, Carbolmethylviolett bei der Muchschen Gramfärbung) zeitigt wesentlich bessere Ergebnisse als die Kaltfärbung während 24 Stunden.

III. Der Brennspritus ist zur Entfärbung ein vollwertiges Ersatzmittel für den Alkohol.

Die Schwefelsäure in 10 proz. Lösung schädigt die Tuberkelbacillen des Rindes im Auswurf nicht so stark wie die verdünnte Salpetersäure. Die wässrige 5 proz. Natriumsulfidlösung nach Konrich ist ein gutes, einfaches und billiges Ersatzmittel für die Säure- und Alkoholentfärbung, in der 10 proz. Lösung entfärbt sie jedoch auch die Rindertuberkelbacillen.

IV. Die getrennte Säure- und Alkoholentfärbung ergibt bessere Ergebnisse als die vereinigte Säurealkoholentfärbung.

V. Die übrigen Vorschläge zur Abänderung des Ziehl-Neelsenschen Färbeverfahrens stellen keine Verbesserungen dar. Die Doppelfärbung nach Malowan und die verschiedenen Doppelbeizverfahren haben zwar günstigere Zahlenergebnisse zur Folge, die zuverlässige Diagnose ist aber erschwert.

Die besonderen Entfärbungsmethoden mit Eisenchloridlösung, Fluoresceinalkohol und Korallinlösung bieten keine Vorteile.

Die Schnellfärbemethoden nach B. Fränkel und Gabbet bringen zwar zahlreiche Tuberkelbacillen zur Darstellung, ihre Deutung ist jedoch nicht immer zuverlässig.

B. Die Ziehl-Neelsensche und die anderen Färbemethoden.

I. Die besten Ergebnisse liefern die Ziehl-Neelsensche Methode mit den vorstehend beschriebenen Abänderungen, ferner die nach Hermann von Berka modifizierte Methode, die Pikrinmethode C. Spenglers und die Bergersche Modifikation der Muchschen Grammethoden.

Versuchsreihe Nr.:	Lungenauswurf				
	1	2	3	4	5
A. Ziehl-Neelsen.					
I. Originalmethode	1	0	19	25	7
II. a) Malowan (Anilinschwarz)	0	1	19	34	23
III. a) Ogawa (Kreosot)	1	0	25	29	10
b) 1. Eisenberg (Lugolsche Lösung)	0	0	25	45	4
b) 2. Porges (Jodtinktur)	1	0	50	37	6
b) 3. Eisenberg (Chromsäure)	0	0	38	0	4
b) 4. Claudius-Eisenberg (Pikrinsäure)	0	0	16	8	0
IV. a) Fuchsinkaltfärbung	0	0	19	52	7
b) Fuchsinwarmfärbung	1	1	16	33	5
V. a) 1. Schwefelsäure 10%	1	0	16	25	6
Schwefelsäure 5%	0	0	29	45	10
2. Salpetersäure 10%	0	0	27	10	5
Salpetersäure 5%	0	0	41	34	0
b) Brennspritus 60%	1	0	35	40	13
c) Salzsäurealkohol 3%	0	0	24	10	4
d) 1. Giacomo Gottstein (Eisenchlorid)	0	0	37	30	0
2. Czaplewski (Fluorescein)	0	0	23	55	0
3. Pappenheim (Korallin)	0	0	62	68	0
4. Konrich (Natriumsulfitlösung 10%)	0	0	25	17	10
Konrich (Natriumsulfitlösung 5%)	0	0	21	27	12
VI. a) Malachitgrün	0	1	55	31	7
b) Vesuvin	0	6	55	34	14
c) Chrysoidin	0	0	30	45	3
d) Kaliumpermanganat	1	9	61	31	15
e) Jodtinktur nach Kronberger	0	0	32	41	0
f) Chromsäurealkohol	0	0	16	63	1
g) Tropäolin	1	0	53	31	16
h) ohne Nachfärbung	0	0	11	19	9
VII. b) B. Fränkel	0	0	21	16	9
c) Gabbet	0	0	40	60	3
B. II. P. Ehrlich.					
1. Heißfärbung	0	4	50	25	16
2. Kaltfärbung	0	0	25	3	10
C. Hermann.					
I. Originalmethode	0	0	26	40	15
II. Berka	1	1	48	72	22
III. Caan	0	0	41	10	2
D. C. Spengler.					
I. Pikrinmethode	0	1	65	39	9
II. Hüllenmethode	0	0	35	55	4

Lungenauswurf			Gebärmutterausfluß		Milch					Lymphknoten					Summe d. Tuberkelbacillen
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
4	2	2	46	5	5	35	35	2	12	15	2	1	10	30	258
15	2	0	32	8	5	56	33	1	29	33	9	17	39	22	378
2	1	0	50	3	3	25	28	0	23	18	3	4	39	22	286
12	0	1	32	10	8	50	63	3	4	37	12	5	25	16	352
11	4	2	26	15	13	40	57	0	3	29	4	14	24	30	366
8	0	0	12	7	0	15	72	0	9	2	3	10	32	2	214
6	0	0	8	5	1	5	28	0	3	5	4	0	47	2	138
0	0	0	19	3	3	1	27	0	5	14	8	0	25	12	195
10	3	0	39	9	9	38	39	1	17	26	5	0	15	33	300
4	2	2	33	12	10	44	51	7	16	27	2	1	10	45	314
13	0	0	35	0	7	20	12	0	24	9	1	0	12	29	246
3	0	5	15	5	4	19	66	0	3	7	4	0	28	11	212
6	0	0	18	8	6	28	30	2	6	11	1	0	3	29	223
5	3	1	39	11	10	35	42	3	18	12	2	3	12	44	329
1	0	0	42	0	5	10	45	1	0	10	0	10	8	5	175
9	0	5	36	2	3	26	28	5	0	17	5	6	15	25	249
2	0	0	10	3	6	16	33	1	6	28	1	9	10	30	233
5	0	0	25	5	9	10	5	0	5	0	0	3	10	36	243
17	0	2	38	0	0	22	35	0	20	15	5	3	15	30	254
13	8	0	46	14	0	28	33	0	26	9	0	5	28	41	311
8	0	0	55	8	3	12	55	5	14	36	0	12	24	45	371
5	6	2	59	7	7	29	53	5	32	25	18	5	9	28	399
0	0	2	35	5	3	10	20	0	25	45	0	12	26	44	305
3	0	2	52	12	4	8	33	0	28	58	0	9	32	45	403
2	0	0	12	0	15	8	8	1	27	18	3	1	9	18	195
0	0	0	27	1	1	3	25	0	9	6	1	15	0	36	204
0	10	3	19	3	8	22	27	0	16	12	19	2	35	36	313
7	3	0	22	4	0	20	12	0	20	3	2	6	15	32	185
0	6	0	63	6	13	75	30	0	19	29	29	15	6	36	373
6	11	0	69	0	3	26	15	3	25	22	1	9	10	45	348
0	11	0	50	8	2	12	31	4	15	12	3	5	4	11	263
0	3	0	22	0	8	20	3	0	2	5	0	1	2	9	113
14	3	0	44	5	12	25	39	5	20	28	6	1	14	36	333
6	3	0	62	18	9	22	26	2	33	30	4	2	14	30	405
0	0	0	27	2	5	8	11	0	5	9	5	8	8	17	158
9	19	1	45	13	9	18	70	3	30	37	7	35	55	45	510
19	3	0	40	7	15	20	47	0	32	39	3	1	31	12	363

Versuchsreihe Nr.:	Lungenauswurf				
	1	2	3	4	5
E. Gasis.					
I. Methode A	0	0	42	39	6
II. Methode B	0	0	31	8	3
III. Karbolcyanosin (Eisenberg)	1	1	3	17	2
IV. Alkalialkohol (Telemann)	0	0	32	48	15
F. v. Betegh.					
I. b-Tolinfärbung	0	2	25	18	14
G. Much-Gram.					
I. Originalmethode Much II.					
Heißfärbung	0	0	42	12	3
Brutschrankfärbung	0	0	16	2	0
Kaltfärbung	0	0	22	0	0
II. a) 1. Berger	0	12	63	85	5
b) 1. Weiß	0	3	28	22	0
b) 2. Wehrli-Knoll	0	1	15	46	1

Die Methoden Ziehl-Neelsen, Hermann-Berka und Much-Berger hatten gleiche Ergebnisse, während die Pikrinmethode C. Spenglers diese noch weit übertraf.

II. Die Überlegenheit der Pikrinmethode über die Ziehlsche Färbemethode beruht auf der Darstellung der hüllengeschädigten Tuberkelbacillen und deren Jugendformen, beides nicht nach Ziehl darstellbare Formen.

III. Die übrigen Methoden, Koch-Ehrlich, Spenglers Hüllmethode, Gasis, von Betegh und die Muchschen Grammethoden nebst ihren Abänderungen bis auf die genannte Bergersche Modifikation, blieben mehr oder weniger weit in ihren Ergebnissen zurück.

C. Die Verwertung der Ergebnisse für die Diagnose der Tuberkelbacillen des Rindes.

Da die überwiegende Mehrzahl der Tuberkulosefälle durch die Ziehl-Neelsensche Färbung dargestellt wird und diese Färbung einfach und schnell vor sich geht, ist das ausgestrichene Material zuerst nach Ziehl-Neelsen oder nach Hermann-Berka oder nach Much-Berger zu färben.

Bei negativem Befund wird weiteres Material nach der Pikrinmethode C. Spenglers gefärbt. Sind auch nach der Spenglerschen Färbung keine Tuberkelbacillen gefunden worden, so kann mit annähernder Sicherheit das Freisein des Untersuchungsmaterials von Tuberkelbacillen angenommen werden.

Lungenauswurf			Gebärmutterausfluß		Milch					Lymphknoten					Summe Tuberkelbacillen
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
0	10	0	35	3	5	26	18	0	3	22	0	0	20	22	251
0	1	0	18	0	10	12	10	0	2	6	0	0	12	20	133
0	0	0	16	0	4	19	3	0	0	2	0	0	6	14	88
3	5	4	36	6	3	17	22	1	2	16	0	5	20	21	256
0	11	0	29	2	10	10	25	0	23	22	0	10	12	25	238
0	12	0	48	6	15	5	21	30	13	15	4	12	14	25	277
0	4	0	21	0	11	12	2	4	0	0	0	5	1	6	84
0	5	0	19	0	5	15	5	4	19	0	0	6	1	7	108
8	10	0	55	8	15	25	29	5	4	22	0	14	12	28	400
2	14	4	36	3	8	19	29	1	28	5	0	5	9	19	235
0	8	0	17	5	4	12	8	0	24	3	0	5	4	12	165

Quellennachweis.

Adam, J., Über einige neue Tuberkelbacillenfärbemethoden. Inaug.-Diss. Leipzig 1910. — Amann, J., Der Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **17**, 511. — Berger, Karl, Vgl. färberische Nachprüfungen der von Ziehl-Neelsen, Much und Gasis empfohlenen Färbemethoden für Tuberkelbacillen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **53**, 174. — Berka, F., Über das Verhältnis der zur Darstellung kommenden Tuberkelbacillen bei Sputumfärbemethoden. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **51**, 456. — Betegh, v., L., Neue differentialdiagnostische Färbemethoden für Tuberkelbacillen usw. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **47**, 654. — Betegh, v., L., Über eine Methode zur Darstellung der Tuberkelbacillensporen. Dieselbe Zeitschr., I, Orig., **49**, 461. — Betegh, v., L., Über eine neue Methode zur Darstellung der Sporen und Struktur bei den säurefesten Bakterien. Dieselbe Zeitschr., Orig., **52**, 551. 1909. — Bittroff, B. und Momose, K., Zur Frage des granulären Tuberkulosevirus. Dtsch. med. Wochenschr. 1912, S. 16. — Böhm, Joh., Über die verschiedenen Färbemethoden der Tuberkelbacillen und deren kritische Rezension. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **62**, 497. — Boit, E., Über Färbung und Gegenfärbung der Tuberkelbacillen. Brauers Beiträge zur Klinik d. Tub. **36**, H. 2. 1916. — Brieger, Über die diagnostische und therapeutische Bedeutung der Tuberkelbacillen und anderer Bakterien im Auswurf. Berl. klin. Wochenschr. 1900, S. 272. — Caan, A., Vergleichende Untersuchungen über neuere Methoden der Tuberkelbacillenfärbung. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **49**, 637. — Czaplewski, E., Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **8**, 685. — Collmann, C., Die Färbemethoden nach Much und Ziehl zum Nachweis der Tuberkel-

bacillen im Gewebe. *Dermatol. Zeitschr.* 1916, S. 321. — Dold, Über neuere Methoden der Färbung der Tuberkelbacillen. *Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamt* 36, H. 4. 1911. — Dordt, K., Zur Technik der Tuberkelbacillenfärbung. *Inaug.-Diss.* Tübingen 1919. — Eisenberg, Ph., Über neue Methoden der Tuberkelbacillenfärbung. *Berl. klin. Wochenschr.* 1910, S. 338. — Ehrlich, P., Eine neue Methode zur Entdeckung der Tuberkelbacillen. *Dtsch. med. Wochenschr.* 1882, S. 269. — Fitschen, E., Zur Untersuchung des Auswurfes auf Tuberkelbacillen. *Zeitschr. f. Tuberkul.* 28, H. 1, S. 29. — Fontes, A., Untersuchungen über die chemische Natur der den Tuberkelbacillen eigenen Fett- und Wachsarten. *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 49, 317. — Fränkel, B., Über die Färbung des Kochschen Bacillus. *Berl. klin. Wochenschr.* 1884, S. 193. — Frei, W., Über einige Anreicherungs- und Färbemethoden der Tuberkelbacillen im Sputum. *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 61, 411. — Gasis, D., Über eine neue Reaktion der Tuberkelbacillen. *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 50, 111. — Gasis, D., Weitere Erfahrungen über meine Methode der Tuberkelbacillenfärbung. *Berl. klin. Wochenschr.* 1910, S. 1499. — Gasis, D., Ein weiterer Beitrag zu meiner neuen Differentialfärbungsmethode der Tuberkelbacillen. *Berl. klin. Wochenschr.* 1909, S. 836. — Ingwersen, Fr., Kronberger oder Ziehl-Neelsen? *Zentralbl. f. inn. Med.* 1918, S. 193. — Jötten, K. W., und Haarmann, P., Neuere Färbeverfahren für Tuberkelbacillen. *Münch. med. Wochenschr.* 1920, S. 692. — Kayser, H., Vergleichende Untersuchungen mit neueren Methoden des Tuberkelbacillennachweises. *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 55, 91. — Kirchenstein, A., Über die Leistungsfähigkeit der Pikrinmethode C. Spenglers für die Färbung der Tuberkelbacillen. *Zeitschr. f. Tuberkul.* 19, H. 1, S. 12. — Knoll, W., Morphologisches und Biologisches über mit Methylviolett-Fuchsin gefärbtes Tuberkulosevirus. *Brauers Beiträge zur Klinik d. Tub.* 15, 211. 1910. — Koch, R., Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berl. klin. Wochenschr.* 1882, Nr. 15 u. 16. — Koch, R., Die Ätiologie der Tuberkulose. *Mitt. a. d. Kais. Gesundheitsamt* 2, 1. 1884. — Köhler, *Inaug.-Diss.* Leipzig-Dresden 1910; ref. in *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Abt. I, Ref.*, 48, 447. — Kongstedt, E., Vergleichende Untersuchungen über die Methode von Hermann und von Ziehl-Neelsen. *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 84, 513. — Konrich, Eine neue Färbung für Tuberkelbacillen. *Dtsch. med. Wochenschr.* 1920, Nr. 27. — Kronberger, H., Eine neue einfache Strukturfärbung. *Brauers Beiträge zur Klinik d. Tub.* 16, H. 2. 1910. — Kühne, H., Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen. *Zentralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk., Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 8, 293. — Leichtweiss, Fr., Vergleichende Sputumuntersuchungen. *Zeitschr. f. Tuberkul.* 25, H. 2, S. 108. — Levy, M., Über die Färbung der Tuberkelbacillen nach Gasis. *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 55, 253. — Lipp, H., Zur Technik der Tuberkelbacillenfärbung im Sputum und Harn. *Dermatol. Wochenschr.* 66, 26. 1918. — Malowan, S., L., Über den mikroskopischen Nachweis der Tuberkelbacillen. *Wien. klin. Wochenschr.* 1919, S. 982. — Marx, E., Notiz zur Färbung tuberkuloseverdächtiger Sputa. *Münch. med. Wochenschr.* 1919, S. 417. — Mori, *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Ref.*, 61, 400. — Much, H., Über die granuläre, nach Ziehl nicht färbbare Form des Tuberkulosevirus. *Brauers Beiträge zur Klinik d. Tub.* 8, 85. 1907. — Müller, A., Über Tuberkelbacillen- und Sporenfärbung. *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig.*, 29, 791. — Ogawa, *Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I,*

Ref. **36**, 606. — Orth, J., Notizen zur Färbetechnik. Berl. klin. Wochenschr. 1883, S. 421. — Ostertag, R., v., Die Bekämpfung der Tuberkulose des Rindes. Berlin 1913: Rich. Schötz. — Pappenheim, A., Grundriß der Farbohemie. Berlin 1901: Aug. Hirschwald. — Porges, Sitzungsbericht. Berl. klin. Wochenschrift 1900, S. 957. — Rindfleisch, Klinische Demonstrationen. Dtsch. med. Wochenschr. 1883, S. 16. — Rosenblat, S., Vergleichende Untersuchungen über neuere Färbemethoden der Tuberkelbacillen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **58**, S. 173. — Rosenthal, W., Zum färberischen Nachweis der Tuberkelbacillen. Münch. med. Wochenschr. 1918, S. 1282. — Scharr, E., Die Entnahme von Lungenschleim bei Rindern zur Feststellung der offenen Lungentuberkulose. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1914, Nr. 24. — Scharr, E., Die Entnahme von Lungenschleim bei Rindern vermittels der Trachealkanüle. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1919, Nr. 27. — Scharr und Opalka, Über einen Tracheotubus als Hilfsmittel zur Entnahme von Bronchialschleim. Zeitschr. f. Infektionskrankh., parasit. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere **9**. 1911. — Scharr und Opalka, Über ein Verfahren zum bakteriologischen Nachweis der Lungentuberkulose des Rindes. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1911 und Deutsche tierärztliche W. 1912, S. 317. — Spengler, C., Ein neues immunisierendes Heilverfahren. Dtsch. med. Wochenschr. 1905, S. 1228. — Spengler, C., Neue Färbemethoden für Perlsucht und Tuberkelbacillen und deren Differentialdiagnose. Dieselbe Zeitschr. 1907, S. 337. — Spengler, C., Über Splittersputa Tuberkulöser. Zeitschr. f. Hyg. **49**, 541. 1905. — Tarchetti, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Ref., **35**, 410. — Telemann, W., Tuberkelbacillennachweis. Dtsch. med. Wochenschr. 1910, S. 891. — Ulrichs, B., Färbung der Tuberkelbacillen mit Carbofuchsin-Chromsäure. Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 17. — Wehrli, E. und Knoll, W., Über die nach Much färbbare granuläre Form des Tuberkulosevirus. Brauers Beiträge zur Klinik d. Tub. **14**, 115. 1909. — L. Weiss, Über den Gehalt käsig kreidiger Lymphdrüsen an Tuberkelbacillen. Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 9. — Weiss, M., Über ein neues Verfahren der Nachfärbung von Tuberkelbacillenpräparaten. Zeitschr. f. Tuberkul. **30**, H. 6, S. 330. — Ziehl, F., Zur Lehre von den Tuberkelbacillen. Dtsch. med. Wochenschr. **1882**, 451 und **1883**, 62. — Ziehl, F., Über die Färbung des Tuberkelbacillus. Dieselbe Zeitschr. 1883, Nr. 17.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, der Landwirtschaftskammer für die Provinz Brandenburg, sowie dem Direktor des Bakteriologischen Instituts, Herrn Dr. Scharr, meinen verbindlichsten Dank für das Entgegenkommen auszusprechen, daß mir das Untersuchungsmaterial und die Einrichtungen des Instituts für die Anfertigung meiner Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.
