Aus dem Hauptgesundheitsamt der Stadt Berlin:
Hygienisch-bakteriologisches Institut.
**Neue Untersuchungen mit unserem Sputum-Desinfektions-
verfahren.**

Von Dr. Friedrich Simon¹⁾ und Dr. Georg Wolff.

In einer früheren Mitteilung (D. m. W. 1922 Nr. 8) haben wir über die Ergebnisse unserer Versuche berichtet, Tuberkelbazillen im Sputum mittels Zugabe von Chlorkalk und Staßfurter Salz in bestimmten Mengenverhältnissen abzutöten. Der Ausfall unserer Tierversuche war in sämtlichen Fällen so eindeutig, daß wir uns berechtigt glaubten, dieses einfache Verfahren zur Desinfektion des tuberkulösen Sputums den Praktikern empfehlen zu können.

„Die Ausführung geschieht in der Weise,“ schrieben wir damals, „daß zu dem Sputum tee- bzw. eßlöffelweise Chlorkalk und in zweifacher Menge Staßfurter Salz zugegeben wird, und zwar so oft, bis das Gemisch durch Umrühren mit einem Stabe zu einem gleichmäßigen, salbenförmigen Brei geworden ist, wenn nötig, unter Zusatz geringer Wassermengen. Für geringe Sputummengen (20–30 g) reichen $\frac{1}{2}$ Eß-

¹⁾ Siehe nebenstehende Anmerkung.

löffel Chlorkalk und 1–2 Eßlöffel Staßfurter Salz aus, für größere Sputummengen sind entsprechend stärkere Zusätze zu wählen. Hauptgewicht ist jedesmal darauf zu legen, daß die völlige Umwandlung der zähen Schleimmengen in einen salbenförmigen Brei von gleichmäßiger Konsistenz erfolgt. Man läßt den Brei dann noch drei Stunden stehen; nunmehr ist die Desinfektion als beendet anzusehen.“ Auf Grund dieser Angaben gestalteten sich die Versuche zur Prüfung des Verfahrens folgendermaßen: 25 ccm tuberkelbazillenhaltigen Sputums wurden in einem Becherglas mit 15 g = 1 Eßlöffel Chlorkalk und 50 g = 2 Eßlöffel Staßfurter Salz versetzt und nach Hinzugabe von wenig Wasser (5–10 ccm) mehrmals mit einem Glasstab durchgerührt, bis ein gleichmäßiger Brei entstanden und das Sputum homogenisiert war. Die Homogenisierung ist dann schon nach kurzer Zeit (10–20 Minuten) eingetreten; es ist aber darauf zu achten, daß das Material gut durchgerührt wird, damit das Salzgemisch wirklich mit allen Teilen des Sputums in Berührung kommt. Da das Desinfektionsmittel keine Lösung ist, sondern in fester Form zugesetzt wird, ist dies von prinzipieller Bedeutung für die Anwendung des Verfahrens. Anders lautende Ergebnisse über die Wirksamkeit unseres Verfahrens werden sich im wesentlichen darauf zurückführen lassen, daß diese Versuchsbedingungen nicht eingehalten wurden, auf die in unserer ausführlichen Publikation besonders hingewiesen wurde. Nach drei Stunden wird der völlig homogenisierte Brei zur Abstumpfung des Chlors mit Natriumsulfatlösung versetzt, bis keine Bläuung von Jodkaliumstärkepapier mehr eintritt, und nunmehr auf Meerschweinchen verimpft.

Von den 18 Meerschweinchen, die mit wechselnden Mengen in verschiedenen Versuchsreihen geimpft waren, erkrankte nicht eins an Tuberkulose; sechs gingen vorzeitig an interkurrenten Krankheiten ein, die übrigen zwölf Tiere zeigten bei der Sektion nach durchschnittlich 2–3 Monaten makroskopisch und mikroskopisch keinerlei tuberkulöse Veränderungen, während die sämtlichen Kontrolltiere generalisierte Tuberkulose aufwiesen.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen die Erfahrungen, die Uhlenhuth bei der Prüfung unseres Verfahrens gewonnen hat. Er hat zunächst in mehreren Anmerkungen (Kongreßbericht zum Tuberkulosekongreß 1921 in Bad Elster. Zschr. f. Tbc. 34, H. 7 [Ergänzungsheft], S. 594; Arch. f. Hyg. 1921, Bd. 90, H. 6, 7 u. 8, S. 331; D. m. W. 1922 Nr. 15 S. 495) mitgeteilt, daß seine Nachprüfung unseres Verfahrens dessen völlige Wirkungslosigkeit ergeben hat; in seiner jüngsten Arbeit im Arch. f. Hyg. 1922, Bd. 91, H. 1 u. 2, S. 90 ff. veröffentlicht Uhlenhuth nunmehr auch seine Protokolle dazu.

Erscheint schon die Tatsache außerordentlich auffallend, daß von Uhlenhuths 16 Meerschweinchen 15 tuberkulös wurden, von unseren Tieren nicht eins, so verstärkt sich diese Diskrepanz im Ausfall der Versuchsergebnisse noch mehr durch die weitere Nachprüfung, über deren Ergebnisse wir heute berichten wollen. Nachdem Hailer in der Diskussion zu unserem Vortrag in der Berliner Mikrobiologischen Gesellschaft am 14. XI. 1921 die abweichenden Resultate Uhlenhuths bekannt gegeben hatte und gleichzeitig damit auch die Versuchsmethodik, nach der unser Verfahren von ihnen im Tierversuch nachgeprüft worden war, entschlossen wir uns, zur Aufklärung der Differenzen auch nach dieser, von der unseren wesentlich abweichenden Methodik eine größere Reihe von Tierversuchen auszuführen. Uhlenhuth geht dabei so vor, daß er zu dem Gemisch von Sputum und Chlorkalk-Staßfurter Salz, das zur Abstumpfung des Chlors mit Natriumsulfatlösung versetzt ist, Essigsäure bis zur schwachsauren Reaktion zugibt, um den noch ungelösten, alkalischen Aetzkalk in Lösung zu bringen. (Uhlenhuth irrt übrigens, wenn er auf S. 93 Arch. f. Hyg. 91 H. 1 u. 2 annimmt, daß wir uns erst nach ihm der Natriumsulfatmethode zur Abstumpfung des Chlors bedient haben; wir haben vielmehr nach einem ersten Versuch mit Durchleitung von Kohlensäure stets die allgemein geübte Natriumsulfatabstumpfung des Chlors angewandt, wie auch in unserer ausführlichen Veröffentlichung [D. m. W. 1922 Nr. 8] ausdrücklich bemerkt ist.) Wenn auch dieses modifizierte Prüfungsverfahren methodologisch nicht ohne weiteres einwandfrei ist, vor allem deshalb, weil es eine völlig neue und nicht indifferente Komponente (Essigsäure) in die Versuchsmethodik einführt, so haben wir dennoch diese Uhlenhuth-Hailersche Methodik zwei neuen Versuchsreihen zugrundegelegt, um die vorhandenen Differenzen zu klären.

Die neue Prüfung unseres Verfahrens nach der Uhlenhuth-Hailerschen Methodik gestaltete sich folgendermaßen: 25 ccm stark tuberkelbazillenhaltigen Sputums wurden mit 15 g Chlorkalk = 1 Eßlöffel und 50 g Staßfurter Salz = 2 Eßlöffel versetzt. Das Gemisch wurde in kurzen Abständen so lange gerührt, bis ein gleichmäßiger Brei entstanden war, was meist schon nach 10 bis 20 Minuten der Fall war. Nach drei Stunden wurde dem Gemisch so viel 20%ige Natriumsulfatlösung zugegeben, bis Jodkaliumstärkepapier nicht mehr gebläut wird, danach zur Auflösung des ungelösten Aetzkalkes noch Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion des Gemisches. Unter starker Schaumbildung wird ein großer Teil des Breis gelöst; danach wird das Gemisch mehrmals zentrifugiert und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bis das Waschwasser gegen Lackmus nicht mehr sauer reagiert. Im Ausstrich des Sediments sind noch reichlich Tuberkelbazillen nachweisbar, wenn auch nicht mehr so gut färbbar und in der Form

scharf umrissen wie im Originalausstrich. Das Sediment des Gesamtsputums von 25 ccm wird wieder mit Kochsalzlösung aufgenommen und davon der dritte Teil, also eine recht erhebliche Menge, auf zwei Meerschweinchen verimpft. Ein gleicher Versuch wurde nach 4 Wochen mit 25 ccm Sputum wiederholt, jedoch nur mit dem Unterschied, daß diesmal das Gesamtsediment der verarbeiteten Sputummenge auf sechs Meerschweinchen verimpft wurde. Gleichzeitig wurden Kontrolltiere mit dem nicht vorbehandelten Sputum geimpft.

Keines der Tiere zeigte bei der nach durchschnittlich 2–3 Monaten vorgenommenen Sektion Tuberkulose; hingegen bekamen alle Tiere im Anschluß an die Impfung eine starke, mehr oder weniger umschriebene Schwellung an der Injektionsstelle, die jedoch im Lauf der weiteren Beobachtung zurückging, allerdings bis zur Obduktion nirgends völlig verschwand. Da wir gewöhnlich in der Gegend oberhalb der linken Leistenbeuge zu spritzen pflegen, hielten wir diese Schwellung anfangs für eine tuberkulöse Infiltration der zugehörigen Leistenröhren, erkannten jedoch bald, daß es sich nicht darum handelte, sondern um das nicht resorbierte Depot des eingespritzten Sediments. Auffallend war von vornherein, daß diese Schwellung schon wenige Tage nach der Impfung deutlich war, dann im Laufe der nächsten Wochen wieder zurückging. In einem Fall (Meerschweinchen 4) wurde das ganze geschwollene Gewebstück exstirpiert und auf zwei neue Meerschweinchen (Nr. 11 und 12) subkutan übertragen; von diesen starb eins vorzeitig, das andere wurde nach drei Monaten getötet, ohne irgendwelche tuberkulösen Veränderungen aufzuweisen. Auch im Ausstrich des exstirpierten Materials, das in seiner körnigen Beschaffenheit und gelbbraunen Verfärbung deutlich an das ursprünglich eingespritzte Sediment erinnerte, waren Tuberkelbazillen färbereich nicht mehr nachweisbar. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei der Sektion der anderen Tiere gemacht; es fand sich stets in der Gegend der Injektionsstelle eine Schwellung, die noch nach drei Monaten beim Einschnitt etwas gelbbraunen, körnigen Inhalt entleerte, der noch deutlich an das verimpfte Sedimentmaterial erinnerte, ohne jedoch Tuberkelbazillen zu enthalten; ein Zeichen dafür, daß die ursprünglich darin vorhandenen, im Sediment färbereich nachgewiesenen Tuberkelbazillen beim Einspritzen des Sediments bereits tot waren und von den Gewebssäften im Organismus des Tiers schnell aufgelöst wurden. Dementsprechend fiel auch der Tierversuch in allen Fällen negativ aus, d. h. keins der geimpften Tiere erkrankte an Tuberkulose, wie aus dem nachstehenden Auszuge aus unseren Versuchsprotokollen ersichtlich ist, von deren ausführlicher Wiedergabe aus Raumgründen abgesehen werden kann.

Versuch vom 14. XII. 1921.

Meerschw. 1 (subkutane Einspritzung des Sediments von 4 ccm mit Chlorkalk und Staßfurter Salz behandelten Sputums)	Get. 24. I. 1922 frei von Tuberk.
do. 2	Get. 16. III. 1922 frei von Tuberk.
do. 3 (Kontrolltier; 0,4 ccm unbehandelten Sputums)	Gest. 28. I. 1922 Generalis. Tuberk.

Versuch vom 14. I. 1922.

Meerschw. 4 (subkutane Einspritzung des Sediments von 4 ccm mit Chlorkalk und Staßfurter Salz behandelten Sputums)	Get. 12. III. 1922 frei von Tuberk.
do. 5	Get. 30. III. 1922 do.
do. 6	Gest. 6. II. 1922 do.
do. 7	Get. 11. V. 1922 do.
do. 8	Get. 20. IV. 1922 do.
do. 9	Gest. 23. III. 1922 do.
do. 10 (Kontrolltier; 0,4 ccm unbehandelten Sputums)	Gest. 6. II. 1922 Generalis. Tuberk.

Versuch vom 21. II. 1922.

Meerschw. 11 (Verimpfung des von 4 exstirpierten Materials aus der im Anschluß an die Impfung entstandenen Schwellung)	Gest. 25. II. 1922 infolge Stallseuche
do. 12	Get. 26. V. 1922 frei von Tuberk.

Es ergibt sich demnach, daß auch von diesen Versuchstieren, die nach der Uhlenhuth-Hailerschen Methodik geimpft waren, keins tuberkulös wurde, während die Kontrolltiere schon nach sechs bzw. drei Wochen an hochgradiger Tuberkulose starben. Nur ein Tier (Meerschweinchen Nr. 11) ging vorzeitig an einer Stallseuche ein; die anderen neun blieben gesund.

Wir verfügen daher jetzt zusammen mit unseren früheren Versuchen über ein Versuchsmaterial von im ganzen 36 Tieren; davon dienten 8 als Kontrollen, 7 gingen vorzeitig an interkurrenten Krankheiten ein. Es bleiben demnach 21 Tiere, die nach der Impfung mit dem von uns behandelten Sputum völlig tuberkulosefrei blieben, aus der ersten Versuchsreihe 12 Tiere, aus der heute veröffentlichten weitere 9 Tiere. Sowohl bei der ursprünglich von uns angewandten Prüfungsmethode, wie nach der Uhlenhuth-Hailerschen Modifikation erwiesen sich die Tuberkelbazillen in dem nach unserem Verfahren mit Chlorkalk und Staßfurter Salz behandelten Sputum nicht mehr als infektiösfähig für Meerschweinchen.

Wie erklären sich nun die auffallenden Unterschiede in Uhlenhuths und unseren Ergebnissen? Daß hier nicht dieselben Versuchsbedingungen vorliegen können, liegt bei dem diametral entgegengesetzten Ausfall der Ergebnisse auf der Hand. Wir haben zunächst zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einmal ist der jetzt im Handel befindliche Chlorkalk, wie uns zahlreiche Analysen verschiedener Sorten gezeigt haben, außerordentlich wenig konstant in seinem Chlorgehalt.

Die im Chemischen Institut des Hauptgesundheitsamts vorgenommenen Analysen ergaben Schwankungen zwischen 8,8 und 23,92% Chlor in verschiedenen käuflich erworbenen Chlorkalksorten. Das Deutsche Arzneibuch schreibt für Chlorkalk einen Chlorgehalt von 25% vor; dieser Mindestgehalt wurde von keiner der untersuchten Proben erreicht. Aber auch mit Chlorkalk von recht niedrigem Cl-Gehalt (12,76% in einem unserer Versuche) gelang uns die restlose Abtötung der Tuberkelbazillen im Auswurf. Ob Uhlenhuth mit Chlorkalk von noch niedrigerem Chlorgehalt gearbeitet hat, entzieht sich unserer Beurteilung, da Angaben darüber fehlen. Wir geben aber zu, daß in dieser Inkonstanz des jetzt käuflichen Materials ein Nachteil der Methode liegt und daß der gewöhnliche Chlorkalk besser durch ein konstant gehaltenes Präparat ersetzt werden sollte.

Noch wichtiger ist aber der zweite Punkt, auf den wir hinweisen wollen. Wir haben bei der Ausführung des Verfahrens besonders darauf Wert gelegt, daß das mit Chlorkalk und Staßfurter Salz versetzte Sputum gut umgerührt wird, so lange, bis das Gemisch zu einem gleichmäßigen, salbenförmigen Brei geworden ist. „Hauptgewicht ist jedesmal darauf zu legen, daß die Umwandlung der zähen Schleimmassen in einen salbenförmigen Brei von gleichmäßiger Konsistenz erfolgt,“ war der Wortlaut in unserer ausführlichen Publikation. Nun schreibt Uhlenhuth selbst, daß in dem von ihm behandelten Sputum „noch reichlich schleimige Stoffe vorhanden und in diesen auch noch gut erhaltene Tuberkelbazillen nachzuweisen waren“. Vielleicht trägt dazu auch der Umstand bei, daß Uhlenhuth bei der Ausführung des Verfahrens ziemlich große Wassermengen zugefügt und dadurch eine stärkere Verdünnung des Gemisches herbeigeführt hat, als in der Vorschrift zu unserer ausführlichen Publikation angegeben war (5 bis 10 ccm Wasser auf 25 ccm Sputum). Auch dadurch kann die Erzielung des, salbenförmigen, nicht mehr schleimigen Breis, auf die wir das Hauptgewicht legen, hintangehalten werden. Bei schon an sich dünnflüssigem Sputum ist Wasserzusatz überhaupt nicht erforderlich. Wir dürfen daraus wohl schließen, daß von Uhlenhuth und Joetten die Versuchsbedingungen, wie sie erst in unserer ausführlichen Publikation genau beschrieben wurden, nicht streng eingehalten worden sind. Das ist aber deshalb von besonderer Bedeutung, weil bei unserem Verfahren, das nicht mit flüssigen Lösungen arbeitet, eine intensivere Vermischung des Sputums mit den festen Zusätzen unbedingt erforderlich ist. Erst durch die mechanische Verrührung kann die Homogenisierung des Sputums und im Anschluß daran die Desinfektion erfolgen.

Wir müssen daher annehmen, daß Uhlenhuths und Joettens völlig abweichende Resultate darauf zurückzuführen sind, daß sie unser Sputumdesinfektionsverfahren nicht in der von uns vorgeschriebenen Form ausgeführt haben, ganz ähnlich, wie das auch Schuster für das von ihm ausgearbeitete und von den gleichen Autoren mit ganz andersartigem Erfolg nachgeprüfte Sputumdesinfektionsverfahren mit Aetzkalk angegeben hat (Zschr. f. Tbc. 1921, Bd. 35, H. 5, S. 342). Die auch an anderen Stellen im Gang befindlichen Nachprüfungen werden hoffentlich bald die erforderliche Klärung bringen.

Daß aber Sputumdesinfektionsversuche ganz verschieden ausfallen können, wenn die Desinfektionsvorschriften nicht genau eingehalten werden, wird bei der Art des zu desinfizierenden Sputummaterials, der wechselnden Konsistenz des Sputums, der stets verschiedenen Menge der darin enthaltenen Tuberkelbazillen nicht wundernehmen, teilt doch Uhlenhuth selbst in einem Nachtrag zu seiner jüngsten Arbeit im Arch. f. Hyg. 91 S. 95 mit, daß bei seinem eigenen Verfahren mit Alkalysol sogar noch bei vierstündiger Einwirkung einige Male Versager beobachtet wurden.