

## Weitere Mitteilung über das Tuberkulin.<sup>1)</sup>

Von

Prof. R. Koch.

Nach dem Bekanntwerden des Tuberkulins sind mehrfach Versuche gemacht, das in demselben enthaltene wirksame Prinzip zu isolieren, um es frei von anderen Stoffen anwenden zu können, denen man störende Nebenwirkungen zuschreiben zu müssen glaubte. Auch ich habe mich mit solchen Versuchen seit längerer Zeit beschäftigt und will über die gewonnenen Resultate im nachstehenden berichten. Da bis jetzt nur vorläufige Mitteilungen über die hierher gehörigen Arbeiten vorliegen und mir auch nach meinen eigenen Untersuchungen die Frage noch nicht völlig spruchreif zu sein scheint, so werde ich mich darauf beschränken, meine eigenen Befunde zu schildern, einer späteren Zeit es überlassend, Vergleiche zwischen den Resultaten der verschiedenen Beobachter anzustellen und etwaige Widersprüche aufzuklären.

Einige Vorversuche hatten erkennen lassen, daß die wirksame Substanz des Tuberkulins nicht zu den Alkaloiden oder Ptomainen gehört, sondern ein den Eiweißkörpern nahestehender Stoff ist, von dem es fraglich sein mußte, ob er die gewöhnlichen zur Isolierung solcher Stoffe angewendeten Manipulationen vertragen würde, ohne in seiner Zusammensetzung verändert zu werden. Ich bin deswegen in der Weise vorgegangen, daß ich nach jedem chemischen Eingriff die dadurch erhaltenen Produkte auf ihre Wirkungsweise am Tierkörper prüfte, um mich davon zu überzeugen, ob der wirksame Stoff überhaupt noch vorhanden und, wenn dies der Fall war, ob eine vollständige oder nur eine teilweise Trennung erzielt war. Ohne eine solche Schritt für Schritt der Untersuchung folgende Kontrolle verliert man sehr bald den Faden und gerät auf Irrwege.

Da in diesem Falle auf den Tierversuch und die richtige Beurteilung desselben fast alles ankommt, so wird es notwendig sein, auf denselben etwas näher einzugehen. Gesunden Meerschweinchen kann, wie ich früher bereits auseinandergesetzt habe, das Tuberkulin in ganz bedeutenden Mengen beigebracht werden, ohne daß eine merkliche Wirkung eintritt. Diese sind als Reagens für den wirksamen Stoff des Tuberkulins also nicht zu gebrauchen. Tuberkulöse Meerschweinchen reagieren dagegen auf verhältnismäßig kleine Dosen des Tuberkulins in einer ganz charakteristischen Weise. Allerdings genügt es für den vorliegenden Zweck nicht, dem Tiere nur so viel Tuberkulin zu injizieren, daß es in ähnlicher Weise reagiert, wie wir es beim tuberkulösen Menschen zu sehen gewöhnt sind; denn die Temperatursteigerung und auch die örtlichen Symptome sind beim Meerschweinchen nicht ausgesprochen genug, um ein sicheres Urteil über die Wirkung einer einmaligen Tuberkulininjektion zuzulassen. Es bleibt nichts übrig, als dem Tiere eine so große Dosis beizubringen, daß es dadurch getötet wird. Bei Meerschweinchen, welche schon hochgradig tuberkulös sind, also 8—10 Wochen

<sup>1)</sup> Aus Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1891, Nr. 43.

nach der Impfung, genügt hierzu oft schon 0,01 g Tuberkulin. Für Tiere mit weniger vorgeschrittener Tuberkulose, 4—5 Wochen nach der Impfung, ist in der Regel 0,2—0,3 erforderlich. Einer Dosis von 0,5 g erliegen aber auch diese ausnahmslos. Nimmt man also Tiere, welche vor mindestens 4 Wochen geimpft sind, und injiziert ihnen 0,5 g Tuberkulin oder eine dieser Dosis entsprechende Menge des aus dem Tuberkulin gewonnenen und auf seine Wirksamkeit zu prüfenden Stoffes, dann kann man, je nachdem das Tier stirbt oder am Leben bleibt, daraus auf das Vorhandensein oder Fehlen des wirksamen Stoffes schließen. Man verfügt damit über ein durchaus zuverlässiges Reagens, welches mich bis jetzt in mehreren hundert Versuchen nicht ein einzigesmal im Stich gelassen hat.

Es sind nun ferner die Erscheinungen, unter welchen das tuberkulöse Tier durch das Tuberkulin getötet wird, so charakteristisch, daß eine Verwechslung mit einer zufällig eingetretenen anderweitigen Todesart nicht zu befürchten ist. Das Tier stirbt je nach dem Grade der bei ihm vorhandenen Tuberkulose in 6—30 Stunden. Tritt der Tod früher oder später ein, dann kann er nicht mehr mit Sicherheit auf die Wirkung des Tuberkulins bezogen werden; bei meinen Versuchen ließ sich in allen derartigen Fällen eine andere Todesursache, wie Pneumonie, malignes Ödem oder andere Infektionskrankheiten nachweisen.

An der Leiche eines durch Tuberkulin getöteten tuberkulösen Meerschweinchens finden sich folgende Veränderungen. Die Impfstelle des am Bauche subkutan geimpften Tieres zeigt sich beim Zurückschlagen der Bauchdecken durch Gefäßinjektion stark gerötet; oft hat sie eine dunkle, fast violette Färbung; die Injektionsröte erstreckt sich auch mehr oder weniger weit auf die Umgebung. Die der Impfstelle benachbarten Lymphdrüsen sind ebenfalls stark gerötet. Milz und Leber lassen außer den tuberkulösen Veränderungen an ihrer Oberfläche zahlreiche punkt- bis hanfkorngroße Flecken erkennen, welche schwärzlichrot gefärbt sind und ganz das Aussehen von Ekchymosen haben, wie sie bei manchen Infektionskrankheiten gefunden werden. Untersucht man diese Stellen mikroskopisch, dann stellt sich heraus, daß es sich nicht um Blutextravasate handelt, sondern um eine enorme Erweiterung der Kapillaren in der nächsten Umgebung der tuberkulösen Herde. Die Kapillaren sind vollgestopft mit roten Blutkörperchen, welche so dicht zusammengedrängt liegen, daß es so aussieht, als sei hier der Blutstrom zum vollständigen Stillstand gekommen. Nur ausnahmsweise findet man Zerreißen der Gefäße und Bluterguß in das Gewebe. Auch in der Lunge finden sich, aber nicht regelmäßig und nicht so in die Augen fallend, ähnliche Veränderungen. Der Dünndarm ist oft ziemlich stark und gleichmäßig gerötet. Das, was in diesem Symptomenkomplex nie fehlt und geradezu pathognomisch ist, sind die hämorrhagie-ähnlichen Flecke an der Leberoberfläche. Am besten sieht man sie bei Tieren mit 4—5 Wochen alter Tuberkulose, deren Leber schon von zahlreichen grauen Knötchen durchsetzt ist, aber noch nicht infolge ausgedehnter Nekrose das bekannte, eigentümliche gelb und braun marmorierte Aussehen angenommen hat. Hat man nur einige Male die hier geschilderten Veränderungen gesehen, dann wird man, wie gesagt, wohl niemals in Zweifel darüber bleiben, ob eine Tuberkulinwirkung vorliegt oder nicht.

Meine ersten Versuche zur Isolierung des wirksamen Stoffes aus dem Tuberkulin wurden mit Alkohol angestellt.

Mischt man das Tuberkulin mit dem fünffachen Volumen absoluten Alkohols, dann scheidet sich eine braune harzartige Masse aus, welche dem Boden des Gefäßes fest anhaftet. Sowohl die abgeschiedene braune Masse, als die darüber stehende Flüssigkeit, welche sich klar abgießen läßt, zeigen bei der Prüfung in nahezu gleicher Stärke die Tuberkulinwirkung. Eine Trennung läßt sich also auf diese Weise nicht erreichen.

Wenn aber Alkohol in immer größerem Überschuß angewendet wird, dann bekommt man schließlich statt der harzartigen Masse einen feinkörnigen Niederschlag, der, wiederholt mit absolutem Alkohol gewaschen, auf einem gehärteten Filter unter Absaugen gesammelt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, ein fast weißes Pulver gibt. Um diesen Niederschlag zu erhalten, verfährt man am zweckmäßigsten in der Weise, daß man das Tuberkulin langsam in die 20- bis 25fache Menge von absolutem Alkohol unter fortwährendem Umrühren eintropfen läßt, nach dem Absitzen des Niederschlages den Alkohol abgießt, von neuem absoluten Alkohol in gleicher Menge hinzufügt, dies einige Male wiederholt und schließlich den Niederschlag in der angegebenen Weise trocknet. Wenn man es versucht, den alkoholfeuchten Niederschlag durch Erwärmen auf dem Wasserbade zu trocknen, dann sintert er zusammen und wird bräunlich; im Vakuumexsikkator dagegen trocknet er zu einer weißen, schwammigen Masse, die leicht zu Pulver zerdrückt werden kann. Das Tuberkulin gibt bei der Behandlung mit Alkohol etwa 10% trockenes Pulver. Letzteres ist aber keineswegs die wirksame Substanz in reiner Beschaffenheit; denn es enthält neben dieser noch eine Menge in Alkohol unlöslicher Extraktivstoffe. Auch gelingt es nicht, durch absoluten Alkohol den wirksamen Stoff vollständig aus dem Tuberkulin niederzuschlagen. Denn wenn der abfiltrierte Alkohol verdunstet wird, dann bleibt eine gelbliche klare Flüssigkeit zurück, welche aus dem Glycerin und den im letzteren gelösten Substanzen besteht. Von dieser Flüssigkeit genügen 0,5 ccm nicht mehr, um ein Tier zu töten. Aber in einem Versuche erfolgte der Tod nach Injektion von 1 ccm, in einem anderen von 1,5 ccm.

Wenn nun auch durch Ausfällen mit Alkohol nicht die Gesamtmenge des wirksamen Stoffes aus dem Tuberkulin gewonnen werden kann, so läßt sich doch auf diese Weise ein großer Teil von unwirksamen Substanzen entfernen und darunter vor allem das Glycerin, welches auf die Lösungsverhältnisse der im Tuberkulin enthaltenen Stoffe von wesentlichem Einfluß ist.

Es kam nun weiter darauf an, Trennungen des im Alkoholniederschlag vorhandenen Gemisches von Körpern zu bewirken. Zu diesem Zwecke wurden unter Mitwirkung der Herren P r o s k a u e r und Prof. B r i e g e r so ziemlich alle hierfür in Frage kommenden Methoden versucht, von denen ich nur folgende speziell erwähnen will: Behandlung mit Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat, Kaliumkarbonat, Baryt, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Eisenazetat, Bleiazetat, Tannin, Tierkohle. Aber keine von diesen Methoden hat zum Ziele geführt. Entweder wurde der wirksame Stoff, wie beim Ammoniumsulfat, noch zu sehr durch andere Stoffe verunreinigt abgeschieden, oder er verlor seine Wirksamkeit von vornherein, oder er ließ sich nicht in wirksamer Form von dem Fällungsmittel trennen. So konnte z. B. mit Tannin alles wirksame aus dem Tuberkulin gefällt werden und der Niederschlag hatte, durch Zusatz von Natriumkarbonat in Lösung gebracht, noch seine volle Wirksamkeit, aber es ist nicht gelungen, die wirksame Substanz nun wieder vom Tannin abzuschneiden. Vielleicht hätten diese Versuche bei weiterer Fortsetzung doch noch Erfolg gehabt, wenn es nicht inzwischen auf einem anderen Wege gelungen wäre, dem Ziele näher zu kommen, wodurch jene Methoden vorläufig in den Hintergrund gedrängt wurden. Es war mir nämlich aufgefallen, daß, wenn der Alkohol mit dem Tuberkulin in einem sehr viel niedrigeren Verhältnis wie in den früheren Versuchen, und zwar im Verhältnis von 2 : 3 gemischt wird, es nicht zur Ausscheidung der braunen harzartigen Masse kommt, sondern sich ein weißer flockiger Niederschlag bildet, der sich gut absetzt und durch Spülen mit Alkohol von gleicher Konzentration leicht reinigen läßt. Es wird bei diesem Versuch ein Teil Tuberkulin (z. B. 10 ccm) in ein Becherglas getan und unter Umrühren anderthalb Volumteile (in diesem Falle 15 ccm) absoluter Alkohol hinzugefügt, das Glas verdeckt und 24 Stunden

stehen gelassen. Es hat sich dann in der dunkelbraunen Flüssigkeit ein flockiger Bodensatz gebildet. Die obere Flüssigkeit wird vorsichtig abgegossen, 60% Alkohol in gleicher Menge zugegossen, umgerührt und wieder zum Absetzen hingestellt. Dies wird so oft 3—4mal, wiederholt, bis der über dem Niederschlag stehende Alkohol fast ungefärbt ist, dann wird einige Male mit absolutem Alkohol in gleicher Weise gespült (in der Regel genügt dreimalige Spülung), der Niederschlag auf das Filter gebracht, abgesogen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Er gibt dann eine schneeweiße Masse, welche nach dem Trocknen bei 100° (wobei sie 7—9% Wasser verliert) in gepulvertem Zustande leicht grau gefärbt erscheint. Kleinere Mengen des Niederschlages kann man auch auf dem Wasserbade vom Alkohol befreien, ohne daß sein Aussehen dadurch geschädigt wird, wie es bei dem mit 100% Alkohol erhaltenen unreinen Niederschlage der Fall war.

Dieser durch Ausfällen mit 60% Alkohol erhaltene Niederschlag übertrifft alle auf andere Weise aus dem Tuberkulin hergestellten Stoffe so sehr an Wirksamkeit und verhält sich bei allen bisher mit demselben angestellten Reaktionen so konstant, daß man ihn als nahezu rein ansehen kann; vielleicht bildet er schon in Wirklichkeit das vollkommen isolierte wirksame Prinzip des Tuberkulins. Während von dem 100proz. Alkoholniederschlag mindestens 50 mg erforderlich sind, um dieselbe Wirkung zu erzielen wie mit 0,5 g Tuberkulin, genügen von dem 60proz. Alkoholniederschlag 10 mg; in mehreren Versuchen starben die Tiere schon auf 5 mg, in einem Falle sogar auf 2 mg an ausgesprochener Tuberkulinwirkung. Die Ausbeute beträgt etwa 1%<sup>1)</sup>. Berücksichtigt man die Wirkung der gewonnenen Menge im Verhältnis zu derjenigen des verarbeiteten Tuberkulins, dann ergibt sich, daß dem Tuberkulin kaum die Hälfte der wirksamen Substanz durch die Fällung mit 60% Alkohol entzogen wird, und dem entspricht auch die Prüfung des Filtrates, von welchem nach Entfernung des Alkohols und Zusatz von Wasser bis zum ursprünglichen Volumen 0,75 bis 1,0 g zur sicheren Tötung eines tuberkulösen Tieres erforderlich ist.

Der 60proz. Alkoholniederschlag, welchen man vorläufig als gereinigtes Tuberkulin bezeichnen könnte, hat folgende Eigenschaften.

Er löst sich im Wasser ziemlich leicht, am schnellsten, wenn er in einer Reibschale mit dem Wasser verrieben wird. Eine derartige Lösung behält indessen nicht sehr lange Zeit volle Wirksamkeit, denn es wurde wiederholt beobachtet, daß sie schon nach 1 bis 2 Wochen erheblich an Stärke der Wirkung abgenommen hatte. Besonders empfindlich scheint die wässrige Lösung gegen das Eindampfen zu sein; sie leidet dabei aber weniger, solange noch genügend Flüssigkeit vorhanden ist, als gegen Ende des Eindampfens wenn die Lösung sehr konzentriert wird; es scheiden sich dann gerinnselartige Flocken aus, welche auf Wasserzusatz sich nicht wieder lösen. Eine Probe des Niederschlages, welche auf dem Wasserbade wiederholt zur Trockne eingedampft und gelöst wurde, hatte schließlich ihre Wirkung vollkommen verloren. Auch durch längeres Stehen und durch schärferes Trocknen bei höherer Temperatur wird das gereinigte Tuberkulin teilweise unlöslich. Anfangs nahm ich an, daß die unlöslichen Bestandteile dem Tuberkulin beigemengte fremde Substanzen seien, welche man durch vorsichtiges trockenes Erhitzen, durch Behandeln mit heißem Dampf usw. ausscheiden könne. Auch dann noch, als sich herausstellte, daß die unlöslich gewordenen Stoffe (wenn sie nicht durch wiederholtes Erhitzen verändert waren) dieselbe Wirkung wie das Tuberkulin selbst hatten, ließ sich immer noch annehmen, daß es sich um koagulierte Eiweißkörper handelte, welche den wirksamen Stoff mitniedergerissen haben konnten. Da es aber weder

<sup>1)</sup> Die Ausbeute läßt sich leicht steigern, wenn man mehr Alkohol, z. B. 65—70% dem Tuberkulin zusetzt. Dann werden aber nicht allein größere Mengen des wirksamen Stoffes, sondern auch andere Stoffe mitgefällt und man erhält kein reines Präparat.

gelang, durch andere Eiweißstoffe, welche der wässerigen Tuberkulinlösung zugesetzt und zur Koagulation gebracht wurden, noch durch andere zu diesem Zweck in der Lösung bewerkstelligte Niederschläge das wirksame Prinzip auszufällen, so mußte diese Auffassung wieder aufgegeben werden, und ich möchte vorläufig die fragliche Substanz, da sie die gleiche Wirkung wie das Tuberkulin hat, als eine in Wasser unlösliche Modifikation des Tuberkulins ansehen.

Wenn das gereinigte Tuberkulin nicht sehr sorgfältig hergestellt und aufbewahrt wird, enthält es immer eine geringe Menge dieser unlöslichen Substanz, und man erhält keine ganz klare Flüssigkeit beim Auflösen. Der Zusatz einer geringen Menge von Natriumkarbonat bis zur deutlich alkalischen Reaktion genügt dann aber in der Regel, um alles in Lösung zu bringen.

Lösungen des reinen Tuberkulins in Glycerin 50% sind dagegen sehr haltbar. Eine von mir seit 4 Monaten aufbewahrte Lösung hat sich bis jetzt unverändert wirksam gehalten. Wenn die Lösungen einen Glyzeringehalt von einigen Prozent haben, kann man sie auch wiederholt eindampfen und wieder lösen, ohne daß sie dadurch geschädigt werden. Selbst sehr hohe Temperaturen verträgt das Tuberkulin, wenn die Lösung desselben stark glyzerinhaltig ist. So wurden mehrere Proben im Autoklaven stundenlang auf 130°, selbst bis zu 160° erhitzt, ohne daß ihre Wirkungsfähigkeit merklich dadurch herabgesetzt wurde<sup>1)</sup>. Das Glycerin spielt somit für das Tuberkulin eine sehr wichtige Rolle als konservierendes Mittel.

Fertigt man eine konzentrierte Lösung des möglichst sorgfältig gereinigten Tuberkulins an und gießt davon einige Kubikzentimeter in absoluten Alkohol, dann entsteht nicht, wie man erwarten sollte, sofort ein Niederschlag, sondern nur eine ganz schwache Opaleszenz. Der Alkohol kann dann Wochen lang stehen, ohne daß sich dieses Aussehen ändert und ein Niederschlag sich absetzt. Das gereinigte Tuberkulin ist also in Alkohol nicht vollständig unlöslich. 80 proz. Alkohol kann schon ziemlich viel davon aufnehmen, 60 proz. Alkohol beträchtliche Mengen. Wie kommt es nun aber, daß das Tuberkulin aus der ungereinigten Flüssigkeit durch Alkohol gefällt werden kann? Dieses Rätsel ließ sich leicht dadurch lösen, daß dem tuberkulinhaltigen Alkohol der Reihe nach die Bestandteile der ungereinigten Flüssigkeit zugesetzt wurden. Der Glyzerinzusatz ließ keinen Niederschlag entstehen. Die Extraktivstoffe bildeten an und für sich einen Niederschlag; aber nachdem dieser sich abgesetzt hatte, hatte der Alkohol noch sein opaleszierendes Aussehen. Erst wenn die Salze hinzugefügt wurden, ballte sich das Tuberkulin zu Flocken und wurde vollständig als Niederschlag abgeschieden. Von den Salzen erwies sich vorzugsweise das Natriumchlorid als ein geeignetes Fällungsmittel für Tuberkulin in Alkohol. Schon ein Tropfen einer konzentrierten Natriumchloridlösung genügt, um in mehreren hundert Kubikzentimetern Alkohol das Tuberkulin zum Ausfallen zu bringen. Dieses Verhalten des Tuberkulins gegen verdünnten Alkohol ist bei der Reindarstellung wohl zu berücksichtigen. Sobald nämlich durch mehrmaliges Spülen mit 60 proz. Alkohol diejenigen Mineralsalze, welche die Fällung des Tuberkulins begünstigen, entfernt sind, fängt bei weiterem Spülen mit verdünntem Alkohol letzterer an zu opaleszieren, d. h. er beginnt das Tuberkulin zu lösen, und man

<sup>1)</sup> In einem von Professor P f u h l angestellten derartigen Versuche wurden zu gleicher Zeit Proben: 1. von Rohtuberkulin, 2. von wässriger Lösung und 3. von 50% glyzerinhaltiger Lösung des gereinigten Tuberkulins 2. Stunden lang im Autoklaven einer Temperatur von 160° ausgesetzt und dann entsprechende Mengen davon tuberkulösen Tieren injiziert. Nur das Tier, welches die wässrige Lösung erhalten hatte, blieb am Leben; die beiden anderen mit Rohtuberkulin und glyzerinhaltiger Lösung des gereinigten Tuberkulins injizierten starben und zeigten ausgesprochene Tuberkulinwirkung.

kann auf solche Weise bedeutende Mengen Niederschläge verlieren. Tritt diese Erscheinung ein, dann muß der Alkohol durch Zusatz von Natriumchlorid geklärt und zur weiteren Spülung absoluter Alkohol verwendet werden.

Von den chemischen Reaktionen, welche zur Charakterisierung des gereinigten Tuberkulins dienen können, seien folgende erwähnt.

Zunächst gibt es alle Eiweißreaktionen; so die Biuratreaktion, die A d a m k i e - w i c z s c h e Reaktion (Eisessig und konzentrierte Schwefelsäure); mit dem M i l l o n - s c h e n Reagens entsteht ein weißer Niederschlag, der beim Erwärmen rötlich wird usw.

Phosphorwolframsäure, Eisenazetat, Ammoniumsulfat, Gerbsäure fällen das Tuberkulin aus seiner Lösung vollständig aus.

Bleiazetat bewirkt eine starke Trübung, aber keine vollständige Fällung.

Auch die Essigsäure ruft in der wässerigen Lösung des gereinigten Tuberkulins anfangs starke Trübung und selbst geringen Niederschlag hervor, welcher aber auf weiteren Zusatz wieder verschwindet. Die durch Essigsäure abgeschiedene Substanz zeigte bei der Prüfung weder eine geringere, noch eine höhere Wirksamkeit wie das reine Tuberkulin und scheint der in Wasser unlöslichen Modifikation ähnlich, vielleicht damit identisch zu sein.

Wässrige Pikrinsäurelösung bewirkt einen flockigen Niederschlag, der sich beim Erwärmen auflöst und beim Erkalten der Flüssigkeit wieder erscheint.

Verdünnte Salzsäure und Schwefelsäure lassen keinen Niederschlag entstehen. Ebenso verhalten sich diese Säuren in stärkerer Konzentration.

Salpetersäure bewirkt dagegen einen Niederschlag, der beim Stehen zunimmt, beim Kochen eine gelbe Lösung gibt und auf Zusatz von Natronlauge braunrot wird (Xanthoproteinsäurereaktion).

Aschenanalysen und Elementaranalysen des gereinigten Tuberkulins sind von den Herren P r o s k a u e r und B r i e g e r ausgeführt und haben ergeben:

1. Aschenanalysen:

I. Asche von 0,4816 g Substanz (bei 100° getrocknet) 0,0802 = 16,65% (B r i e g e r).

II. Asche von 0,1410 g Substanz (bei 100° getrocknet) 0,0265 = 18,46% (P r o s - k a u e r).

III. Asche von 0,1740 g Substanz (bei 100° im Vakuum getrocknet) 0,0350 = 20,46% (P r o s k a u e r).

Die Präparate I und II waren von mir aus je 500 ccm Rohtuberkulin hergestellt, Präparat III von Herrn P r o s k a u e r aus 300 ccm (sechsmal mit 60% Alkohol gewaschen, viermal mit 70%, je dreimal mit 80% und 90% und fünfmal mit absolutem Alkohol, letzterer mit Äther verdrängt und dann getrocknet). Die Asche bestand fast ganz aus Kalium- und Magnesiumphosphat und enthielt keine Chloride. Die Asche der Probe II enthielt 59,84% Phosphorsäure.

2. Elementaranalyse (für aschefreie Substanz berechnet):

	I. Brieger	II. Proskauer	III. Proskauer
Kohlenstoff . . . . .	47,02%	48,13%	47,67%
Wasserstoff . . . . .	7,55 „	7,06 „	7,18 „
Stickstoff . . . . .	14,45 „	14,46 „	14,73 „
Schwefel . . . . .	—	1,17 „	1,14 „

Für die Elementaranalyse wurden dieselben Präparate wie für die Aschenbestimmung benutzt.

Zieht man alle bisher beschriebenen Eigenschaften des gereinigten Tuberkulins in Betracht, dann muß man zu der Annahme gelangen, daß dasselbe zur Gruppe der

Eiweißkörper gehört. Der hohe Aschengehalt und der ungleichmäßige Verlauf einiger Reaktionen (Bleiazetat, Essigsäure) lassen indessen vermuten, daß die Substanz noch nicht in vollkommen reiner Darstellung vorliegt, daß aber etwaige Beimengungen doch nur in sehr geringer Menge vorhanden sein können und vielleicht in Spuren von dem Tuberkulin ähnlichen Eiweißkörpern und in Mineralstoffen bestehen, welche für die therapeutische Verwertung des Präparats wohl keine Bedeutung haben. Obwohl das Tuberkulin den Albumosen am nächsten zu stehen scheint, so unterscheidet es sich doch von diesen und insbesondere von den sogenannten Toxalbuminen sehr wesentlich durch seine Beständigkeit gegenüber hohen Temperaturen. Auch von den Peptonen weicht es in mehrfacher Beziehung, namentlich durch die Fällbarkeit durch Eisenazetat ab.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß man bei weiterem Suchen unter den Produkten der pathogenen Bakterien noch anderen ähnlichen Körpern begegnen wird, die sich als eine besondere Gruppe der Eiweißkörper werden abgrenzen lassen.

Bei der chemischen Untersuchung des Tuberkulins hatte sich die Prüfung der gereinigten Substanz in bezug auf ihre physiologische Wirkung auf den Versuch an tuberkulösen Meerschweinchen beschränkt. Nachdem es nun aber gelungen war, den wirksamen Stoff in möglichst isolierter Form herzustellen, war es natürlich von größtem Interesse, zu erfahren, wie derselbe auf die Menschen wirkt, namentlich ob die von uns erwünschten therapeutischen Effekte des Roh-tuberkulins bei dem reinen Tuberkulin ohne alle störenden Nebenwirkungen eintreten.

Zu diesem Zwecke wurden vorerst einige Versuche an Gesunden angestellt, und zwar an Ärzten, welche sich in dankenswerter Weise dazu bereit erklärt hatten.

Dr. Kitasato erhielt am 24. Juni 1891 mittags um 12 Uhr 2 mg injiziert. Zur Zeit der Injektion betrug die Temperatur 36,5°. Sie stieg bis abends 8 Uhr auf 38,3°, blieb bis 11 Uhr 38,2° und fiel dann ziemlich schnell. 4 Uhr nachmittags war Hustenreiz eingetreten, welcher 3 Stunden anhielt. Dann folgte etwas Kopfschmerz, Mattigkeit und Schweiß. Sonst war das Allgemeinbefinden ungestört. (Der Puls stieg von 72 bis 92.)

Dr. A. Wassermann erhielt am 25. Juni 3 mg injiziert. Die Temperatur stieg von 37,2° bis 38,7° im Laufe von 11 Stunden und fiel dann wieder zur Norm. Beim Beginn der Reaktion wurde Empfindlichkeit und ziehendes Gefühl in den Brust- und Bauchmuskeln beobachtet; auch Hitze und Eingenommensein des Kopfes, kein Schüttelfrost. (Puls von 80 bis 114.)

Dr. H. Maass 13. Juli 4 mg. Die Temperatur geht im Laufe von 12 Stunden von 37,0° bis 39,0°. Die subjektiven Beschwerden bestanden in leichtem Frost und später folgendem Hitzegefühl, Mattigkeit und Kopfschmerzen. (Puls von 72 bis 100.)

Direktor Dr. P. Guttmann 28. Juli 5 mg. Die Temperatur geht von 36,5° innerhalb 8 Stunden auf 39,2°. 4 Stunden nach der Injektion zunehmendes Ziehen in den Gliedern, nach weiteren 2 Stunden Frösteln, welches Herrn Guttmann zwang, ins Bett zu gehen. Dann folgte Hitze und Schweiß. Kein Kopfschmerz; aber Erbrechen von Magenschleim (es war aus Vorsicht nur sehr wenig genossen). Dabei vollkommene Schlaflosigkeit, auch in der Nacht. (Puls bis 135.)

In allen diesen Fällen war das Wohlbefinden nach 24 Stunden vollständig oder doch nahezu wieder eingetreten.

Die Temperatursteigerung entspricht genau der zur Anwendung gekommenen Dosis:

2 mg	ergaben	38,2°	Maximaltemperatur
3	„	38,7°	„
4	„	39,0°	„
5	„	39,2°	„

Aber auch die subjektiven Empfindungen hielten damit gleichen Schritt, und es zeigten sich alle die bekannten nach Einspritzung des Roh-tuberkulins auftretenden Störungen wieder, so daß ein Unterschied in dieser Beziehung zwischen dem gereinigten und ungereinigten Präparate nicht wahrgenommen werden konnte. Ganz besonders

fiel dies noch in einem Falle auf, der von den vorher beschriebenen sich etwas abweichend verhielt und deswegen auch abgesondert Erwähnung finden soll:

Herr O. Wassermann, von kräftigem Körperbau und ohne irgendwelche nachweisbaren Anzeichen von Tuberkulose, erhielt am 27. Juli 4 mg des gereinigten Präparats injiziert. Die Temperatur stieg von 36,9° innerhalb 10 Stunden auf 39,5°, fiel dann auf 38,4°, ging aber bis 27 Stunden nach der Injektion wieder auf 40,2°. Während des ersten Anstiegs der Temperatur hielten sich die subjektiven Störungen innerhalb mäßiger Grenzen, so daß Herr Wassermann noch eine Spazierfahrt unternehmen konnte. Kurz vor dem zweiten Ansteigen der Temperatur trat Frost ein, der Puls erreichte 140, wurde klein und unregelmäßig, so daß Exzitantien (Alkoholika) erforderlich erschienen. Puls und Temperatur kamen erst nach ungefähr 48 Stunden wieder auf ihren gewöhnlichen Stand.

Ob in diesem Falle ein Verdacht auf Tuberkulose, für welchen sich nachträglich einige Anhaltspunkte ergaben, oder das unruhige Verhalten des Herrn W. die Erklärung für den unregelmäßigen und stürmischen Verlauf der Reaktion geben kann, mag unentschieden bleiben. Diese Beobachtung lehrt jedoch unzweifelhaft, daß auch das gereinigte Tuberkulin bei zu starker Reaktion nicht unbedenkliche Symptome hervorzurufen vermag.

Mit entsprechend niedrigen Dosen und in vorsichtigster Weise sind dann im weiteren auch möglichst ausgedehnte Versuche mit dem gereinigten Tuberkulin an Tuberkulösen angestellt, und zwar geschah dies an einer größeren Zahl von Kranken im Krankenhaus Moabit, welche einige Monate lang teils ausschließlich mit dem reinen Tuberkulin, teils in Abwechslung mit dem Rohtuberkulin behandelt wurden. Über diese Versuche kann ich mich kurz fassen, da sie ebenfalls zu dem Ergebnis geführt haben, daß das reine Tuberkulin von dem Rohtuberkulin sich in seiner Wirkung nicht merklich unterscheidet. Ersteres hat diagnostisch und therapeutisch denselben Effekt wie das letztere, wenn es in einer solchen Dosis angewendet wird, daß die Reaktionserscheinungen, namentlich die Temperatur, welche den sichersten Maßstab abgibt, die gleiche Höhe erreichen. Es hat sich aber dabei herausgestellt, daß das gereinigte Tuberkulin, welches für Meer-schweinchen etwa 50mal so stark als das Rohtuberkulin gefunden war, für den Menschen bei der Berechnung der Dosis höchstens als 40mal so stark anzunehmen ist.

Auch in bezug auf die Dosierung bietet das gereinigte Tuberkulin keinen Vorteil. Denn die Wirkungsfähigkeit desselben läßt sich doch nur, ebenso wie beim Rohtuberkulin, nicht auf Grund von chemischen Reaktionen, sondern durch die Prüfung am Tierkörper feststellen, und am Krankenbette ist in jedem einzelnen Falle bei beiden Mitteln die Dosis den Verhältnissen entsprechend zu bemessen, was sich auch dann nicht ändern würde, wenn die Wirkung des gereinigten Tuberkulins eine absolut gleichmäßige sein würde.

Ob das reine Tuberkulin dem Rohtuberkulin etwa an Haltbarkeit überlegen ist, können erst weitere Erfahrungen lehren. Bis jetzt hat sich das Rohtuberkulin als eine an Glycerin sehr reiche Tuberkulinlösung recht haltbar erwiesen. Wenigstens habe ich an den ältesten, mir zur Verfügung stehenden Proben des Tuberkulins noch keine Abnahme in der Wirkung wahrnehmen können.

So interessant und wichtig die Versuche zur Reindarstellung des wirksamen Prinzips aus dem Tuberkulin in theoretischer Hinsicht auch sind, so haben sie doch für die Praxis bis jetzt noch keinen wesentlichen Fortschritt gebracht, was mich aber nicht abhalten wird, diese Frage noch weiter zu verfolgen.

---

In meiner letzten Veröffentlichung über das Tuberkulin hatte ich über die Herkunft desselben und seine Bereitungsweise soviel angegeben, wie es für den Sachverständigen ausreichen mußte, um den von mir angegebenen Weg verfolgen zu können.

Die Angaben, daß das Tuberkulin in den Tuberkelbazillenkulturen enthalten ist, und daß man sich von dem Vorhandensein desselben jederzeit durch den Versuch am tuberkulösen Meerschweinchen überzeugen und bei Versuchen zur Gewinnung des wirksamen Stoffes aus den Kulturen die Reaktion am Tiere stets als eine zuverlässige Kontrolle benutzen kann, hätte genügen müssen, um einen geschickten Bakteriologen zur Herstellung des Tuberkulins oder eines gleichwertigen Präparates zu befähigen. Wenn trotzdem nur ganz vereinzelte Bakteriologen sich an diese Aufgabe herangewagt und, soweit ich die weitschichtige Literatur zu übersehen vermag, dieselbe auch nur teilweise gelöst haben, so hat das eigentlich etwas Beschämendes für die heutigen Bakteriologen, welche, anstatt selbständig experimentell vorzugehen, in ungestümer Weise nach einem Rezept zur Herstellung des Tuberkulins verlangen. Es ist mir überhaupt fraglich, ob die Art und Weise der Herstellung, wie ich sie befolge, schon die beste ist. Ich habe im Laufe der Zeit fortwährend daran verbessert und halte sie auch noch weiter verbesserungsfähig, hoffe auch, daß sich noch ganz andere geeignetere Methoden werden auffinden lassen. Wenn ich daher jetzt, wo die Beurteilung der Tuberkulinfrage eine ruhigere und mehr objektive geworden ist, den richtigen Zeitpunkt gekommen erachte, um meine Erfahrungen über die Herstellungsweise des Präparates zu veröffentlichen, so würde ich es sehr bedauern, wenn man sich sklavisch an meine Angaben halten und nicht versuchen würde, etwas Besseres zu schaffen.

Vorweg habe ich aber noch folgendes zu bemerken. Bei der Tuberkulingewinnung liegt der Schwerpunkt darin, daß man es versteht, die Tuberkelbazillen in Massen zu kultivieren. Ohne solche Massenkulturen ist an die Herstellung des Tuberkulins in nennenswerten Mengen überhaupt nicht zu denken. Tuberkelbazillen in Massen zu kultivieren, ist aber nur einem geübten Bakteriologen möglich, der Ungeübte wird wohl auch Massenkulturen zustande bringen, aber keine Reinkulturen; mit unreinen Kulturen wird er nichts als Unheil anrichten, und er sollte deswegen seine Hände lieber davon lassen.

Ursprünglich habe ich die Tuberkelbazillen auf Glycerinpeptonagar in Reagensgläsern gezüchtet, die Kulturen, wenn sie den Höhepunkt der Entwicklung erreicht hatten, abgespült, auf einem feinen Drahtnetz gesammelt, mit einer 4 proz. Glycerinlösung übergossen, mit dieser Lösung auf den zehnten Teil eingedampft, abfiltriert und das Filtrat verwendet. Die Züchtung auf Agar in Reagensgläsern ist aber sehr mühsam und gibt verhältnismäßig wenig Ausbeute. Als es darauf ankam, größere Mengen zu schaffen, mußte daher versucht werden, größere Gefäße für die Kulturen zu benutzen; dabei ergaben sich aber Schwierigkeiten in der Verwendung des Nähragar; und ich griff auf frühere Versuche zurück, die ich über die Züchtung der Tuberkelbazillen in flüssigen Nährmedien angestellt hatte. Anfangs fielen die Kulturen wenig befriedigend aus; sie wuchsen in der Flüssigkeit sehr langsam und kümmerlich. Zufällig machte ich dann aber die Beobachtung, daß einzelne platte Stückchen der Bazillenkultur, welche an der oberen Fläche trocken waren und unbenetzt blieben, auf der Oberfläche der Flüssigkeit sich schwimmend erhielten, und daß diese Stückchen sich in üppigster Weise entwickelten. Sie bildeten im Laufe von einigen Wochen an der Oberfläche eine dieselbe vollkommen bedeckende, ziemlich dicke, oberwärts trockene und oft faltige Haut von weißlicher Farbe. Nach 6—8 Wochen ist das Wachstum beendet; die Haut fängt dann an, von der Flüssigkeit benetzt zu werden, und sinkt schließlich, in lappenförmige Stücke zerfallend, unter. Der Ertrag einer solchen Kultur ist erheblich größer als der auf festem Nährboden erzielte.

Als Kulturflüssigkeit kann man ein Infus von Kalbfleisch benutzen, das in der gewöhnlichen Weise hergestellt wird. Dasselbe muß schwach alkalisch sein und einen

Zusatz von einem Prozent Pepton und 4—5% Glycerin erhalten. An Stelle des Kalbfleischinfuses kann auch eine einprozentige Fleischextraktlösung verwendet werden.

Die Kulturgefäße, am besten Kölbchen mit flachem Boden, werden nur zur Hälfte, und zwar mit 30—50 ccm Flüssigkeit gefüllt, gut sterilisiert und dann so geimpft, daß ein nicht zu kleines Stück der Aussaatkultur auf der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmt. Die Kulturen werden am besten bei 38° gehalten.

In bezug auf die Herkunft der zur Kultur benutzten Tuberkelbazillen habe ich keinen Unterschied gefunden. Für die Wirksamkeit des Tuberkulins ist es ganz gleichgültig, ob dasselbe mit frisch gezüchteten Kulturen oder mit mehrere Jahre alten hergestellt wird, ebenso ob die Kulturen direkt vom tuberkulösen Menschen gewonnen, oder ob sie wiederholt durch den Tierkörper gegangen sind.

Bei dieser Art und Weise der Züchtung geht ein Teil des wirksamen Stoffes in die Kulturflüssigkeit über, wovon man sich durch Probeinjektion an tuberkulösen Meerschweinchen leicht überzeugen kann. Ich habe deswegen, nachdem ich dies bemerkt hatte, die Kulturen nicht mehr mit wässriger Glycerinlösung, sondern gleich mit der Kulturflüssigkeit extrahiert, um so auch den in dieser enthaltenen Stoff zu verwerten. Daß auf diese Weise die Kulturen genügend extrahiert werden, geht daraus hervor, daß sie nach der Extraktion nur noch eine geringe Wirkung auf tuberkulöse Meerschweinchen auszuüben vermögen, und daß die Kulturflüssigkeit, wenn sie ohne die Kulturen eingedampft wird, ein erheblich schwächeres Tuberkulin liefert.

Die zur Extraktion verwendeten Kulturen müssen vollkommen reif, also 6 bis 8 Wochen alt sein. Sie müssen selbstverständlich absolut rein sein, wovon man sich durch die mikroskopische Untersuchung jedes einzelnen Gefäßes überzeugen muß. Erst nach langer Übung wird man imstande sein, auch ohne mikroskopische Untersuchung die Abwesenheit von Verunreinigungen durch fremde Mikroorganismen zu konstatieren, welche letzteren bekanntlich in flüssigen Nährmedien weit schwieriger als auf festen zu erkennen sind.

Die vollkommen rein befundenen Kulturen werden in einem geeigneten Gefäß auf dem Wasserbade auf den zehnten Teil ihres ursprünglichen Volumens eingedampft. Da sie hierbei stundenlang einer Temperatur von nahezu 100° ausgesetzt bleiben, so kann man mit voller Sicherheit darauf rechnen, daß in der eingedickten Flüssigkeit die Tuberkelbazillen ausnahmslos abgetötet sind. Um die letzteren aber möglichst daraus zu entfernen, wird die Flüssigkeit durch ein Ton- oder Kieselguhrfilter filtriert.

Das so gewonnene Tuberkulin enthält etwa 40—50% Glycerin und ist dadurch gegen Zersetzung durch Bakterien geschützt. Man hat nur darauf zu achten, daß sich nicht Schimmelpilze darauf ansiedeln. So verwahrt, hält es sich allem Anscheine nach sehr lange, vielleicht jahrelang im wirksamen Zustande.

Bevor es angewendet wird, muß es selbstverständlich noch auf seine Stärke geprüft werden, was in der Weise geschieht, daß eine größere Reihe von tuberkulösen Meerschweinchen abgestufte Dosen injiziert erhalten. Wenn man für jede Dosis mindestens zwei Tiere nimmt und die Dosen genügend abstuft, dann läßt sich die Stärke des Tuberkulins mit hinreichender Genauigkeit ermitteln. Bei der Auswahl der Tiere für diesen Versuch ist jedoch wohl darauf zu achten, daß die Tuberkulose sich bei ihnen möglichst in demselben Stadium der Entwicklung befindet.