Aus der Bakteriologischen Abteilung der Farbwerke in
Höchst am Main.

Die Herstellung des „Neuen Tuberkulins“ (Tuberkulin T. R.).

(Eine Berichtigung.)

Von Professor W. G. Ruppel.

In der bekannten Abhandlung „Neue Tuberkulinpräparate“, welche im Jahre 1897 in No. 14 der Deutschen medizinischen Wochenschrift erschien, besprach Robert Koch die Gründe, welche ihn veranlaßten, die Versuche zur Auffindung eines spezifischen Tuberkulose-Heilmittels mit der Entdeckung des Tuberkulins nicht als abgeschlossen zu betrachten. Im Tuberkulin hatte Koch eine Substanz kennen gelernt, durch welche die Möglichkeit gegeben ist, Tuberkulose, selbst in den frühesten Stadien der Erkrankung, mit Sicherheit diagnostisch feststellen und tuberkulöse Krankheitsprozesse augenfällig beeinflussen zu können. Auch der kurative Wert des Tuberkulins war damals bereits praktisch festgestellt worden. Eine allgemeine Verwendung des Tuberkulins als Heilmittel erschien nur durch das häufige Auftreten stürmischer Reaktionen erschwert. Kochs Bestreben war deshalb darauf gerichtet, Präparate herzustellen, welche die immunisierenden resp. heilenden Eigenschaften des Tuberkulins besaßen, welche aber bei der Einverleibung in tuberkulöse Organismen keine heftigen Allgemein-Reaktionen auslösten. Substanzen von diesen Eigenschaften glaubte Koch in der Leibessubstanz der Tuberkelbazillen suchen zu müssen.

Zahlreiche Versuche, Tiere mit Hilfe abgetöteter Tuberkelbazillen zu immunisieren, hatten zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt. Dieser Mißerfolg erklärte sich durch die Tatsache, daß subkutan einverleibte, abgetötete Tuberkelbazillen vom Unterhautzellgewebe aus nicht in geeigneter Weise resorbiert wurden, sondern zur Bildung von Abszessen Veranlassung gaben. Bei intravenöser Einverleibung aber gelangten die abgetöteten Bazillen in den Lungen zur Ablagerung und erzeugten hier pathologische Veränderungen, welche den Veränderungen, bewirkt durch lebende und vermehrungsfähige Tuberkelbazillen, also echten Lungentuberkeln durchaus ähnlich waren.

Es war deshalb notwendig, die Tuberkelbazillen in eine resorbierbare Form überzuführen. Chemische Agentien mußten hierbei vermieden werden, da durch deren Einwirkung eine Schädigung der immunisierenden Substanzen der Tuberkelbazillen zu befürchten war. Nach vielfachen Versuchen gelang es Koch, die Bazillen auf rein mechanischem Wege aufzuschließen und in resorbierbare Form überzuführen, indem er die möglichst scharf getrockneten Bazillen durch Verreiben im Achatmörser bis zu einem solchen Grade pulverisierte, daß in den zerriebenen Massen intakte, in der charakteristischen Weise färbbare Tuberkelbazillen mikroskopisch nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Durch Extraktion mit destilliertem Wasser konnten den im Mörser zerriebenen Tuberkelbazillen alle löslichen Stoffe entzogen werden. Man erhält hierbei eine Lösung, welche, von dem unlöslichen Rückstande durch Zentrifugieren getrennt, eine schwach opaleszierende, aber vollkommen klare Flüssigkeit darstellt. Diese Lösung wurde von Koch als T. O. bezeichnet. Sie enthält die toxischen Bestandteile der Tuberkelbazillen. Ihre Wirkung auf tuberkulöse Menschen und Tiere ist analog der Wirkung des Alttuberkulins. Versetzt man das T. O. mit gleichen Teilen Glycerin, so tritt keine Fällung auf. Im T. O. sind demnach ebenso wie im Alttuberkulin die in Glycerin löslichen Stoffe der Tuberkelbazillen enthalten.

Die Gesamtmenge des vom T. O. mit Hilfe der Zentrifuge getrennten, unlöslichen Rückstandes der Tuberkelbazillen kann durch geeignete Behandlung, nämlich durch successives, scharfes Trocknen, durch Zerreiben, Aufnehmen in Wasser und Zentrifugieren, bei mehrmaliger Wiederholung dieser Prozeduren, in eine Reihe von Lösungen übergeführt werden. Diese Lösungen sind unter sich als gleichwertig zu betrachten. Im Gegensatz zum T. O. enthalten sie Stoffe, welche durch 50 %iges Glycerin fällbar sind und welche auf tuberkulöse

Individuen nur geringe toxische Wirkung besitzen. Diese Lösungen, welche von Koch als Tuberkelbazillenrückstand (T. R.) bezeichnet werden, enthalten die Gesamtmenge der in den Tuberkelbazillen vorhandenen immunisierenden Substanzen in einer für den Organismus durchaus resorbierbaren Form.

In seiner oben erwähnten Veröffentlichung macht Koch auf die Schwierigkeiten und Gefahren aufmerksam, welche mit der Verarbeitung der Tuberkelbazillen zur Herstellung des T. O. und des T. R. verbunden sind, und erwähnt, daß hierzu maschinelle Einrichtungen erforderlich seien, über welche nur ein Großbetrieb verfügen kann. Er habe deshalb die Herstellung dieser Präparate den Farbwerken vorm. Meister, Lucius & Brüning in Höchst a. M. übertragen.

Bereits seit dem Jahre 1897 werden diese Präparate in der bakteriologischen Abteilung der genannten Werke hergestellt, und es werden hierbei die von Koch gegebenen Vorschriften auf das genaueste befolgt.

Im einzelnen gestaltet sich das Herstellungsverfahren folgendermaßen:

1 g scharf getrockneter Tuberkelbazillen wird in geeigneten Apparaten so lange verrieben, bis in einer entnommenen Probe intakte Tuberkelbazillen nicht mehr nachweisbar sind. Sodann wird die zerriebene Masse mit 100 ccm sterilen destillierten Wassers aufgenommen. Die Masse wird zentrifugiert. Hierbei wird eine Flüssigkeit erhalten, welche als T. O. bezeichnet wird. Auf der anderen Seite resultiert beim Zentrifugieren ein unlöslicher Rückstand, T. R. I. genannt, der von neuem scharf getrocknet wird. Die getrocknete Masse wird wiederum pulverisiert und von neuem mit Wasser aufgenommen. Nach abermaligem Zentrifugieren erhält man eine Lösung und einen festen Rückstand. Wiederum wird der feste Rückstand getrocknet, verrieben und in Wasser aufgenommen. Diese Aufschwemmung wird von neuem zentrifugiert. Es zeigt sich hierbei, daß nach zwei- bis dreimaliger Wiederholung der Prozedur die Gesamtmenge des ursprünglich durch Abscheidung des T. O. erhaltenen, unlöslichen Rückstandes T. R. I. in eine Reihe von Lösungen übergeführt werden kann, ohne daß zum Schluß eine andere unlösliche Substanz zurückbleibt als nur zufällige mechanische Verunreinigungen. Alle diese Lösungen werden vereinigt.

Man muß bei der successiven Ueberführung des T. R. I. in eine Reihe von Lösungen darauf achten, daß das Gesamtvolumen der vereinigten Flüssigkeiten weniger beträgt als 100 ccm. Den Gehalt an fester Substanz ermittelt man durch Trockenbestimmung in einer geringen Menge (5 ccm), durch Verdunsten im Vacuum und durch Wägung, fügt zu der restierenden Flüssigkeit eine geringe Menge von Glycerin und Formaldehyd und versetzt schließlich mit so viel Wasser, daß der Trockengehalt in 1 ccm des nunmehr fertiggestellten T. R. genau 0,002 g beträgt.

Wir bedienen uns zur Herstellung des Tuberkulins T. R. stets derselben Kultur, welche auf einem besonderen Nährboden von konstanter Zusammensetzung gezüchtet wird. Bei Benutzung dieses Ausgangsmaterials verläuft die Herstellung des Tuberkulins T. R. durchaus gleichmäßig, so daß wir aus 1 g getrockneter Tuberkelbazillen stets annähernd 100 ccm T. R. gewinnen. Diese 100 ccm T. R. enthalten also nach Kochs Auffassung die immunisierende Substanz von 1 g getrockneten Tuberkelbazillen, 1 ccm T. R. entspricht demnach 10 mg getrockneten Bazillen, während der Trockengehalt von 100 ccm T. R. in Wirklichkeit nur 0,2 g und in 1 ccm demnach 0,002 g, d. h. 2 mg beträgt.

In seiner oben zitierten Abhandlung gibt Koch eine detaillierte Vorschrift für die Verwendung des Präparates T. R. am Krankenbette.

Hier heißt es wörtlich: „Die Flüssigkeit enthält im ccm 10 mg fester Substanz und ist für den Gebrauch durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung (nicht mit Phenollösung) auf die erforderliche Dosis zu bringen. Man beginnt mit $\frac{1}{500}$ mg.“

Aus der oben ausführlich geschilderten Herstellungsweise des Präparates geht hervor, daß die von R. Koch gemachte Angabe, „die Flüssigkeit enthält im ccm 10 mg fester Substanz“ nur so zu verstehen ist: 1 ccm enthält die wirksame, d. h. immunisierende Substanz von 10 mg getrockneten Tuberkelbazillen.“ Will man demnach eine Tuberkulinbehandlung mit einer Anfangsdosis von T. R. beginnen, welche, wie die Kochsche Vorschrift fordert, $\frac{1}{500}$ mg Tuberkelbazillen ent-

spricht, so ist es erforderlich, das T. R. so zu verdünnen, daß man imstande ist, eine Menge von $\frac{1}{5000}$ ccm = 0,0002 ccm der Originalflüssigkeit einzuspritzen.

Als Verdünnungsmittel wählt man, wie die praktische Erfahrung gelehrt hat, am besten eine 20 %ige Glycerinlösung. Eine Ausfällung der festen Substanz des T. R. ist hierdurch nicht zu befürchten, da diese, wie oben erwähnt, erst bei einem Zusatz von 50 % Glycerin erfolgt. Diese wird hergestellt, indem man 20 ccm reines Glycerin mit 80 ccm destillierten Wassers versetzt und das Gemisch 20 Minuten lang kocht. Zum Gebrauch muß die Flüssigkeit vollkommen erkaltet sein. Man entnimmt nun einem Originalfläschchen mit Hilfe einer in $\frac{1}{10}$ ccm geteilten Pipette 0,3 ccm Tuberkulin T. R. und fügt hinzu 2,7 ccm Glycerinwasser. Hierdurch erhält man eine 10 %ige Verdünnung. Von dieser bringt man 0,1 ccm zu 9,0 ccm Glycerinwasser und hat nunmehr eine 1000fache Verdünnung, von welcher 0,2 ccm oder 2 Teilstriche der Kochschen oder Pravazschen Spritze $\frac{1}{5000}$ ccm = 0,0002 ccm, also die erforderliche Anfangsdosis enthalten.

Wir sahen uns genötigt, auf diese Verhältnisse hier in eingehender Weise zurückzukommen, da wir die Erfahrung gemacht haben, daß über das T. R., seine Herstellung und Dosierung, namentlich aber darüber, welche Mengen fester Substanz in 1 ccm dieses Präparates enthalten sind, mehrfache Irrtümer bestehen. So schreibt Sir A. R. Wright in The Lancet No. 4392 vom 2. November 1907, „Studies in connexion with therapeutic immunisation“ auf Seite 1218 etwa:

„Der Tatsache Rechnung tragend, daß das Quantum von trockenem Tuberkelpulver in Kochs T. R. (Tuberkulin) einem unerklärlichen Irrtum der Hersteller zufolge von diesen zu 10 mg in 1 ccm angegeben war, während es in Wirklichkeit, wie sie mir jetzt berichten, nur 2 mg in 1 ccm beträgt, wäre die hier in Wirklichkeit verimpfte Dosis nur $\frac{1}{10000}$ mg. Eine ähnliche Korrektur würde, das sei hier festgestellt, bei allen Dosierungen von Tuberkulin vorzunehmen sein, welche in diesem Artikel und in allen meinen früheren Publikationen berichtet wurden.“

Die praktische Anwendung des Tuberkulins T. R. am Krankenbette hat, wie von den verschiedenen Berichterstattem übereinstimmend angegeben wird, ausgezeichnete Erfolge gezeigt. Für die Behandlung der Patienten war es sicherlich vollkommen nebensächlich, den wirklichen Gehalt des Präparates an Trockensubstanz zu kennen, wenn nur die Dosierung und vor allen Dingen die Steigerung der Dosis in richtiger Weise vorgenommen wurde. Es lag sicherlich von seiten der Hersteller des Präparates ein Irrtum nicht vor. Das Präparat ist von Anbeginn an bis zum heutigen Tage in stets gleichbleibender Konzentration und somit von gleichbleibender Wirkung abgegeben worden. Wir glauben, mit Vorstehendem alle bestehenden Zweifel und Irrtümer aufgeklärt zu haben, und hoffen, daß die Herstellung von Verdünnungen des Tuberkulin T. R. in Zukunft keine Schwierigkeiten mehr darbieten wird.