DEUTSCHE MEDICINISCHE WOCHENSCHRIFT.

Mit Berücksichtigung des deutschen Medicinalwesens nach amtlichen Mittheilungen, der öffentlichen Gesundheitspflege und der Interessen des ärztlichen Standes.

Begründet von Dr. Paul Börner.

Siebzehnter Jahrgang.

Redacteur Geh. Sanitäts-Rath Dr. S. Guttman in Berlin W.

Verlag von Georg Thieme, Leipzig-Berlin.

I. Weitere Mittheilung über das Tuberkulin.

Von Prof. R. Koch in Berlin.

Nach dem Bekanntwerden des Tuberkulins sind mehrfach Versuche gemacht, das in demselben enthaltene wirksame Princip zu isoliren, 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 Mittheilungen 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 Ptoaminen gehört, sondern ein den Eiweisskörpern nahestehender Stoff ist, von dem es fraglich sein musste, ob er die gewöhnlichen zur Isolirung 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 Producte auf ihre Wirkungsweise am Thierkörper 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 theilweise Trennung erzielt war. Ohne eine solche Schritt für Schritt der Untersuchung folgende Controlle verliert man sehr bald den Faden und geräth auf Irrwege.

Da in diesem Falle auf den Thierversuch und die richtige Beurtheilung desselben fast alles ankommt, so wird es nothwendig 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. Tuberculöse Meerschweinchen reagieren dagegen auf verhältnissmässig kleine Dosen des Tuberkulins in einer ganz charakteristischen Weise. Allerdings genügt es für den vorliegenden Zweck nicht, dem Thiere nur so viel Tuberkulin zu injiciren, dass es in ähnlicher Weise reagirt, wie wir es beim tuberculösen Menschen zu sehen gewöhnt sind; denn die Temperatursteigerung und auch die örtlichen Symptome sind beim Meerschweinchen nicht ausgesprochen genug, um ein sicheres Urtheil über die Wirkung einer einmaligen Tuberkulininjection zuzulassen. Es bleibt nichts übrig, als dem Thiere eine so grosse Dosis beizubringen, dass es dadurch getödtet wird. Bei Meerschweinchen, welche schon hochgradig tuberculös sind, also 8—10 Wochen nach der Impfung, genügt hierzu oft schon 0,01 g Tuberkulin. Für Thiere mit weniger vorgeschrittener Tuberculose, 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 Thiere, welche vor mindestens 4 Wochen geimpft sind, und injicirt ihnen 0,5 g Tuberkulin oder eine dieser Dosen entsprechende Menge des aus dem Tuberkulin gewonnenen und auf seine Wirksamkeit zu prüfenden Stoffes, dann kann man, je nachdem das Thier 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 einziges mal im Stich gelassen hat.

Es sind nun ferner die Erscheinungen, unter welchen das tuberculöse Thier durch das Tuberkulin getödtet wird, so charakteristisch, dass eine Verwechslung mit einer zufällig eingetretenen anderweitigen Todesart nicht zu befürchten ist. Das Thier stirbt je nach dem Grade der bei ihm vorhandenen Tuberculose 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 Oedem oder andere Infectionskrankheiten nachweisen.

An der Leiche eines durch Tuberkulin getödteten tuberculösen Meerschweinchens finden sich folgende Veränderungen. Die Impfstelle des am Bauche subcutan geimpften Thieres zeigt sich beim Zurückschlagen der Bauchdecken durch Gefässinjection stark geröthet; oft hat sie eine dunkle, fast violette Färbung; die Injectionsröthe erstreckt sich auch mehr oder weniger weit auf die Umgebung. Die der Impfstelle benachbarten Lymphdrüsen sind ebenfalls stark geröthet. Milz und Leber lassen ausser den tuberculösen Veränderungen an ihrer Oberfläche zahlreiche punkt- bis hanfkorngrosse Flecken erkennen, welche schwärzlichroth gefärbt sind und ganz das Aussehen von Ekchymosen haben, wie sie bei manchen Infectionskrankheiten gefunden werden. Untersucht man diese Stellen mikroskopisch, dann stellt sich heraus, dass es sich nicht um Blutextravasate handelt, sondern um eine enorme Erweiterung der Capillaren in der nächsten Umgebung der tuberculösen Herde. Die Capillaren sind vollgestopft mit rothen Blutkörperchen, welche so dicht zusammengedrängt liegen, dass es so aussieht, als sei hier der Blutstrom zum vollständigen Stillstand gekommen. Nur ausnahmsweise findet man Zerreibungen 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 geröthet. Das, was in diesem Symptomencomplex nie fehlt und geradezu pathognomisch ist, sind die hämorrhagie-ähnlichen Flecke an der Leberoberfläche. Am besten sieht man sie bei Thieren mit 4—5 Wochen alter Tuberculose, deren Leber schon von zahlreichen grauen Knötchen durchsetzt ist, aber noch nicht infolge ausgedehnter Nekrose das bekannte, eigenthümliche gelb und braun marmorirte 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 Isolirung 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 Ueberschuss 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 Vacuum über Schwefelsäure getrocknet, ein fast

weisses Pulver giebt. 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 Niederschlags 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 alkoholfuchten Niederschlag durch Erwärmen auf dem Wasserbade zu trocknen, dann sintert er zusammen und wird bräunlich; im Vacuumexsiccator dagegen trocknet er zu einer weissen, schwammigen Masse, die leicht zu Pulver zerdrückt werden kann. Das Tuberkulin giebt 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 Extractivstoffe. Auch gelingt es nicht, durch absoluten Alkohol den wirksamen Stoff vollständig aus dem Tuberkulin niederzuschlagen. Denn, wenn der abfiltrirte 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 Thier zu tödten. Aber in einem Versuche erfolgte der Tod nach Injection 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 Theil 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 Proskauer und Prof. Brieger so ziemlich alle hierfür in Frage kommenden Methoden versucht, von denen ich nur folgende speciell erwähnen will: Behandlung mit Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat, Kaliumcarbonat, Baryt, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Eisenacetat, Bleiacetat, Tannin, Thierkohle. 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 Natriumcarbonat in Lösung gebracht, noch seine volle Wirksamkeit, aber es ist nicht gelungen, die wirksame Substanz nun wieder vom Tannin abzuscheiden. 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 Verhältniss, wie in den früheren Versuchen, und zwar im Verhältniss 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 Concentration leicht reinigen lässt. Es wird bei diesem Versuch ein Theil Tuberkulin (z. B. 10 ccm) in ein Becherglas gethan, und unter Umrühren anderthalb Volumtheile (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 abgossen, 60% Alkohol in gleicher Menge zugegossen, umgerührt und wieder zum Absetzen hingestellt. Dies wird so oft, 3—4 mal, 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 Vacuumexsiccator getrocknet. Er giebt 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 Niederschlags 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 Reactionen so constant, dass man ihn als nahezu rein ansehen kann; vielleicht bildet er schon in Wirklichkeit das vollkommen isolirte wirksame Princip des Tuberkulins. Während von dem 100%igen Alkoholniederschlag mindestens

50 mg erforderlich sind, um dieselbe Wirkung zu erzielen wie mit 0,5 g Tuberkulin, genügen von dem 60%igen Alkoholniederschlag 10 mg; in mehreren Versuchen starben die Thiere schon auf 5 mg, in einem Falle sogar auf 2 mg an ausgesprochener Tuberkulinwirkung. Die Ausbeute beträgt etwa 1%.¹⁾ Berücksichtigt man die Wirkung der gewonnenen Menge im Verhältniss 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 Tödtung eines tuberculösen Thieres erforderlich ist.

Der 60%ige 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 ein bis zwei Wochen erheblich an Stärke der Wirkung abgenommen hatte. Besonders empfindlich scheint die wässrige Lösung gegen das Eindampfen zu sein; sie leidet dabei aber weniger, so lange noch genügend Flüssigkeit vorhanden ist, als gegen Ende des Eindampfens, wenn die Lösung sehr concentrirt wird; es scheiden sich dann gerinnelartige Flocken aus, welche auf Wasserzusatz sich nicht wieder lösen. Eine Probe des Niederschlags, 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 theilweise unlöslich. Anfangs nahm ich an, dass die unlöslichen Bestandtheile dem Tuberkulin beigemengte fremde Substanzen seien, welche man durch vorsichtiges trockenes Erhitzen, durch Behandeln mit heissem Dampf u. s. w. 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 coagulirte Eiweisskörper handelte, welche den wirksamen Stoff mit niedrigeren haben konnten. Da es aber weder gelang, durch andere Eiweissstoffe, welche der wässrigen Tuberkulinlösung zugesetzt und zur Coagulation gebracht wurden, noch durch andere zu diesem Zweck in der Lösung bewerkstelligte Niederschläge das wirksame Princip 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 Modification 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 Natriumcarbonat bis zur deutlich alkalischen Reaction 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 vier Monaten aufbewahrte Lösung hat sich bis jetzt unverändert wirksam gehalten. Wenn die Lösungen einen Glycerin Gehalt von einigen Procent 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 glycerinhaltig ist. So wurden mehrere Proben im Autoklaven stundenlang auf 130°, selbst bis zu 160° erhitzt, ohne dass ihre Wirkungsfähigkeit merklich dadurch herabgesetzt wurde.²⁾ Das Glycerin spielt somit für das Tuberkulin eine sehr wichtige Rolle als conservirendes Mittel.

Fertigt man eine concentrirte Lösung des möglichst sorgfältig gereinigten Tuberkulins an und giesst davon einige Cubikcentimeter in absoluten Alkohol, dann entsteht nicht, wie man erwarten sollte, sofort ein Niederschlag, sondern nur eine ganz schwache Opalescenz. 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%iger

¹⁾ 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.

²⁾ In einem von Professor Pfuhl angestellten derartigen Versuche wurden zu gleicher Zeit Proben: 1) von Roh-tuberkulin, 2) von wässriger Lösung und 3) von 50% glycerinhaltiger Lösung des gereinigten Tuberkulins 2 Stunden lang im Autoklaven einer Temperatur von 160° ausgesetzt, und dann entsprechende Mengen davon tuberculösen Thieren injicirt. Nur das Thier, welches die wässrige Lösung erhalten hatte, blieb am Leben; die beiden anderen mit Roh-tuberkulin und glycerinhaltiger Lösung des gereinigten Tuberkulins injicirten starben und zeigten ausgesprochene Tuberkulinwirkung.

Alkohol kann schon ziemlich viel davon aufnehmen, 60 %iger Alkohol beträchtliche Mengen. Wie kommt es nun aber, dass das Tuberkulin aus der ungereinigten Flüssigkeit durch Alkohol gefällt werden kann? Dieses Räthsel liess sich leicht dadurch lösen, dass dem tuberkulinhaltigen Alkohol der Reihe nach die Bestandtheile der ungereinigten Flüssigkeit zugesetzt wurden. Der Glycerinzusatz liess keinen Niederschlag entstehen. Die Extractivstoffe bildeten an und für sich einen Niederschlag; aber nachdem dieser sich abgesetzt hatte, hatte der Alkohol noch sein opalescirendes 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 concentrirten Natriumchloridlösung genügt, um in mehreren hundert Cubikcentimetern 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 %igem Alkohol diejenigen Mineralsalze, welche die Fällung des Tuberkulins begünstigen, entfernt sind, fängt bei weiterem Spülen mit verdünntem Alkohol letzterer an zu opalesciren, d. h. er beginnt das Tuberkulin zu lösen, und man 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 Reactionen, welche zur Charakterisirung des gereinigten Tuberkulins dienen können, seien folgende erwähnt.

Zunächst giebt es alle Eiweissreactionen; so die Biuretreaction, die Adamkiewicz'sche Reaction (Eisessig und concentrirte Schwefelsäure); mit dem Millon'schen Reagens entsteht ein weisser Niederschlag, der beim Erwärmen röthlich wird u. s. w.

Phosphorwolframsäure, Eisenacetat, Ammoniumsulfat, Gerbsäure fallen das Tuberkulin aus seiner Lösung vollständig aus.

Bleiacetat bewirkt eine starke Trübung, aber keine vollständige Fällung.

Auch die Essigsäure ruft in der wässrigen 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 Modification 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 Concentration.

Salpetersäure bewirkt dagegen einen Niederschlag, der beim Stehen zunimmt, beim Kochen eine gelbe Lösung giebt und auf Zusatz von Natronlauge braunroth wird (Xanthoproteinsäurereaction).

Aschenanalysen und Elementaranalysen des gereinigten Tuberkulins sind von den Herren Proskauer und Brieger ausgeführt und haben ergeben:

1. Aschenanalysen:

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

II. Asche von 0,1410 g Substanz (bei 100° getrocknet) 0,0265 = 18,46% (Proskauer).

III. Asche von 0,1740 g Substanz (bei 100° im Vacuum getrocknet) 0,0350 = 20,46% (Proskauer).

Die Präparate I und II waren von mir aus je 500 ccm Roh-tuberkulin hergestellt, Präparat III von Herrn Proskauer aus 300 ccm (sechsmal mit 60% Alkohol gewaschen, viermal mit 70%, je dreimal mit 80% und 90% und fünfmal mit absolutem Alkohol, letzterer mit Aether 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 Reactionen (Bleiacetat, Essigsäure) lassen indessen vermuthen, 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 Verwerthung 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 Eisenacetat ab.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass man bei weiterem Suchen unter den Producten der pathogenen Bacterien 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 tuberculösen Meerschweinchen beschränkt. Nachdem es nun aber gelungen war, den wirksamen Stoff in möglichst isolirter Form herzustellen, war es natürlich von grösstem Interesse, zu erfahren, wie derselbe auf die Menschen wirkt, namentlich ob die von uns erwünschten therapeutischen Effecte 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 Aerzten, welche sich in dankenswerther Weise dazu bereit erklärt hatten.

Dr. Kitasato erhielt am 24. Juni 1891 mittags um 12 Uhr 2 mg injicirt. Zur Zeit der Injection 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 Sch weiss. Sonst war das Allgemeinbefinden ungestört. (Der Puls stieg von 72 bis 92.)

Dr. A. Wassermann erhielt am 25. Juni 3 mg injicirt. Die Temperatur stieg von 37,2° bis 38,7° im Laufe von 11 Stunden und fiel dann wieder zur Norm. Beim Beginn der Reaction wurde Empfindlichkeit und ziehendes Gefühl in den Brust- und Bauchmuskeln beobachtet; auch Hitze und Eingeklemmensein 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 subjectiven Beschwerden bestanden in leichtem Frost und später folgendem Hitzegefühl, Mattigkeit und Kopfschmerzen. (Puls von 72 bis 100.)

Direktor Dr. P. Guttman 28. Juli 5 mg. Die Temperatur geht von 36,5° innerhalb 8 Stunden auf 39,2°. 4 Stunden nach der Injection zunehmendes Ziehen in den Gliedern, nach weiteren 2 Stunden Frösteln, welches Herrn Guttman zwang, in's Bett zu gehen. Dann folgte Hitze und Sch weiss. 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 subjectiven Empfindungen hielten damit gleichen Schritt, und es zeigten sich alle die bekannten nach Einspritzung des Roh-tuberkulins auftretenden Störungen wieder, sodass 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 irgend welche nachweisbaren Anzeichen von Tuberculose erhielt am 27. Juli 4 mg des gereinigten Präparats injicirt. Die Temperatur stieg von 36,9° innerhalb 10 Stunden auf 39,5°, fiel dann auf 38,4°, ging aber bis 27 Stunden nach der Injection wieder auf 40,2°. Während des ersten Anstiegs der Temperatur hielten sich die subjectiven 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 Excitantien (Alkoholica) erforderlich erschienen. Puls und Temperatur kamen erst nach ungefähr 48 Stunden wieder auf ihren gewöhnlichen Stand.

Ob in diesem Falle ein Verdacht auf Tuberculose, für welchen sich nachträglich einige Anhaltspunkte ergaben, oder das unruhige Verhalten des Herrn W. die Erklärung für den unregelmässigen und stürmischen Verlauf der Reaction geben kann, mag unentschieden bleiben. Diese Beobachtung lehrt jedoch unzweifelhaft, dass auch das gereinigte Tuberkulin bei zu starker Reaction 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 Tuberculösen angestellt, und zwar geschah dies an einer grösseren Zahl von Kranken im Krankenhause Moabit, welche einige Monate lang theils ausschliesslich mit dem reinen Tuberkulin, theils in Abwechselung mit dem Rohtuberkulin behandelt wurden. Ueber diese Versuche kann ich mich kurz fassen, da sie ebenfalls zu dem Ergebniss geführt haben, dass das reine Tuberkulin von dem Rohtuberkulin sich in seiner Wirkung nicht merklich unterscheidet. Ersteres hat diagnostisch und therapeutisch denselben Effect wie das letztere, wenn es in einer solchen Dosis angewendet wird, dass die Reactionerscheinungen, namentlich die Temperatur, welche den sichersten Maassstab abgibt, die gleiche Höhe erreichen. Es hat sich aber dabei herausgestellt, dass das gereinigte Tuberkulin, welches für Meerschweinchen 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 Dosirung bietet das gereinigte Tuberkulin keinen Vortheil. Denn die Wirkungsfähigkeit desselben lässt sich doch nur, ebenso wie beim Rohtuberkulin, nicht auf Grund von chemischen Reactionen, sondern durch die Prüfung am Thierkörper 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 Princips 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 Fragen noch weiter zu verfolgen.

In meiner letzten Veröffentlichung über das Tuberkulin hatte ich über die Herkunft desselben und seine Bereitungsweise so viel angegeben, wie es für den Sachverständigen ausreichen musste, um den von mir angegebenen Weg verfolgen zu können. Die Angaben, dass das Tuberkulin in den Tuberkelbacillenculturen enthalten ist, und dass man sich von dem Vorhandensein desselben jederzeit durch den Versuch am tuberculösen Meerschweinchen überzeugen und bei Versuchen zur Gewinnung des wirksamen Stoffes aus den Culturen die Reaction am Thiere stets als eine zuverlässige Controlle benutzen kann, hätte genügen müssen, um einen geschickten Bacteriologen zur Herstellung des Tuberkulins oder eines gleichwerthigen Präparates zu befähigen. Wenn trotzdem nur ganz vereinzelte Bacteriologen sich an diese Aufgabe herangewagt, und, soweit ich die weitschichtige Litteratur zu übersehen vermag, dieselbe auch nur theilweise gelöst haben, so hat das eigentlich etwas Beschämendes für die heutigen Bacteriologen, welche, anstatt selbstständig 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 Beurtheilung der Tuberkulinfrage eine ruhigere und mehr objective 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 Tuberkelbacillen in Massen zu cultiviren. Ohne solche Massenculturen ist an die Herstellung des Tuberkulins in nennenswerthen Mengen überhaupt nicht zu denken. Tuberkelbacillen in Massen zu cultiviren, ist aber nur einem geübten Bacteriologen möglich, der Ungeübte wird wohl auch Massenculturen zu Stande bringen, aber keine Reinculturen; mit unreinen Culturen wird er nichts als Unheil anrichten, und er sollte deswegen seine Hände lieber davon lassen.

Ursprünglich habe ich die Tuberkelbacillen auf Glycerinpeptonagar in Reagensgläsern gezüchtet, die Culturen, wenn sie den Höhepunkt der Entwicklung erreicht hatten, abgespült, auf einem feinen Drahtnetz gesammelt, mit einer 4 %igen Glycerinlösung übergossen, mit dieser Lösung auf den zehnten Theil eingedampft, abfiltrirt und das Filtrat verwendet. Die Züchtung auf Agar in

Reagensgläsern ist aber sehr mühsam und giebt verhältnissmässig wenig Ausbeute. Als es darauf ankam, grössere Mengen zu schaffen, musste daher versucht werden, grössere Gefässe für die Culturen 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 Tuberkelbacillen in flüssigen Nährmedien angestellt hatte. Anfangs fielen die Culturen wenig befriedigend aus; sie wuchsen in der Flüssigkeit sehr langsam und kümmerlich. Zufällig machte ich dann aber die Beobachtung, dass einzelne platte Stückchen der Bacillencultur, 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 Cultur ist erheblich grösser als der auf festem Nährboden erzielte.

Als Culturflüssigkeit kann man ein Infus von Kalbfleisch benutzen, das in der gewöhnlichen Weise hergestellt wird. Dasselbe muss schwach alkalisch sein und einen Zusatz von einem Procent Pepton und 4—5 Procent Glycerin erhalten. An Stelle des Kalbfleischinfuses kann auch eine einprocentige Fleischextractlösung verwendet werden.

Die Culturengefässe, am besten Kölbchen mit flachem Boden, werden nur zur Hälfte, und zwar mit 30—50 ccm Flüssigkeit gefüllt, gut sterilisirt und dann so geimpft, dass ein nicht zu kleines Stück der Aussaatcultur auf der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmt. Die Culturen werden am besten bei 38° gehalten.

In Bezug auf die Herkunft der zur Cultur benutzten Tuberkelbacillen habe ich keinen Unterschied gefunden. Für die Wirksamkeit des Tuberkulins ist es ganz gleichgültig, ob dasselbe mit frisch gezüchteten Culturen oder mit mehrere Jahre alten hergestellt wird, ebenso ob die Culturen direkt vom tuberculösen Menschen gewonnen, oder ob sie wiederholt durch den Thierkörper gegangen sind.

Bei dieser Art und Weise der Züchtung geht ein Theil des wirksamen Stoffes in die Culturflüssigkeit über, wovon man sich durch Probeinjection an tuberculösen Meerschweinchen leicht überzeugen kann. Ich habe deswegen, nachdem ich dies bemerkt hatte, die Culturen nicht mehr mit wässriger Glycerinlösung, sondern gleich mit der Culturflüssigkeit extrahirt, um so auch den in dieser enthaltenen Stoff zu verwerten. Dass auf diese Weise die Culturen genügend extrahirt werden, geht daraus hervor, dass sie nach der Extraction nur noch eine geringe Wirkung auf tuberculöse Meerschweinchen ausüben vermögen, und dass die Culturflüssigkeit, wenn sie ohne die Culturen eingedampft wird, ein erheblich schwächeres Tuberkulin liefert.

Die zur Extraction verwendeten Culturen müssen vollkommen reif, also 6—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 Uebung wird man im Stande sein, auch ohne mikroskopische Untersuchung die Abwesenheit von Verunreinigungen durch fremde Mikroorganismen zu constatiren, welche letzteren bekanntlich in flüssigen Nährmedien weit schwieriger als auf festen zu erkennen sind.

Die vollkommen rein befundenen Culturen werden in einem geeigneten Gefäss auf dem Wasserbade auf den zehnten Theil 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 Tuberkelbacillen ausnahmslos abgetödtet sind. Um die letzteren aber möglichst daraus zu entfernen, wird die Flüssigkeit durch ein Thon- oder Kieselguhrfilter filtrirt.

Das so gewonnene Tuberkulin enthält etwa 40—50 % Glycerin und ist dadurch gegen Zersetzung durch Bacterien geschützt. Man hat nur darauf zu achten, dass sich nicht Schimmelpilze darauf ansiedeln. So verwahrt, hält es sich allem Anscheine nach sehr lange, vielleicht Jahre lang 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 tuberculösen Meerschweinchen abgestufte Dosen injicirt erhalten. Wenn man für jede Dosis mindestens zwei Thiere nimmt, und die Dosen genügend abstuft, dann lässt sich die Stärke des Tuberkulins mit hinreichender Genauigkeit ermitteln. Bei der Auswahl der Thiere für diesen Versuch ist jedoch wohl darauf zu achten, dass die Tuberculose sich bei ihnen möglichst in demselben Stadium der Entwicklung befindet.