(Aus dem Hygienischen Institut und der Medizinischen Poliklinik der Universität in Königsberg i. Pr.)

Über die Natur der in den Tuberkulinen wirksamen Stoffe.

Von

Prof. Dr. H. Selter und Dr. E. Tancré.

(Eingegangen am 25. April 1922.)

Durch die Untersuchungen *Selters*¹⁾ wurde der Nachweis erbracht, daß die Tuberkulinreaktion nicht als Antigen-Antikörperreaktion aufzufassen ist, und daß das Tuberkulin einen spezifischen Reizstoff darstellt, welcher ein durch eine tuberkulöse Infektion empfänglich gewordenen Gewebe zur Entzündung bringt, ohne daß das Tuberkulin dabei an die Zellen gebunden wird. Ferner wurde durch *Selter*²⁾ gezeigt, daß die verschiedenen Präparate aus abgetöteten Tuberkelbacillen (Bacillenemulsionen, die *Muchs*chen Milchsäureaufschließungen u. a.) lediglich durch das in ihnen enthaltene Tuberkulin zur Wirkung kommen und keine sonstigen antigenen Eigenschaften besitzen. Als weitere Aufgabe galt es nun, die Natur der allen Tuberkulinpräparaten anscheinend gemeinsamen Substanz aufzuklären.

In der Literatur der letzten Jahre findet man manche Klagen über die wechselnde Wirksamkeit der Tuberkuline bei der cutanen Anwendung nach *Pirquet*, die einmal auf die Tuberkuline selbst, dann auf die durch die Kriegereignisse (Unterernährung) veränderte Reaktionsfähigkeit der Haut zurückgeführt werden. Dieses veranlaßte *Moro*³⁾, ein eigenes diagnostisches Tuberkulin zu konstruieren. Er ging dabei von dem Gedanken aus, daß im Tuberkulin besondere hautreizende Stoffe (Cutine) vorhanden seien, deren Anreicherung man durch Benutzung geeigneter Stammkulturen erstreben sollte. Bei Prüfung verschiedener Tuberkelbacillenkulturen erkannte er, daß diejenigen Stämme das beste Tuberkulin lieferten, welche die größte Wachstumsintensität darboten. *Moro* nimmt weiter an, daß Kinder mit boviner Infektion vorwiegend auf bovines Tuberkulin reagieren und will deshalb humanes mit bovinem Tuberkulin mischen. Er erhielt so durch Auslese der Stammkulturen, möglichste Einengung der Bouillon und Zusatz von Bovotuberkulin sein diagnostisches Tuberkulin, das in seiner Wirkung bei cutaner Anwendung den empfindlicheren Methoden (intracutane oder sub-

¹⁾ *Selter*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **32**, 325.

²⁾ *Selter*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **35**, 233.

³⁾ *Moro*, Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 44.

cutane Injektion) nahe kommen soll. Über Nachprüfungen mit dem diagnostischen Tuberkulin *Moros* wird von *Curschmann* und *Prausnitz* berichtet. *Curschmann*¹⁾ fand es wirksamer als Alttuberkulin, aber für das Kindesalter noch nicht so wirksam wie reines bovines Tuberkulin. Nach *Prausnitz*²⁾ sind Alttuberkulin und *Morosches* Tuberkulin ziemlich gleichwertig, doch scheint letzteres auch ausschließlich bovine Infektion bei Kindern anzuzeigen. Die Frage, ob eine bovine Infektion vorwiegend auf bovines Tuberkulin reagiert, ist eine schwierige und muß für sich betrachtet werden. Während *Klose*³⁾ und *Synwoldt*⁴⁾ einen nicht unbeträchtlichen Teil der Kinder (5,3 und 35%) nur auf bovines Tuberkulin positiv reagierend fanden, lehnt *Kleinschmidt*⁵⁾ die Möglichkeit der Differenzierung der Erregertypen durch die Anwendung entsprechender Tuberkuline ab und hält die Tuberkulinreaktion für eine Gruppenreaktion der ganzen Gruppe der säurefesten Bakterien. Hierin geht er aber zweifellos zu weit, wie die Untersuchungen über Anwendung eines aus *Friedmannbacillen* hergestellten Tuberkulins ergeben haben. Dieses veranlaßte beim Menschen selbst nach Einspritzung größerer Mengen überhaupt keine oder nur eine äußerst geringe Reaktion. Da aber auch nach *Kleinschmidt* hier und da die Reaktion auf bovines Tuberkulin allein positiv ausfällt, empfiehlt er, wie *Klose* und *Synwoldt*, entweder die gleichzeitige, aber getrennte cutane Anwendung beider Tuberkuline (humanes und bovines Tuberkulin), oder die einmalige Anwendung eines Misch-tuberkulins. Der Assistent des Hygienischen Instituts *Nehring*⁶⁾ versuchte im Anschluß an Tuberkulinprüfungen bei Landkindern festzustellen, ob sich durch getrennte Einspritzung des humanen und bovinen Tuberkulins ein Anhalt für die Art der tuberkulösen Infektion gewinnen ließe. 23 positiv reagierende Kinder erhielten am linken Arm zu gleicher Zeit intracutan $\frac{1}{10}$ und $\frac{1}{100}$ mg humanes Tuberkulin, am rechten Arm dieselben Mengen bovines Tuberkulin (beide Tuberkuline von den Höchster Farbwerken); den hierauf negativ reagierenden Kindern wurden 4 Tage später je $\frac{1}{10}$ und 1 mg von beiden Tuberkulinen injiziert. Es fand sich nicht der geringste Unterschied. Sämtliche Kinder reagierten auf die beiden Tuberkuline in gleicher Weise; ein Beweis, daß es mit Hilfe der intracutanen Injektion nicht möglich ist, durch Benutzung des humanen oder bovinen Tuberkulins die Art der tuberkulösen Infektion beim Menschen zu erkennen. Daß die cutane Pirquetreaktion in diesem Falle keine empfindlicheren Resultate ergibt, ist von *Nehring* durch vergleichende Untersuchungen an anderen Kindern festgestellt worden.

Die wirksamen Stoffe des Tuberkulins werden von *Wolff-Eisner*⁷⁾ für ultra-mikroskopische Splitter der Tuberkelbacillen angesehen, die aber nicht als solche wirken sollen, sondern erst, nachdem sie durch Stoffe des tuberkulinempfindlichen Körpers (Lysine) in einen löslichen Zustand gebracht (lysiert) sind. Im Gegensatz hierzu führt *Zieler*⁸⁾ die Wirkung des Tuberkulins auf gelöste diffusionsfähige

1) *Curschmann*, Med. Klinik 1921, S. 643.

2) *Prausnitz*, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 32.

3) *Klose*, Dtsch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 48.

4) *Synwoldt*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 17.

5) *Kleinschmidt*, Med. Klinik 1918, Nr. 47.

6) Diese Untersuchungen werden in der Münch. med. Wochenschr. veröffentlicht.

7) *Wolff-Eisner*, Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 35.

8) *Zieler*, Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 32 und Arch. f. Dermatol. 11, 37.

Stoffe (Endotoxine) zurück. *Zieler* bekam mit Dialysaten von Alttuberkulin, *Kochs* Bacillenemulsion und selbsthergestellter Bacillenaufschwemmung positive Reaktionen, die allerdings nur schwach waren. Alttuberkulin, durch Tonkerzen filtriert, rief stärkere Reaktionen hervor, als das nicht filtrierte Präparat. *Zieler* schließt aus seinen Beobachtungen, daß nur ein Teil (wenn auch vielleicht der größte) der Wirkung des Tuberkulins durch gelöste Eiweiß- bzw. eiweißähnliche Stoffe bedingt sei, daß also diese Wirkung durch echte Lösungen erzeugt werden könne.

Bei der Herstellung des Tuberkulins ging *Robert Koch* von der Bouillon gut gewachsener Kulturen aus, die auf den 10. Teil ihres Volumens bei 80° eingedampft wurde. Später wurde die Bouillon mit den Bacillen zusammen verarbeitet und dann durch Zentrifugieren oder Filtrieren von den Bacillen befreit. Andere Forscher versuchten die Tuberkelbacillen durch Behandlung mit Chemikalien (Alkalien, Säuren) aufzuschließen und daraus eine klare Lösung zu gewinnen. Die Tuberkuline unterliegen der staatlichen Prüfung, nach der ein Tuberkulin als gültig angesehen wird, wenn 0,5 ccm des konzentrierten Präparats imstande ist, ein tuberkulöses Meerschweinchen bei intraperitonealer Anwendung zu töten. Von *Moro*, *Selter* u. a. ist schon darauf hingewiesen, daß diese Art der Prüfung nicht einwandfrei ist, daß es besser wäre, die Prüfung am tuberkulinempfindlichen Menschen vorzunehmen. Als Standardtuberkulin gilt im allgemeinen das Alttuberkulin *Koch*. Die Menge der wirksamen Substanz ist aber auch in diesem Präparat keineswegs bekannt und scheint großen Schwankungen zu unterliegen. Am zweckmäßigsten geht man beim Vergleich der Stärke der durch verschiedene Methoden gewonnenen Tuberkuline von einer gut verriebenen Bacillenemulsion aus, deren Gehalt an Tuberkelbacillenplasma bekannt ist. Diesen Weg schlugen wir bei unseren Untersuchungen ein, indem wir das von *Selter* angegebene Valtuberkulin, d. h. durch Verreibung im Achatmörser soweit aufgeschlossene Tuberkelbacillen, daß in 1 mg Bacillensubstanz nur noch wenige lebende erhaltene Bacillen nachzuweisen sind, zugrunde legten. Dieses Präparat enthält das Tuberkelbacillenprotoplasma als feine Emulsion in kleinen Schollen, die durch Färbung kaum nachzuweisen sind. $\frac{1}{1000}$ mg (auf Bacillensubstanz berechnet) ergab intracutan injiziert bei tuberkulösen Patienten stets eine stärkere Reaktion; bei stark allergischen Patienten wirkten sogar noch Verdünnungen bis 1:1 Million¹⁾. Das Valtuberkulin diente zugleich als Ausgangsmaterial, aus dem durch verschiedenartige Behandlung Präparate gewonnen wurden, deren Wirksamkeit durch die intracutane Reaktion bei tuberkulösen Menschen (und zwar stets bei denselben Patienten) mit dem Valtuberkulin in den entsprechenden Dosen verglichen wurde. Schon gleich der Vorversuch zeigte uns, daß die wirksame Substanz in dem Protoplasma der Tuberkelbacillen zu suchen war. Das Valtuberkulin wurde scharf zentrifugiert, das Zentrifugat abgenommen, der Bodensatz mit Kochsalzlösung wieder bis zur alten Höhe aufgefüllt und durch gleichmäßiges Schütteln und Verreiben verteilt. Die Prüfung am Menschen ergab beim Zentrifugat nur eine ganz schwache Wirkung,

¹⁾ Das Valtuberkulin wurde vor der Anwendung zu diagnostischen Zwecken durch Erhitzen auf 70° sterilisiert.

während der Bodensatz eine gleiche Wirkung wie das Originaltuberkulin aufwies. Es sollte nun versucht werden die wirksame Substanz aus dem Protoplasma heraus in Lösung zu bringen. Zu diesem Zweck wurde das Vitaltuberkulin in konzentrierter Form (1 ccm = 30 mg Tuberkelbacillensubstanz) mit destilliertem Wasser, Natronlauge, Kalilauge¹⁾, Essigsäure, Citronensäure, Milchsäure²⁾ behandelt und bei verschiedenen Temperaturen 37°, 50°, 60°, 80° stundenlang extrahiert. Es wurden sodann die ganzen Präparate (die sauren oder alkalischen Lösungen nach entsprechender Neutralisierung), die Zentrifugate und Bodenrückstände beim Menschen geprüft. Wir brauchen für diese Versuche die einzelnen Protokolle nicht aufzuführen und können das Ergebnis im folgenden zusammen fassen:

1. Kein Präparat zeigte eine stärkere Wirkung als das Ausgangsmaterial.
2. Die Behandlung mit Aqua dest. hatte eine deutlich schädigende Wirkung.
3. Die Behandlung mit Laugen oder Säuren hatte keinen wesentlichen Einfluß. Es gelang zwar anscheinend einen größeren Teil der wirksamen Substanzen aus dem Protoplasma in Lösung überzuführen; die Wirkung dieser Lösungen war aber stets geringer als die des Vitaltuberkulins.

Eine weitere Frage war, ob die in Lösung übergegangenen Stoffe wirklich gelöst sind, oder ob wir es mit kolloidalen Lösungen zu tun haben, in denen die wirksamen Substanzen als kleinste Protoplastmateilchen (ultramikroskopische Splitter von *Wolff-Eisner*) enthalten sind. Da in diesen Versuchen die genauen Ergebnisse am Menschen von Interesse sind, sollen die Protokolle aufgeführt werden. Im ersten Versuch wurde Vitaltuberkulin Stamm Eber (25. Sieben-Wochen-Generation) und Stamm 115 (8. Sieben-Wochen-Generation) in Verdünnung von 1 mg Bacillensubstanz in 1 ccm durch ein Berkefeldfilter geschickt. Das Filtrat war absolut klar. Dieses wurde nun mit dem nicht filtrierten Vitaltuberkulin verglichen, indem demselben tuberkulösen Patienten am linken Arm fallende Mengen von 0,01 mg abwärts bis 0,000001 mg Filtrat in je 0,1 ccm Flüssigkeit intracutan injiziert wurden, am rechten Arm die entsprechenden Mengen Vitaltuberkulin. Die Patienten wurden bis zu 8 Tagen beobachtet und die Stärke der entsprechenden Reaktion aufgezeichnet. Wie bei unseren früheren Untersuchungen über die Wirkung des Tuberkulins³⁾ bedeuten die Zahlen die Größe der entstandenen Efflorescens, und zwar als arithmetisches Mittel, gewonnen aus zwei zueinander senkrechten Durchmesser. Die Zeichen über der Zahl geben die Stärke der Infiltration, die unter der Zahl die Stärke der entstandenen Rötung an.

⤿ = sehr stark;
 ~ = stark;
 ~ = schwach;
 — = negativ.

¹⁾ Beide in verschiedenen Konzentrationen 1—10 prozentig.

²⁾ Die Säuren in 1proz. Lösungen.

³⁾ *Selter und Tancreé*, Zeitschr. f. Tuberkul. 35, H. 1.

Versuch I.

Vergleichende Prüfung von Valtuberkulin Stamm Eber (25. Generation) und desselben Präparats nach Passieren eines Berkefeldfilters.

	mg	1	nach 2 Tagen	4	8		mg	1	nach 2 Tagen	4	8
Vital- tuberkulin	0,01	(11)	(11)	8	fast 0	Filtrat	0,01	(11)	(11)	8	0
	0,001	6	5	4	fast 0		0,001	9	8	4	0
	0,0001	4	3	fast 0	fast 0		0,0001	5	4	0	0
	0,00001	3	fast 0	0	0		0,00001	3	fast 0	0	0
	0,000001	fast 0	0	0	0		0,000001	fast 0	fast 0	0	0

Versuch II.

Vergleichende Prüfung von Valtuberkulin Stamm 115 (8. Generation) und desselben Präparates nach Passieren eines Berkefeldfilters.

	mg	1	nach 2 Tagen	4	5		mg	1	nach 2 Tagen	4	5
Vital- tuberkulin	0,01	9	1	etw. +	0	Filtrat	0,01	12	11	fast 0	0
	0,001	8	4	etw. +	0		0,001	10	6	fast 0	0
	0,0001	4	fast 0	0	0		0,0001	5	fast 0	0	0
	0,00001	Stückka- nal u. U. etw. rot	0	0	0		0,00001	fast 0	0	0	0
	0,000001	do. rot	0	0	0		0,000001	0	0	0	0

Die beiden Versuche ergaben ein ähnliches Resultat, wie es *Zieler* erhalten hatte. Die Poren des Berkefeldfilters haben von der wirksamen Substanz nichts zurückgehalten. Das Filtrat ruft fast genau dieselben Reaktionen hervor wie das unfiltrierte Valtuberkulin, ein Beweis, daß die wirksamen Substanzen so klein sind, daß sie durch die Poren des Berkefeldfilters hindurchgehen.

Zur Lösung der Frage, ob wir eine echte oder eine kolloidale Lösung vor uns haben, bedienten wir uns der Dialysiermethode, die auch schon *Zieler* für diesen Zweck herangezogen hatte. Um aber ein möglichst klares Urteil zu bekommen, benutzten wir neben dem Valtuberkulin noch Alttuberkulin (Höchst) in Verdünnungen von 1 : 10 und 1 : 100 und eine klar abgenommene Bouillon¹⁾ von gut gewachsenen vierwöchentlichen Tuberkelbacillenkulturen in konzentriertem Zustande und in einer Verdünnung von 1 : 10. Von diesen Lösungen wurden je 5 ccm in Dialysierhülsen von *Schleicher* und *Schüll* gebracht, wie sie für die Abderhaldensche Reaktion verwandt werden. Die Hülsen wurden vorher geprüft, ob sie undurchlässig für Eiweiß (Serum) und durchlässig für Pepton (1/4% Seidenpeptonlösung) waren. Für unsere Versuche wurden Hülsen ausgewählt, die sich als mittelstark durchlässig für Pepton erwiesen hatten. Die Hülsen wurden in Glaskölbchen mit 20 ccm destilliertem Wasser gestellt, überdeckt und 24 Stunden im Brutschrank bei 37° belassen. Darauf wurde der Inhalt des Kölbchens und

¹⁾ Eiweißfreie Nährlösung nach *Lockemann*, wie sie von *Selter* in den letzten Jahren stets zur Züchtung seiner Tuberkelbacillenkulturen gebraucht wurde.

des Dialysierschlauches herausgenommen und der erstere durch Einengung bei 80° auf dieselbe Menge wie der Inhalt des Dialysierschlauchs gebracht. Der Inhalt des Dialysierschlauchs wurde dann ebenfalls kurze Zeit bei 80° sterilisiert. Sämtliche Präparate wurden mit Carbonsäure versetzt (entsprechend einer 0,5 proz. Lösung) und in den nächsten Tagen bei tuberkulösen Patienten nachgeprüft.

Versuch III.

Prüfung von Vitaltuberkulin Stamm Eber — Inhalt des Dialysierschlauchs und Dialysat.

	mg.	1	2	nach 3 8 Tagen	12	16
Inhalt des Dialysierschlauches	0,1	$\overline{13}$	$\overline{14}$	$\overline{13}$	$\overline{10}$	$\overline{5}$ fast 0
	0,01	$\overline{7}$	$\overline{8}$	$\overline{6}$ fast 0	fast 0	0
Dialysat	0,1	$\overline{7}$	$\overline{8}$	fast 0	0	0
		eben gerötet	sehr schwach			

Nach Versuch III tritt von dem Vital-Tuberkulin ein kleiner Teil der wirksamen Substanz durch die Dialysiermembran in das destillierte Wasser über, der größere Teil ist aber im Schlauch zurückgeblieben. Das Dialysat ergibt auf die Menge von 0,1 mg Bacillensubstanz berechnet nur eine Reaktion, die halbmal so stark ist als die des Rückstandes in gleicher Konzentration.

Versuch IV.

Alttuberkulin Höchst wird in der Verdünnung von 1 : 10 dialysiert.

	mg	1	nach 3 7 Tagen	11		mg	1	nach 2 7 Tagen	11
Inhalt des Dialysierschlauches	0,1	$\overline{20}$	$\overline{19}$	$\overline{13}$	$\overline{5}$	Dialysat	0,1	$\overline{9}$	$\overline{9}$ fast 0 0
	0,01	$\overline{10}$	$\overline{14}$	$\overline{12}$	fast 0		0,01	fast 0	fast 0 0 0

Versuch V.

Alttuberkulin wird in Verdünnung von 1 : 100 dialysiert.

	mg	1	2	nach 4 6 Tagen	12		mg	1	2	nach 4 6 Tagen	12
Inhalt des Dialysierschlauches	0,1	$\overline{18}$	$\overline{16}$	$\overline{18}$	$\overline{10}$	Dialysat	0,1	$\overline{10}$	$\overline{8}$	fast 0	fast 0 0
	0,01	$\overline{10}$	fast 0	0	$\overline{blaurot}$ $\overline{0}$		0,01	$\overline{5}$	0	0	0 0

Alttuberkulin Höchst ist eine vollkommen klare Flüssigkeit; man könnte annehmen, daß in dieser die wirksame Substanz der Tuberkelbazillen gelöst sei. Obwohl wir das Präparat zur Beförderung der Diffusion um das 10- und 100fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt hatten, bekamen wir kein anderes Resultat als im Versuch III. Beide Verdünnungen lassen nur einen geringen Teil in das destillierte Wasser übertreten. Das Dialysat

zeigt in gleich starken Konzentrationen stets nur die halb so starke Reaktion wie der Inhalt des Dialysierschlauches.

Versuch VI.

Bouillon einer vierwöchentlichen Bouillonkultur Stamm Sputum wird klar abgenommen und in unverdünntem Zustande dialysiert. Vor der Prüfung am Menschen wird der Inhalt des Dialysierschlauches und des eingengten Dialysats mit physiologischer Kochsalzlösung um das 10fache verdünnt.

	ccm	1	2	nach 4 Tagen	11	12		ccm	1	2	nach 4 Tagen	8	12
Inhalt des Dialysier- schlauches	0,1	13	25	17	8	fast 0	Dialysat	0,1	fast 0	fast 0	0	0	0
	0,01	10	17	13	4	fast 0		0,01	0 Rötung d. Stich- kanals	0	0	0	0

Versuch VII.

Bouillon einer vierwöchentlichen Bouillonkultur Stamm Sputum wird klar abgenommen, um das 10fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und dialysiert.

	ccm	1	2	nach 5 Tagen	11	13		ccm	1	2	nach 5 Tagen	11	13
Inhalt des Dialysier- schlauches	0,1	14	12	12	8	fast 0	Dialysat	0,1	6	fast 0	fast 0	0	
	0,01	10	8	6	0	0							

Von beiden Präparaten wird das meiste im Schlauch zurückgehalten. Die Reaktionen mit dem Dialysat sind in beiden Fällen nur ganz schwach und schon nach 2 bis 5 Tagen abgeklungen.

Die Versuche III bis VII bringen den sicheren Beweis, daß die wirksamen Stoffe nur in kolloidal gelöstem Zustande vorhanden sind, und daß die Tuberkuline keine echten Lösungen darstellen. Wenn ein Teil der Stoffe durch die Membran des Dialysierschlauches hindurchgetreten ist, so spricht das nicht hiergegen, da nach den Beobachtungen der Kolloidchemiker auch in kolloidalen Lösungen ein Teil der Teilchen kleiner als die Poren der Dialysiermembran sein kann, und durch die Diffusion allein eine scharfe Unterscheidung zwischen echten und kolloidalen Lösungen heute nicht mehr vorgenommen wird. Wir müssen die Tuberkuline als Suspensionen von Protoplasmateilchen der Tuberkelbacillen auffassen. Durch Autolyse (wie in einer mehrwöchentlichen Bouillonkultur), durch kräftiges Verreiben der Tuberkelbacillen oder durch Behandlung mit chemischen Mitteln werden die Tuberkelbacillen in größere und kleinere Teilchen zerlegt. Je nach der Größe der Teilchen haben wir dann Emulsionen (Bacillenemulsion Koch, Valtatuberkulin) oder klare Lösungen (die verschiedenen bekannten Tuberkuline), die aber beide in ihrer Wirkung gleich sind, falls sie die gleichen Mengen Bacillensubstanz enthalten.

Von weiterem Interesse war noch, ob die Virulenz der zur Herstellung der Tuberkuline verwandten Tuberkelbacillenkulturen eine Rolle spielt. Zur Entscheidung dieser Rolle standen uns drei Kulturen zur Verfügung, eine virulente

Kultur Stamm Sputum, eine mittelvirulente Kultur Stamm 115 und eine avirulente Stamm Eber (32. Generation). Bei dem letzten Stamm war durch Überimpfung der Kulturen stets nach siebenwöchentlichem Aufenthalt im Brutschrank eine immer stärker werdende Abschwächung der Virulenz eingetreten, die sich im Meerschweinchenversuch verfolgen ließ. Dieser Stamm wurde vor allem von *Selter* zur Herstellung der bei seinen Immunisierungsversuchen benutzten Impfstoffe¹⁾ gebraucht und zeigte bis zur 28. Generation auch eine sicher immunisierende Wirkung in Mengen von 1 mg. Die 32. Generation hatte aber versagt, ein Zeichen, daß jetzt die Virulenz so stark abgeschwächt war, daß der aus dieser Generation hergestellte Impfstoff keine infizierenden und damit immunisierenden Eigenschaften mehr hatte. Alle 3 Stämme waren auf der gleichen Nährlösung gewachsen, nur wurden die Stämme Eber und 115 von sieben Wochen alten Bouillonkulturen, der Stamm Sputum von einer 4 Wochen alten Bouillonkultur abgenommen. Die Bazillenrassen wurden mehrere Stunden im Achatmörser verrieben, wobei wir bei Eber und 115 eine Aufschließung der Tuberkelbacillen zu kleinsten Protoplasmateilchen (mit wenigen erhaltenen Bacillen), bei Sputum eine Emulsion aus einzelnen Bacillen und kleinen Bacillenhäufchen erhielten. Die Präparate wurden mit Carbol-Kochsalzlösung soweit verdünnt, daß in 1 cem 1 mg Bacillensubstanz erhalten war, und 1 Stunde bei 60° sterilisiert. Bei einem tuberkulösen Patienten wurde Eber mit 115, bei dem anderen Eber mit Sputum verglichen, indem auf beiden Armen fallende Mengen der Präparate injiziert wurden.

Versuch VIII.

Versuch der Bacillenemulsion Stamm Eber (32. Generation) und Stamm 115 (8. Generation)

	mg	1	2	5	7	nach 10 Tagen	13	15	17
Stamm 115	0,01	9	10	10	8	6	6	4	fast 0
	0,001	3	5	5	5	4	fast 0	fast 0	fast 0
	0,0001	nur Stichkanal rot	3	3	fast 0	0	0	0	0
	0,00001	nur Stichkanal rot	fast 0	0	0	0	0	0	0
	0,000001	nur Stichkanal rot	fast 0	0	0	0	0	0	0

	mg	1	2	4	nach 6 Tagen	8	9	13
Stamm Eber	0,01	6	8	8	13	9	blaurot	etw. +
	0,001	Infiltrationen am Stichkan.	6	5	5	5	blaurot	etw. +
	0,0001	0	fast 0	0	fast 0	fast 0	0	fast 0
	0,00001	0	0	0	0	0	0	0
	0,000001	0	0	0	0	0	0	0

¹⁾ *Selter*, Zeitschr. f. Hyg. 95, 159.

Versuch IX.

Vergleich der Tuberkelbacillenemulsionen Stamm Eber (32. Generation) und Stamm Sputum.

		mg	1	2	4	6	nach 8 Tagen	10	13	20
Stamm Sputum	{	0,01	20	17	17	17	13	10	8	6
		0,001	15	12	12	12	10	8	6	4
		0,0001	10	8	8	8	6	6	3	fast 0
		0,00001	8	4	3	3	3	etw. +	etw. +	0
		0,000001	6	4	fast 0	fast 0	0	0	0	0
		mg	1	2	4	6	nach 8 Tagen	10	13	20
Stamm Eber	{	0,01	8	8	6	5	4	4	fast 0	fast 0
		0,001	6	4	4	3	fast 0	fast 0	fast 0	fast 0
		0,0001	etw. +	etw. +	0	0	0	0	0	0
		0,00001	0	0	0	0	0	0	0	0
		0,000001	0	0	0	0	0	0	0	0

Versuch VIII läßt keinen großen Unterschied zwischen dem avirulenten Stamm Eber und dem mittelvirulenten Stamm 115 erkennen. Stamm 115 ergibt in Verdünnung von 0,0001 mg noch eine schwach deutliche Reaktion, die etwas verspätet auftritt; dieselbe Menge führt bei Stamm Eber nicht mehr zu einer sicheren Reaktion. Bedeutend stärker jedoch ist der Unterschied zwischen Stamm Eber und Stamm Sputum in Versuch IX. Während bei Eber ungefähr dieselben Reaktionen ausgelöst werden wie bei dem Patienten in Versuch VIII, wirkt das Präparat aus Stamm Sputum noch deutlich in Verdünnung von 1 : 1 Million. Die Virulenz der Kulturen ist demnach von großer Bedeutung; man wird gut tun, stets virulente Kulturen zur Herstellung der Tuberkuline heranzuziehen. Für die Tuberkulose-Immunitätsforschung erscheint uns aber auch der Ausfall von Versuch VIII interessant, daß nämlich Virulenz und Tuberkulinwirksamkeit nicht parallel zu gehen braucht. Auch eine echte Tuberkelbacillenkultur, welche ihre Virulenz und damit ihre immunisierende Eigenschaften verloren hat, weist doch noch eine erhebliche Tuberkulinwirkung auf.

Es bleibt zum Schluß noch die Erörterung des Problems, wie die in den Tuberkulinen enthaltenen Protoplasmateilchen der Tuberkelbacillen im tuberkulinempfindlichen Körper zur Wirkung gelangen. *Wolff-Eisner*¹⁾ nimmt an, daß die „Tuberkelbacillensplitter“ nicht an sich die tuberkulöse Entzündung erzeugen, sondern erst dann, wenn sie durch die Körperkräfte (Lysine) eines tuberkulösen Menschen in einen löslichen Zustand gebracht sind. Er will dies aus folgenden Beobachtungen schließen: Beim Vergleich des Tuberkulins Enoch,

¹⁾ *Wolff-Eisner*, Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 30/31.

der Bacillenemulsion Höchst (die keine Bacillen, sondern nur kleine Bacillentrümmer enthält) und einer selbst hergestellten Bacillenemulsion aus intakten Tuberkelbacillen fand er bei cutaner Anwendung, daß die Bacillenemulsion Höchst ein gleichwertiges, ja sogar noch stärkeres Resultat ergab als das Tuberkulin, daß dagegen die mit den intakten Tuberkelbacillen erzeugte Reaktion nur schwach positiv ausfiel. In der Mehrzahl der Fälle trat nach Aufbringung der intakten Tuberkelbacillen auf die Haut überhaupt keine Reaktion ein. Der Erklärung *Wolff-Eisners* hierfür können wir uns nicht anschließen. Das Ausbleiben der Reaktion durch die intakten Bacillen ist u. E. lediglich darauf zurückzuführen, daß die Haut des Menschen die intakten Bacillen nicht oder nur sehr schwer durchtreten läßt, während dagegen die kleinen Protoplasmateilchen der Bacillenemulsion Höchst und des Tuberkulins leichter in die Haut eindringen und mit den tuberkulinempfindlichen Zellen in Berührung kommen. Wir wissen, daß die unverletzte Haut ein ziemlich dichtes Filter für die Bacillen darstellt, und daß auch die oberflächlich geritzte Haut, wie sie bei der Pirquetimpfung und der Pockenschutzimpfung geschaffen wird, nur für die kleinsten Krankheitserreger durchlässig wird. Wir müssen ferner annehmen, daß die oberflächlich liegenden Zellen der Haut verhältnismäßig wenig empfindlich für Tuberkulin sind, und daß die Tuberkulinempfindlichkeit der Zellen wegen der anatomischen Verhältnisse der Haut von oben nach unten zunimmt. Wenn man dann weiter bedenkt, daß die Haut bei den einzelnen Menschen ganz verschieden durchlässig ist, und ferner noch die mannigfachen Abstufungen der tuberkulösen Allergie berücksichtigt, so wird man zu der Überzeugung kommen, daß die cutane Anwendung des Tuberkulins für die Lösung derartiger Fragen, wie man sich die Wirkung des Tuberkulins erklären soll, nicht geeignet ist. Hierfür ist einzig und allein die intracutane oder subcutane Einspritzung des Tuberkulins zu verwerten. Betrachtet man den Versuch IX, in welchem das Valtuberkulin Eber (ungefähr entsprechend der Bacillenemulsion Höchst) und eine Emulsion von intakten Tuberkelbacillen verglichen wurde, so sieht man, daß auch die intakten Bacillen (Stamm Sputum) bereits nach 24 Stunden in den kleinsten Verdünnungen eine ausgesprochene Reaktion hervorgerufen haben, die in den späteren Tagen nicht stärker wird. Um noch genauer die Zeit des Auftretens der Reaktion zu prüfen, injizierten wir in einem neuen Versuch Valtuberkulin, Alttuberkulin und eine Emulsion aus intakten Bacillen-Stamm-Niere, und ließen den Patienten genau aufschreiben, wann die ersten Symptome bemerkt wurden. Die Injektionen erfolgten am Vormittag.

Das gleichzeitige Auftreten der Reaktionen nach 6 Stunden bei allen 3 Präparaten in Versuch X läßt erkennen, daß kein Unterschied zwischen diesen besteht und daß die intakten Bacillen in derselben Zeit wirken, wie das aufgeschlossene Tuberkelbacillenprotoplasma. Es bedarf also nicht erst der Auflösung der Bacillen oder der weiteren Aufschließung der kleinen Protoplasmateilchen durch Stoffe des Körpers, sondern die Tuberkulinsubstanzen wirken aus sich heraus.

Die Untersuchungen von *Selter*, sowie *Selter* und *Tancré* über das Wesen der Tuberkulinreaktion haben deutlich gezeigt, daß die im Tuberkulin wirksamen Stoffe mit den Zellen des tuberkulinempfindlichen Körpers oder daraus herge-

leiteten gelösten Stoffen des Blutserums eine nachweisbare Verbindung nicht eingehen, und daß aus den Tuberkulinen durch die Einwirkung des Zellgewebes keine neuen Giftstoffe gebildet werden, welchen die Entzündungsreaktionen zuzuschreiben wären. Allerdings treten Fermente des Körpers in Funktion; sie haben jedoch für die Tuberkulinreaktion nur eine negative Bedeutung, indem sie allmählich das Protoplasma der Tuberkelbacillen und auch die intakten

Versuch X.

	mg	Erstes Auftreten der Rötung an der Injektions- stelle nach Stunden	Art der Reaktion nach	
			24 Std.	48 Std.
Alt-tuber- kulin	1,0	6	$\overline{15}$	$\overline{20}$
	0,1	6	$\overline{17}$	$\overline{15}$
	0,01	10—12	$\overline{15}$	10
Vital-Tuber- kulin Eber	0,1	6	$\overline{15}$	$\overline{15}$
	0,01	6	$\overline{15}$	$\overline{10}$
	0,001	10—12	$\overline{10}$	$\overline{6}$
	0,0001	nachts	$\overline{8}$	fast 0
Bacillen- schwemmung Niere.	0,1	6	$\overline{17}$	$\overline{15}$
	0,01	6	$\overline{15}$	$\overline{10}$
	0,001	10—12	$\overline{10}$	$\overline{5}$
	0,0001	nachts	$\overline{8}$	$\overline{5}$

Tuberkelbacillen selbst zersetzen und abbauen. Es geschieht dies aber wahrscheinlich erst nach der Auslösung der Entzündung. So sahen wir, daß unter dem Einfluß von Pepsin die Tuberkulinwirkung bedeutend schwächer wurde, und daß sie nach Verdauung der Tuberkulinsubstanz durch Trypsin fast vollständig verschwand.

Wir werden uns die Tuberkulinwirkung als einen chemisch-physikalischen Vorgang vorstellen müssen. Durch den Einfluß der Tuberkuloseinfektion werden die Zellen des normalen Körpers aus ihrem Gleichgewicht gebracht und in einen allergischen Zustand übergeführt. Die Entstehung dieser Allergie ist nur durch die Einwirkung lebender, genügend virulenter Tuberkelbacillen möglich. Hierfür ist eine besondere Virulenzsubstanz der Tuberkelbacillen maßgebend, die in älteren Tuberkelbacillenkulturen und bei Abtötung der Tuberkelbacillen zugrunde geht. Abgetötete Tuberkelbacillen wirken nur noch durch das in ihnen enthaltene Tuberkulin und vermögen keine Immunisierung herbeizuführen, wie die Versuche von *Selter* (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 35, S. 233) bewiesen haben. Aber auch avirulent gewordene Tuberkelbacillen verhalten sich nicht anders wie aus noch nicht veröffentlichten Versuchen *Selters* mit Bacillen der 32. Gene-

ration des Stammes Eber hervorgeht. Sobald nun die allergischen Zellen eines Körpers mit neuen Protoplasmateilchen der Tuberkelbacillen in molekularer oder gröberer Verteilung, ja selbst mit erhaltenen Bacillen in Berührung kommen, findet eine Beeinflussung der Körperzellen in physikalisch-chemischem Sinne statt, welche die Zellen noch weiter von ihrem normalen Zustand entfernt und bei ihnen Entzündung veranlaßt, bei stärkster Einwirkung sie sogar in einen nekrotischen Zustand versetzt. Es wird noch angestrengtester Arbeit bedürfen, um die Wege dieser Beeinflussung der Zellen durch die einwirkenden Stoffe der Tuberkelbacillen aufzudecken. Die vorliegenden Untersuchungen sind nur ein kleiner Beitrag hierfür und sollen in erster Linie veranlassen, ältere hindernde Anschauungen beiseite zu stellen und die Lage klarer zu übersehen. Dazu erscheint uns auch die Erkennung des gemeinsamen Faktors in den verschiedenen Tuberkulinen von Wert zu sein.