

## Kochkoaguliertes Serum als Präcipitinogen.

Von

Dr. med. Kyoyetsuro Fujiwara.

(Aus dem Gerichtlich-medizinischen Institut der Kaiserlichen Universität Kyushu, Japan [Direktor: Prof. Dr. *Masao Takayama*].)

Manche Lehrbücher lehren uns, daß man in der forensischen Praxis der Blutunterscheidung mittels der Präcipitinreaktion hochwirksames und zwar mindestens 1:10000—20000 wertiges Antiserum benutzen muß. Doch ist es in Wahrheit sehr schwer, durch die Behandlung des Kaninchens mit genuinem Serum resp. Blut so hochwertiges Antiserum zu gewinnen.

Neuerdings habe ich zufällig entdeckt, daß wir durch Injektion des (z.B. durch Hitze) denaturierten Serums hochwirksames Antiserum gewinnen können. Es sei mir gestattet hier mein Verfahren kurz mitzuteilen.

Als Injektionsmaterial empfiehlt es sich, kochkoaguliertes Serum-eiweiß zu nehmen. Man verdünnt das Serum mit dem 10fachen Volumen aqua destillata, fügt  $\frac{1}{5}$  Volumen gesättigter Kochsalzlösung und einige Tropfen Essigsäure hinzu, und kocht das Ganze auf dem siedenden Wasserbad, bis das Eiweiß vollständig koaguliert. Nach dem Abkühlen wird das Eiweiß auf dem Filter gesammelt, durch Drücken in der Schicht des Filterpapiers entwässert und dann in Toluol aufbewahrt. Zur Injektion bringen wir ein ungefähr reiskorngroßes Stück des koagulierten Eiweißes (ca. 0,02 g) in einen kleinen Mörser, und fügen 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung unter Reiben mit dem Stößel tropfenweise hinzu. Wir können dadurch eine gleichmäßig feine Aufschwemmung bekommen. Diese feine Eiweißaufschwemmung wird in die Ohrvene des Kaninchens zehnmal, an jedem 2. oder 3. Tage eingespritzt. Eine Woche nach der letzten Injektion wird eine Probeentnahme und eine Probeuntersuchung ausgeführt. Falls sich das Blutserum als hochwertig erweist, wird eine genügende Menge Blut (10 bis 20 ccm, sogar bis 40—50 ccm) aus der Carotis oder Ohrvene entnommen, und aus diesem Blut das Serum gewonnen. Da unsere Eiweißaufschwemmung sehr fein ist, können wir die Injektion ausführen, ohne befürchten zu müssen, daß wir das Tier durch Gefäßverstopfung verlieren könnten. Aber es ist ratsam, die Injektion nur in das vollständig gefüllte Gefäß auszuführen, und nach der Injektion die eingeführte Flüssigkeit zentralwärts zu drängen. Zurückbleibendes Material an der Injektionsstelle erschwert die weiteren Injektionen durch die lokale Gefäßverstopfung. Nach der Blutentnahme können wir das Tier durch sofortige intravenöse oder

intraperitoneale Infusion physiologischer Kochsalzlösung am Leben erhalten, und später durch weitere Injektionen wieder Immunsereum gewinnen.

Die Wertigkeit des durch mein Verfahren gewonnenen Präcipitinsereums ist aus Tabelle 1 und die Spezifität aus Tabelle 2 ersichtlich.

Wie aus diesen beiden Tabellen hervorgeht, ist die Wertigkeit des Antisereums immer 1 : 20 000—50 000 oder darüber. Also ist der Titer dieses Präcipitinsereums höher als der des mit genuinem Serum gebildeten, wobei die Spezifität die gleiche geblieben ist.

Tabelle I.

Nummer	Kaninchenkörpergewicht	Injektionsmaterial	Injektionsdosis (gr.)	Injektionsweise	Abstände jeder Injektion	Injektionsmal	Zwischenraum von letzter Injektion bis zur Blutentnahme (Tage)	Wertigkeit des Präcipitinsereums
1	2350	Kochkoaguliertes Menschenserum	0,02	Intravenös	2 Tage	10	8	1: 50000
2	2520	„	„	„	3 Tage	10	7	1: 50000
3	2340	„	„	„	2 Tage	10	7	1: 20000
4	2770	„	„	„	2 Tage	10	8	1: 50000
5	1630	„	„	„	2 Tage	10	10	1: 100000
6	2000	„	„	„	2 Tage	10	10	1: 50000
7	2000	„	0,05	„	2 Tage	7	8	1: 50000
8	1700	„	0,08	„	2 Tage	10	8	1: 50000
9	3500	„	0,1	„	3 Tage	5	7	1: 10000
10	2085	„	0,1	„	2 Tage	5	8	1: 50000
Kontroll 1	2240	Menschen-serum	2,0 ccm	„	2 Tage	4	7	1: 10000
Kontroll 2	2010	„	2,0 ccm	„	3 Tage	4	7	1: 10000
Kontroll 3	2100	„	2,5 ccm	„	2 Tage	4	7	1: 10000

Tabelle II.

Präcipitinsereum Nr.	Konzentrationen	Präcipitinsereum Arten							Kaninchen
		Menschen	Affe	Rind	Hammel	Pferd	Hund	Katze	
1	1: 10	+							
	1: 100	+							
	1: 1000	+							
	1: 10000	+							
	1: 20000	+							
	1: 50000	+							
2	1: 10	+( 5 Min.)		-	-	±	-	-	-
	1: 100	+( 5 Min.)		-	-	+	-	-	-
	1: 1000	+( 5 Min.)		-	-	-	-	-	-
	1: 10000	+(10 Min.)		-	-	-	-	-	-
	1: 20000	+(15 Min.)		-	-	-	-	-	-
	1: 50000	+( 1 Std.)		-	-	-	-	-	-
3	1: 10	+( 5 Min.)	+(15 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 100	+( 5 Min.)	+(15 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 1000	+( 5 Min.)	+(20 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 10000	+(10 Min.)	-	-	-	-	-	-	-
	1: 20000	+(15 Min.)	-	-	-	-	-	-	-
	1: 50000	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung der Tabelle II S. 564.

Tabelle II (Fortsetzung).

Präcipitin- serum Nr.	Konzentrationen	Präcipitogeneserum Arten							
		Menschen	Affe	Rind	Hammel	Pferd	Hund	Katze	Kanin- chen
4	1: 10	+( 5 Min.)	+(10 Min.)	-		±	-	+(30 Min.)	-
	1: 100	+( 5 Min.)	+(10 Min.)	-		±(2Std.)	-	+( 2 Std.)	-
	1: 1000	+( 5 Min.)	+(10 Min.)	-		-	-	-	-
	1: 10000	+(10 Min.)	+( 1 Std.)	-		-	-	-	-
	1: 20000	+(30 Min.)	+( 1 Std.)	-		-	-	-	-
	1: 50000	+( 1 Std.)	-	-		-	-	-	-
5	1: 10	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	±		-	-	±	-
	1: 100	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	±(30 Min.)		-	-	±	-
	1: 1000	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	+( 2 Std.)	-	-	-	+( 2 Std.)	-
	1: 10000	+( 5 Min.)	+(10 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 20000	+(15 Min.)	+( 1 Std.)	-	-	-	-	-	-
	1: 50000	+(15 Min.)	-	-	-	-	-	-	-
6	1: 100000	+( 1 Std.)	-	-	-	-	-	-	-
	1: 10	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 100	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 1000	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 10000	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-	-	-	-	-	-
	1: 20000	+(15 Min.)	+( 1 Std.)	-	-	-	-	-	-
7	1: 50000	+( 1 Std.)	-	-	-	-	-	-	-
	1: 10	+( 5 Min.)	+( 1 Std.)	-		-	+( 1 Std.)	+( 1 Std.)	-
	1: 100	+( 5 Min.)	+(30 Min.)	-		-	-	-	-
	1: 1000	+(15 Min.)	+(30 Min.)	-		-	-	-	-
	1: 10000	+(30 Min.)	+( 1 Std.)	-		-	-	-	-
	1: 20000	+( 1 Std.)	+( 2 Std.)	-		-	-	-	-
8	1: 50000	+( 2 Std.)	-	-		-	-	-	-
	1: 10	+							
	1: 100	+							
	1: 1000	+							
	1: 10000	+							
	1: 20000	+							
9	1: 50000	+							
	1: 10	+		-	-	-	+( 1 Std.)	-	-
	1: 100	+		-	-	-	-	-	-
	1: 1000	+		-	-	-	-	-	-
	1: 10000	+		-	-	-	-	-	-
	1: 20000	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1: 10	+(10 Min.)	+( 1 Std.)	-	-	-	+(15 Min.)	+( 1 Std.)	-
	1: 100	+(15 Min.)	+(30 Min.)	-	-	-	+	-	-
	1: 1000	+(15 Min.)	+(30 Min.)	-	-	-	+	-	-
	1: 10000	+(30 Min.)	+( 1 Std.)	-	-	-	-	-	-
	1: 20000	+( 1 Std.)	-	-	-	-	-	-	-
	1: 50000	+( 2 Std.)	-	-	-	-	-	-	-
Kontrolle 1	1: 10	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)			+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-
	1: 100	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	+( 1 Std.)			+(10 Min.)	+(15 Min.)	-
	1: 1000	+(15 Min.)	+(30 Min.)	-			-	-	-
	1: 10000	+( 1 Std.)	+( 2 Std.)	-			-	-	-
	1: 20000	-	-	-			-	-	-
	1: 50000	-	-	-			-	-	-
Kontrolle 2	1: 10	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)			+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-
	1: 100	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	+(15 Min.)			+(10 Min.)	-	-
	1: 1000	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-			-	-	-
	1: 10000	+( 1 Std.)	+( 1 Std.)	-			-	-	-
	1: 20000	-	-	-			-	-	-
	1: 50000	-	-	-			-	-	-
Kontrolle 3	1: 10	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	+( 5 Min.)			+( 5 Min.)	+( 5 Min.)	-
	1: 100	+(15 Min.)	+(10 Min.)	+(30 Min.)			+(30 Min.)	+(30 Min.)	-
	1: 1000	+(15 Min.)	+(30 Min.)	-			-	-	-
	1: 10000	+( 1 Std.)	-	-			-	-	-
	1: 20000	-	-	-			-	-	-
	1: 50000	-	-	-			-	-	-

Wenn man die Injektionsdosis weiter (z. B. bis 0,5 g) vermehrt, dann kann man schon durch fünfmalige Injektionen hochwertiges Antiserum erhalten. Aber dabei geht das Tier sehr oft unter Vergiftungserscheinungen zugrunde.

Bei der Präcipitinreaktion mittels dieses Antiserums, sieht es aus, als ob das Volumen des Präzipitates relativ gering sei, doch fällt der Reaktionsring sehr scharf aus und die Spezifität der Reaktion übertrifft die andere. Außerdem können wir die Immunisierung mit kleiner Menge des Injektionsmaterials resp. Serums (im ganzen 0,2 g koaguliertes Serum-eiweiß, d. h. 2,0 ccm genuinen Serums) ausführen.

Anstatt dieses kochkoagulierten Serumeiweißes kann man auch durch Injektion des sonstwie denaturierten Eiweißes, z. B. getrockneten Serumpulvers, ebenso gutes Antiserum gewinnen, aber in diesen Fällen stirbt das Tier oftmals an Gefäßverstopfung.

Es ist sehr interessant, daß ein Tier, das einmal mit solchem denaturierten Serum behandelt worden ist, nachher durch Injektion des genuinen Serums immer hochwertiges Präcipitins serum liefern kann. Die Ursache, warum das Kaninchen durch Injektion des denaturierten Serums hochwertigeres Serum als durch die des genuinen Serums liefern kann, ist noch nicht ganz klar. Ich möchte sie in weiterer Forschung feststellen.

#### *Zusammenfassung:*

1. Als Präzipitinogen ist das denaturierte resp. kochkoagulierte Serum wirksamer als genuines Serum. Daher möchte ich empfehlen, jenes als Injektionsmaterial in der Praxis der forensischen Blutuntersuchung zu benutzen.

2. Das kochkoagulierte Serum können wir in folgender Weise bereiten: man verdünnt das Serum mit zehnfachem Volumen aqua destillata, fügt  $\frac{1}{5}$  Volumen gesättigter Kochsalzlösung und einige Tropfen Essigsäure hinzu und kocht das Ganze auf dem siedenden Wasserbad, bis das Eiweiß vollständig koaguliert. Nach dem Abkühlen wird das Eiweiß auf dem Filter gesammelt, durch Drücken in der Schicht des Filterpapiers entwässert und dann in Toluol aufbewahrt.

3. Zur Injektion tun wir ein ungefähr reiskorngroßes Stück des koagulierten Eiweißes (ca. 0,02 g) in einen Mörser und fügen 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung unter Reiben tropfenweise hinzu. Wir erhalten dadurch eine gleichmäßig feine Aufschwemmung. Diese feine Eiweißaufschwemmung wird in die Ohrvene des Kaninchens zehnmal jeden 2. oder 3. Tag injiziert.

4. Das Antiserum, das durch diese Methode gewonnen ist, ist im allgemeinen hochwertiger und artspezifischer als die anderen Antiseren. Die Wertigkeit des Serums ist meist über 1 : 20 000.

5. Außerdem hat diese Methode den Vorteil, daß man bei ihrem Verfahren mit kleiner Menge des Antigens die Immunisierung ausführen kann, und daß das Antigen lange Zeit haltbar ist.