

(Aus dem Gerichtlich-medizinischen Institut der medizinischen Fakultät zu Niigata, Japan.)

## Die Serum- und Hämoglobinpräcipitinreaktion in der Praxis der gerichtlich-medizinischen Blutuntersuchung.

Von  
Prof. Dr. K. Fujiwara.

Die Unterscheidung von Menschen- und Tierblut ist eine unserer wichtigsten Aufgaben. Zu diesem Zwecke kommt hauptsächlich die Präcipitinreaktion, insbesondere die Serumpräcipitinreaktion in Anwendung. Bekanntlich besteht das Blut neben dem Serum oder Plasma aus den Erythrocyten, d. h. aus Hämoglobin; man könnte daher auf den Gedanken kommen, daß man bei der Präcipitinreaktion anstatt des Serums die Erythrocyten, d. h. den Blutfarbstoff, als Antigen anwenden könnte. Über die Möglichkeit dieser Erythrocyten-, d. h. Hämoglobinpräcipitinreaktion haben mehrere Forscher Untersuchungen angestellt. *Leblanc, Demees, Ide, Klein, Leers* u. a. haben durch Injektion des Blutfarbstoffes die Bildung von Präcipitin festgestellt, welches Präcipitin von *Klein* als „Erythropräcipitin“ bezeichnet wurde. *Bordet, Schmidt* und *Bennet* u. a. haben dann diesen Befund in Abrede gestellt, aber auch ich habe 1920 schon mitteilen können, das ich durch 5mal umkristallisierte Pferdehämoglobinkristalle und -hämoglobinlösung hochwertiges Präcipitin erhalten habe. Da danach auch *Heidelberger* und *Landsteiner, Higashi, Tsukasaki, Hektoen* und *Schulhof, Misao, Ishikawa* und *Sakurabayashi, Fukamachi* u. a. berichtet haben, daß sie durch Hämoglobinkristalle und -lösung Präcipitin gewonnen haben, so steht wohl nunmehr außer Zweifel, daß durch Immunisierung mit Hämoglobin Präcipitin entsteht.

*Leers* war es, der die Anwendung des durch Hämoglobininjektion erhaltenen Präcipitins zu forensischen Zwecken vorgeschlagen hat.

Er hat die zur Immunisierung erforderlichen Erythrocytenextrakte in der folgenden Weise hergestellt: Eine bestimmte Menge möglichst frischen und mit sterilen Gefäßen aus dem Herzen entnommenen defibrinierten Leichenblutes wird mit der 10fachen Menge 0,85proz. Kochsalzlösung versetzt und die Blutkörperchen in der Zentrifuge serumfrei gewaschen. Diese Waschungen werden so oft wieder-

holt, bis die Waschflüssigkeit völlig eiweißfrei ist (Ferricyankali und biologische Probe). Nach Abpipettieren und Absaugen des letzten Restes mittels Fließpapier werden diese dimantierten Blutkörperchen in der 3—4fachen Menge destillierten Wassers unter Schütteln gelöst, die Lösung durch Zusatz von 8,5proz. Kochsalzlösung im Verhältnis 9:1 auf physiologischen Gehalt gebracht und lange und stark zentrifugiert. Der Extrakt muß absolut klar und stromafrei sein. Die Kaninchen erhielten davon je 20 ccm intraperitoneal in Abständen von 1—3 Wochen, je nach ihrem körperlichen Befinden, oder 2,0 ccm wöchentlich intravenös.

Die so erhaltenen Antisera wurden an den zur Einspritzung benutzten Extrakten auf Wertigkeit, Art- und Organspezifität geprüft; weiter wurde an hämoglobinfreiem Blutserum, an Sperma und eitrigem Sputum sowie an zahlreichen aus Tierblut und forensischen Objekten bereiteten Extrakten und an zahlreichen Kontrollen die Art- und Organspezifität dieser Antisera erwiesen und dadurch sicher festgestellt, daß sie in der forensischen Praxis verwendbar sind.

Danach hat sich niemand mehr — ich weiß nicht, warum eigentlich — mit dieser Frage beschäftigt. Vielleicht liegt das daran, daß *Leers* die Bildung des Antiserums als mit großen Schwierigkeiten verbunden erklärte, und daß für die praktische Blutuntersuchung die Serumpräcipitinreaktion vollkommen ausreichte.

1921 empfahl wieder *Higashi* durch dieses aus dem Blutfarbstoff erhaltene Präcipitin die Blutdifferenzierung vorzunehmen, wobei er *Leers* Ansichten bestätigte. Auch *Hektoen* und *Schulhof* gelangten zu demselben Resultate. Es fragt sich nun, welches von den beiden Präcipitinen, Erythro- oder Serumpräcipitin, für die Unterscheidung von Blutspuren das geeignetere ist.

Bei einem Vergleich der beiden Methoden in ihren Vor- und Nachteilen haben wir die folgenden 4 Punkte zu berücksichtigen: 1. Welchem von den beiden kommt die größere Artspezifität zu? 2. Welches ist bezüglich der Organspezifität vorzuziehen? 3. Welches ist, am Blutextrakt untersucht, empfindlicher? 4. Welches liefert leichter hochwertiges Präcipitin? Zur Lösung dieser Fragen habe ich die nachfolgenden Versuche angestellt:

### I. Bildung des Antiserums.

Um bei einer Reihe von Kaninchen die Bedingungen möglichst konstant zu halten, habe ich je ein Paar Tiere vom gleichen Wurf ausgewählt, von denen das eine mit Menschenserum und das andere mit menschlichem Hämoglobin immunisiert wurde und dadurch von jedem Tier das entsprechende Antiserum erhalten. Das zur Immunisierung verwendete Menschenserum wurde im Verhältnis 9:1 mit 3proz. Carbol-säure-Kochsalz-Lösung versetzt und in der Eiskammer aufbewahrt, und die menschliche Hämoglobinlösung wurde so gewonnen, daß das Leichenblut oder der Blutkuchen zusammengepreßt, die Erythrocyten in einem graduierten Präcipitinröhrchen gesammelt, mit etwa dem zehnfachen an physiologischer Kochsalzlösung versetzt und dann die Flüssig-

keit durch Zentrifugieren abgetrennt wurden, die abgesetzten Niederschläge wurden gesammelt, aufs neue physiologische Kochsalzlösung hinzugesetzt, das Ganze wieder zentrifugiert und die Flüssigkeit zum Abscheiden stehengelassen. Dieses Verfahren wurde 5—6mal wiederholt, bis die obenstehende klare Flüssigkeit auch mit Antiserum gegen menschliches Serum keine Präcipitinreaktion mehr zeigte. Das Erythrocytenvolum ist dann an der Skala am Niederschlagsröhrchen ablesbar, es wird durch Zusatz des 17fachen Volums von Aq. dest. lackfarben. Dann werden 2 ccm 8,5proz. Kochsalzlösung hinzugesetzt und mit destilliertem Wasser auf das Gesamtvolum von 20 ccm aufgefüllt, worauf durch tüchtiges Zentrifugieren die Flüssigkeit vom Bodensatz abgetrennt wird. Die so hergestellte Lösung wird als 5proz. Hämoglobinlösung bezeichnet. Diese Hämoglobinlösung wird im *Faust-Heimschen* Trockenschrank oder Exsiccator getrocknet, dann je 0,5 ccm davon in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst, welche Lösung wir als 5proz. Lösung von menschlichem Hämoglobin bezeichnen.

Kaninchen 14. Männlich, 2270 g. Dem Tiere wurden 3mal je 2 ccm Menschenserum in die Ohrvene injiziert. Eine Woche nach der letzten Injektion wurde das Blut entnommen, von dem das Serum zur Ausscheidung gebracht wurde. Antiserum Nr. 14.

Kaninchen 15. Weiblich, 1700 g. Dem Tiere wurden je 4 ccm 5proz. Hämoglobinlösung aus Menschenblut 3mal in die Ohrvene injiziert. Eine Woche nach der letzten Injektion erfolgte die Entnahme des Blutes, aus welchem sich das Serum ausschied. Antiserum Nr. 15.

Kaninchen 16. Männlich, 1830 g. Das Tier bekam je 3 ccm 5proz. Hämoglobinlösung aus Menschenblut 9mal in die Ohrvene injiziert. Eine Woche nach der letzten Injektion erfolgte die Blutentnahme. Daraus wurde das Serum isoliert. Antiserum Nr. 16.

Kaninchen 19. Männlich, 2220 g. Diesem Kaninchen injizierte ich 4mal je 2 ccm Menschenserum in die Ohrvenen. Aus dem 1 Woche später entnommenen Blut erhielt ich das Antiserum Nr. 19.

Kaninchen 20. Weiblich, 1980 g. Dem Tier wurden je 5 ccm 5proz. Hämoglobinlösung aus Menschenblut 5mal in Intervallen von 3 Tagen injiziert, 10 Tage darauf noch einmal und 4 Tage später noch ein letztes Mal; 10 Tage darauf Blutentnahme. Antiserum Nr. 20.

Kaninchen 21. Weiblich, 2100 g. Bei diesem Tiere erfolgte die Behandlung mit je 2 ccm Menschenserum in der gleichen Weise wie bei dem letzteren. 10 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut entnommen. Antiserum Nr. 21.

Kaninchen 22. Männlich, 1820 g. Diesem Kaninchen wurden je 5 ccm 5proz. Hämoglobinlösung aus Menschenblut aller 3 Tage 6mal in die Ohrvene injiziert, 10 Tage danach das Blut entnommen und daraus das Serum isoliert. Antiserum Nr. 22.

Kaninchen 23. Männlich, 1780 g. Bei diesem Tier erfolgte die nämliche Behandlung wie bei dem vorhergehenden, bei Injektion von 2 ccm Menschenserum. Antiserum Nr. 23.

Kaninchen 24. Männlich, 1900 g. Dem Tiere wurden 6mal in Intervallen von 3—4 Tagen 2 ccm Menschenserum in die Ohrvene injiziert. 10 Tage nach der letzten Injektion geschah die Blutentnahme, an welche sich die Ausscheidung des Serums anschloß. Antiserum Nr. 24.

Kaninchen 25. Männlich, 2400 g. Mit je 5 ccm 5proz. Hämoglobininlösung aus Menschenblut wurde das Tier ganz auf dieselbe Weise wie Nr. 24 behandelt. 10 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Blutentnahme und Serumabscheidung. Antiserum Nr. 25.

Kaninchen 27. Männlich, 1730 g. Diesem Tiere wurden aller 3 Tage 5 mal je 2 ccm Menschenserum in die Ohrvene injiziert. 8 Tage darauf wurde das Blut entnommen und das Serum zur Ausscheidung gebracht. Antiserum Nr. 27.

Kaninchen 28. Männlich, 2160 g. Es wurden Tiere je 5 ccm 5proz. Hämoglobininlösung aus Menschenblut 7 mal in die Ohrvene eingespritzt und 8 Tage darauf das Blut entnommen, daraus die Isolierung des Serums erfolgte. Antiserum Nr. 28.

Kaninchen 30. Männlich, 2120 g. Bei diesem Tiere wurden 10malige intravenöse Injektionen von Menschenserum zu je 2 ccm ausgeführt und 8 Tage nach der letzten Injektion die Blutentnahme vorgenommen. Das Serum daraus ist Antiserum Nr. 30.

Kaninchen 31. Männlich, 1560 g. Es erfolgten 5malige intravenöse Injektionen zu je 2 ccm Menschenserum und 8 Tage nach der letzten Injektion die Blutentnahme. Aus dem Serum erhielt ich das Antiserum Nr. 31.

Kaninchen 32. Männlich, 1900 g. Je 5 ccm 5proz. Menschenhämoglobininlösung wurden 5 mal in Intervallen von 3—4 Tagen intraabdominal injiziert und 8 Tage danach das Blut entnommen, daraus wurde erhalten das Antiserum Nr. 32.

Kaninchen 33. Männlich 1950 g. Das Tier erhielt 9mal eine 5proz. Lösung von menschlichem Hämoglobin zu je 5 ccm in Intervallen von 3—8 Tagen intraabdominal; 8 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Blutentnahme und Serumabscheidung. Antiserum Nr. 33.

Kaninchen 34. Männlich, 2600 g. Diesem Tier injizierte ich 5 mal dieselbe Lösung wie dem vorhergehenden alle 3—4 Tage intraabdominal. 8 Tage nach der letzten Injektion erfolgte Blutentnahme und Isolierung des Serums. Antiserum Nr. 34.

Von diesen immunisierten Tieren waren Nr. 14 und 15, Nr. 16 und 19, Nr. 20 und 21, Nr. 22 und 23, Nr. 24 und 25, Nr. 27 und 28, Nr. 30 und 33 vom gleichen Wurfe.

## II. Präzipitinreaktion.

Von den oben gewonnenen Antisera — Nr. 14, 16, 19, 25, 27, 28, 30 und 35 — habe ich durch Ringprobe die Präzipitinreaktion, die Empfindlichkeit und Spezifität untersucht. Vor allem wurde mit menschlichem Vollblut, Serum und Hämoglobin in Lösung ihre Empfindlichkeit festgestellt. Die Ergebnisse sind die folgenden (s. Tab. 1).

Es ergibt sich aus meinen Untersuchungen mit menschlichem Vollblut außer bei Nr. 21, 30, 15 und 34 immer bis zur 200fachen Verdünnung Präzipitinreaktion, und bei den 3 Antisera Nr. 21, 30 und 15 stieg die letztere bis auf die 10000fache Verdünnung und bei Nr. 34 bis auf die 50000fache Verdünnung. Es folgt daraus, daß im großen und ganzen dem Kaninchenantiserum, dessen Antigen menschliches Serum ist, und einem solchen, dessen Antigen menschliches Hämoglobin ist, in der Präzipitinreaktion fast gleich starke Wirkung zukommt.

In der Praxis der gerichtlich-medizinischen Untersuchung kommen als Objekt der Unterscheidung die an Gegenständen anhaftenden Blut-

Tabelle I. *Empfindlichkeit.*

	Nr.	Menschliches Vollblut	Menschen-serum	Menschliche Hämoglobinlösung
Serum-präcipitin	14	20 000	40 000	100
	19	20 000	20 000	1 000
	21	10 000	20 000	—
	23	20 000	40 000	—
	24	20 000	10 000	1 000
	27	20 000	20 000	100
	30	10 000	20 000	200
	31	20 000	20 000	400
Hämo-globin-präcipitin	15	10 000	100	10 000
	16	20 000	—	40 000
	20	20 000	200	20 000
	22	20 000	200	40 000
	25	20 000	—	40 000
	28	20 000	100	40 000
	32	20 000	100	40 000
	33	20 000	100	40 000
34	40 000	100	40 000	

spuren häufiger vor als frisches Blut. Man darf also bei Vergleich der Empfindlichkeit des Serumpräcipitins mit der des Hämoglobinpräcipitins nicht außer acht lassen, die Untersuchung auch auf Extraktlösung aus Blutspuren auszudehnen, denn Serum und Hämoglobin lassen sich nicht in gleichem Umfange extrahieren. Ich habe deshalb mit den nachstehenden Ergebnissen 5 Blutspuren untersucht, die wie folgt entstanden waren:

1. Blutspuren, die ich dadurch erhielt, daß ich auf einen Baumwollappen 1 Tropfen menschlichen Blutes auftröpfeln und im Zimmer trocknen ließ.

2. Spuren menschlichen Blutes, die ich 1 $\frac{1}{2}$  Jahre vorher bei einer Operation erhalten und in Gaze aufbewahrt hatte.

3. Spuren von Herzblut von einem Patienten, der vor 13 Jahren an Shock verstorben war, und welche ich in Gaze aufbewahrt hatte.

4. Blutspuren von dem Blute eines nach Injektion von Elektroargol (Kolloidsilber) Verstorbenen, die ich in einem Baumwollappen aufbewahrt hatte.

5. Blutspuren aus dem Herzblut eines Ersticken, die ich in einem Baumwollappen aufbewahrt hatte.

Aus diesen Baumwollappen oder Gazestreifen schnitt ich ein Stückchen heraus, extrahierte 24 Stunden lang mit einer bestimmten Menge Kochsalzlösung und stellte dann an diesen Extrakten nach Verdünnung auf das 2-, 5-, 10-, 20-, 50- und 100fache meine Untersuchungen an. Die Blutkonzentration war also nicht in allen Lösungen dieselbe.

Die Untersuchungen sind, wie die Tab. 2 zeigt, sowohl für das Hämoglobin- als auch für das Serumpräcipitin fast gleich ausgefallen, nur daß bei den Blutspuren 4 das letztere und bei den Blutspuren 5 das erstere empfindlicher war, was meines Erachtens darauf zurückzuführen ist, daß das Verhältnis des Serums bei den beiden Blutarten ein verschiedenes war. Es geht hieraus hervor, daß manchmal bei der Blutunterscheidung, wenn die Blutspuren nur gering sind, also nur eine dünne Auszugslösung zu erhalten ist, die Reaktion mit Blutfarbstoff- oder Serumpräcipitin allein nicht gelingt. Es muß meines Erachtens in einem solchen Falle die Präcipitinreaktion mit beiden Präcipitinen angewendet werden

Tabelle 2. *Extrakt von Blutflecken.*

	Nr.	Menschenblut	Blutflecke I.	Blutflecke II.	Blutflecke III.	Blutflecke IV.	Blutflecke V.
Serumpräcipitin	14	20 000	500	200	200	20	100
	19	20 000	100	100	50	10	200
	21	10 000	100	200	200	20	200
	23	20 000	200	200	200	20	500
	24	20 000	50	100	200	10	200
	27	20 000	1000	200	200	20	500
	30	10 000	200	200	200	20	200
	31	20 000	100	50	200	50	200
Hämoglobinpräcipitin	15	10 000	200	100	10	20	100
	16	20 000	200	200	20	200	200
	20	20 000	200	200	20	50	200
	22	20 000	500	200	20	100	200
	25	20 000	1000	200	200	100	1000
	28	20 000	1000	200	50	200	500
	32	20 000	500	200	20	100	100
	33	20 000	200	100	20	100	200
	34	50 000	1000	200	50	200	500

Weiter fragt es sich dann, ob das Serum- oder das Hämoglobinpräcipitin höhere spezifische Wirkung entfalten. *Leers*, *Highashi*, *Heidelberger* und *Landsteiner* u. a. geben an, daß das letztere organspezifisch und mehr artspezifisch sei als das erstere, *Hektoen* und *Schulhof* sagen, daß das Serum- ebenso wie das Hämoglobinpräcipitin hinreichend spezifisch ist, während nach *Misao* das letztere in der Organspezifität (chemische Spezifität), das erstere aber in der Artspezifität überlegen sei. Um die Frage der höheren Artspezifität zu entscheiden, habe ich mit dem Blute von Affen, Hunden, Hammeln, Schweinen, Hühnern, Katzen usw. Versuche angestellt, deren Ergebnisse in der Tab. 3 zusammengestellt sind.

Der Titer der Präcipitine erreichte, wie die Tabelle zeigt, immer 10000—40000fache Verdünnung, beim Hämoglobinpräcipitin zeigte sich aber außer beim Affen fast gar keine Reaktion, nur daß die Nr. 25

Tabelle 3. Vollblut (Artspezifität).

	Nr.	Menschliches Vollblut	Menschen-serum	Menschliche Hämoglobulin-Lösung	Affenblut	Rinderblut	Hundsblut	Katzenblut	Schweineblut	Hammelblut	Hühnerblut
Serumpräcipitin	14	20 000	40 000	100	—	100	—	500	500	—	—
	19	20 000	20 000	1000	10 000	100	—	1000	1000	500	—
	21	10 000	20 000	—	10 000	100	1000	1000	500	500	50
	23	20 000	40 000	—	20 000	1000	5000	2000	500	1000	—
	24	20 000	10 000	1 000	10 000	1000	—	1000	100	—	—
	27	20 000	20 000	100	2 000	—	100	—	200	10	—
	30	10 000	20 000	200	2 000	100	50	1000	1000	50	—
	31	20 000	20 000	400	2 000	—	100	—	200	200	—
Hämoglobinpräcipitin	15	10 000	100	10 000	—	—	—	—	—	—	—
	16	20 000	—	40 000	20 000	—	—	—	—	—	—
	20	20 000	200	20 000	5 000	—	—	—	—	—	—
	22	20 000	200	40 000	10 000	—	—	—	—	—	—
	25	20 000	—	40 000	20 000	—	50	—	100	100	—
	28	20 000	100	40 000	5 000	—	—	—	—	—	—
	32	20 000	100	40 000	10 000	—	100	—	—	—	—
	33	20 000	100	40 000	2 000	—	—	—	—	—	—
34	40 000	100	40 000	20 000	—	—	—	—	—	—	

und 32 gegen Hunde-, Schweine-, Hammelblut usw. positiven Ausfall ergaben. Beim Serumpräcipitin fiel dagegen das Blut fast aller Tiere, außer dem von Hühnern, positiv aus, und zwar, wenn auch bei einigen nur schwach, manchmal doch bis zur 500—1000fachen Verdünnung. Diese Resultate lassen erkennen, daß das Hämoglobinpräcipitin, wenn es auch nicht als vollkommen artspezifisch zu bezeichnen ist, bei weitem spezifischer ist als das Serumpräcipitin.

Zum Vergleich der Organspezifität der beiden Präcipitine habe ich die Stärke von deren Reaktion an Ascites- und Hydrocele-Flüssigkeit, Pleuritisexsudat, Sperma, Nasenschleim, Schweiß, Speichel, Harn usw. untersucht und gebe die Ergebnisse in der Tab. 4 wieder.

Beim Hämoglobinpräcipitin fiel die Reaktion gegen das entsprechende Antigen, das Hämoglobin, bis gegen das 10000—40000fache, aber gegen das Serum nur bis auf das 100—200fache positiv aus. Ferner fiel die Reaktion beim Antiserum Nr. 20 gegen die Ascitesflüssigkeit bis zu 100facher, beim Antiserum Nr. 25 gegen den Speichel ebenfalls bis zu 100facher Verdünnung positiv aus, aber in den anderen Fällen zeigte sich fast keine Reaktion. Dagegen fiel beim Serumpräcipitin die Reaktion nicht nur gegen das Serum positiv aus, sondern auch gegen die Hämoglobinlösung bis zu 100—1000facher, gegen die Ascitesflüssigkeit bis zu 500—1000facher, gegen die Hydroceleflüssigkeit fast bis zu gleicher Stärke mit dem Serum, gegen das Pleuritisexsudat bis zu 50000 bis 100000facher, gegen das Sperma bis zu 500facher und gegen den

Tabelle 4. Körperflüssigkeit (Organspezifität).

	Nr.	Ascitesflüssigkeit Nr. 1	Ascitesflüssigkeit Nr. 2	Hydroceleflüssigkeit Nr. 1	Hydroceleflüssigkeit Nr. 2	Pleuritische Flüssigkeit	Samen	Nasensekret	Schweiß	Speichel	Harn
Serumpräcipitin	14	1000	1000	20 000	20 000	10 000	500	—	10	10	konz.
	19	200	1000	10 000	10 000	5 000	500	—	10	100	„
	21	1000	1000	20 000	10 000	10 000	500	—	10	100	„
	23	1000	1000	20 000	20 000	5 000	500	—	10	100	konz.
	24	500	—	10 000	10 000	10 000	500	—	10	—	„
	27	500	1000	—	—	5 000	500	—	10	—	„
	30	500	2000	10 000	10 000	5 000	—	100	10	—	„
	31	500	500	—	—	5 000	500	—	10	200	—
Hämoglobinpräcipitin	15	—	—	—	—	—	—	—	10	—	—
	16	—	—	—	—	—	—	20	—	—	—
	20	100	100	—	—	—	—	—	10	—	—
	22	—	—	—	—	—	—	20	—	—	—
	25	—	—	—	—	—	konz.	—	10	100	—
	28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—	—	10	—	—
	33	—	—	—	—	—	—	10	—	—	—
	34	—	—	—	—	—	—	10	—	—	—

Speichel bis zu 100—200facher Verdünnung. Daraus ist ersichtlich, daß, während das Hämoglobinpräcipitin für das Hämoglobin fast spezifisch ist, das Serumpräcipitin, wenn auch mehr oder weniger verschieden, gegen fast alle Körpersäfte reagiert, insbesondere gegen die Hydroceleflüssigkeit, das Pleuritisexsudat usw. bis zu fast gleicher Verdünnung wie beim Serum reagiert.

Die obigen Untersuchungsergebnisse lassen sich dahin zusammenfassen, daß das Hämoglobin- und Serumpräcipitin in ihrer Empfindlichkeit fast gleich sind, daß aber das erstere sowohl in der Art- als auch in der Organspezifität dem letzteren überlegen ist.

Noch ein Wort über die Bildung des Hämoglobinpräcipitins. — Einige Autoren stellen die Präcipitinnatur des Blutfarbstoffes in Abrede, auch diejenigen, die sie anerkennen, scheinen sich darüber einig zu sein, daß sie schwach ist. *Leers* hat von 8 Immuntieren nur bei 3 starkes Antiserum erhalten, *Heidelberger* und *Landsteiner* unter 17 nur bei 3, bei anderen nur schwaches und wieder bei anderen nur ganz unwirksames. Ferner hat *Misao* unter 4 Immunkaninchen bei 3 eine schwache (0,007%) und bei einem keine Reaktion gesehen.

Zur Ermittlung derjenigen Menge Antigens, die zur Injektion notwendig ist, um das stärkste Präcipitinserum zu gewinnen, habe ich zuerst Rinderhämoglobin injiziert und damit die Präcipitinbildung untersucht:

Kaninchen-Nr.	Körpergewicht g	Injektionsmaterial Hämoglobinlösung %	Dosis ccm	Häufigkeit	Präzipitintiter.
4	2050	10	4	4 mal	10 000
5	1910	50	4	4 mal	20 000
6	1875	10	4	4 mal	50 000
12	2550	5	4	4 mal	100 000
13	2750	100	4	4 mal	1 000

Danach scheint also bei der Injektion einer zu großen Menge Antigen auf einmal die Präcipitinbildung nur schwer zu erfolgen. Selbstverständlich kann ich auf Grund von nur 5 Versuchen die ganze Frage nicht erledigen wollen, aber wenn ich hierzu noch die Erfahrung in einigen vorhergehenden Versuchen berücksichtige, in denen ich 4 Kaninchen 4—6 mal 5proz. Hämoglobinkristalllösung in die Ohrvene injizierte und dadurch immer ein Antiserum bekam, das bei der Reaktion mit aufs 50000fache und darüber verdünnter Hämoglobinlösung Niederschläge erzeugen konnte, so komme ich zu dem Schlusse, daß es wohl das beste ist, 3—5 ccm einer 5proz. Hämoglobinlösung als die vorteilhafteste Menge zu einmaliger Injektion auszuwählen. Ich bin deshalb auch diesmal in meinen Versuchen so verfahren und habe zuerst 4—5 mal in Intervallen von 3 Tagen die Injektion ausgeführt; eine Woche danach wurde das Blut entnommen, aus dem das Serum ausgeschieden wurde. Wenn das so gewonnene Serum keine oder nur schwache Reaktion zeigte, so wurde die Injektion an den Spendern wiederholt, wodurch ich zuletzt immer ein Antiserum mit 10000fachem Präcipitintiter erhalten konnte.

*Hektoen* und *Schulhof* berichten, daß das spezifische Präcipitin, wenn zunächst das Hämoglobinextrakt aller 3 Tage 5—6 mal in steigenden Mengen injiziert wird, 4—5 Tage nach der letzten Injektion im Blute in großen Mengen gebildet wird, daß aber bei ungenügend ausfallender Präcipitinreaktion, bei Wiederholung der Einspritzung 3 Tage lang in Intervallen von 3 Tagen, gute Resultate erzielt werden. Das scheint mir mit meinen Versuchen in Einklang zu stehen.

Nur scheint es mir von Bedeutung zu sein, daß man die jedesmalige Injektionsdosis nicht zu groß wählt, sondern zur Gewinnung eines hochwertigen Präcipitins erms die Zahl der Injektionen vermehrt. Wenn auch anfangs das erhaltene Präcipitin schwach ist, so erhält man doch während weiter wiederholter Injektionen schließlich ein hochwertiges Antiserum.

Als Injektionsmaterial dient am besten frische Hämoglobinlösung, da diese aber nicht immer zu beschaffen ist und außerdem die Herstellung einer großen Menge Hämoglobinkristalle aus Menschenblut mit Schwierigkeiten verbunden ist, so habe ich die Hämoglobinlösung nach dem Trocknen pulverisiert und dieses Pulver im Exsiccator aufbewahrt. Zum Gebrauch wird eine bestimmte Menge davon mit Kochsalzlösung

im Mörser zerrieben und so daraus ein Extrakt bereitet, das zur Injektion angewandt wird. Bei überaltertem Hämoglobin ist, da es schwer wasserlöslich ist und dadurch manchmal durch Embolie das Tier tötet, die abdominale Injektion zu empfehlen. Diese kann auch bei frischem Pulver fast immer gefahrlos angewendet werden. Auch in diesem Falle genügt eine Dosis von 5 ccm 5proz. Hämoglobinlösung zur einmaligen Injektion.

Jedenfalls ist das Ruhigstehenlassen oder einmalige Zentrifugieren zur Gewinnung des Serums völlig hinreichend; die Darstellung der Blutfarbstofflösung aber erfordert mehrmaliges Waschen mit Kochsalzlösung, weshalb sie umständlicher ist als die Gewinnung des Serums. Da das Hämoglobin aber aus Leichenblut oder dem Blutkuchen des zur WaR. benützten Blutes leicht isoliert werden kann, so steht dieses Material hinlänglich zur Verfügung.

#### *Zusammenfassung.*

Die oben geschilderten Resultate fasse ich kurz wie folgt zusammen:

1. Das Hämoglobinpräcipitin bildet sich zwar etwas schwerer als das Serumpräcipitin, liefert aber bei längerdauernder Immunisierung der Tiere schließlich ein ebenso empfindliches und hochwertiges Präcipitin wie es das Serumpräcipitin ist.

2. Bei der Ausführung der Präcipitinreaktion mit dem auf die weiter oben beschriebene Weise erhaltenen gleichwertigen Hämoglobin- und Serumpräcipitin zeigt es sich, daß das erstere sowohl was die Art- als auch was die Organspezifität angeht, das letztere übertrifft.

3. Bei der Blutunterscheidung kann die Hämoglobin- anstatt der Serumpräcipitinreaktion angewendet werden. Bei der Bereitung der Extraktlösungen aus Blutspuren löst sich jedoch bald der Blutfarbstoff mehr als das Serum, bald aber ist es umgekehrt; es empfiehlt sich daher, die beiden Präcipitinreaktionen gleichzeitig zur Anwendung zu bringen.

4. Zur Herstellung des Hämoglobinpräcipitins löst man trocken aufbewahrten Blutfarbstoff ungefähr im Verhältnis 1:20 in Kochsalzlösung. Diese Lösung injiziert man einem Kaninchen intraabdominal. Falls dadurch kein hochwertiges Präcipitins serum erhalten wird, wiederholt man die Einspritzung bis über 10mal, wodurch meistens der Zweck erreicht wird.

#### Literaturverzeichnis.

- <sup>1</sup> Bordet, zit. nach W. Ford, Beitrag zur Lehre von den Hämagglutininen. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **40**, 363. 1902. — <sup>2</sup> Demees, O., Cellule 1901; zit. nach Misao. — <sup>3</sup> Fujiwara, K., Über Hämagglutinine und Erythropräcipitine mit besonderer Berücksichtigung der Frage der Identität der beiden Substanzen. Mitt. d. Med. Ges. zu Tokio **34**, H. 23, S. 9. 1920. — <sup>4</sup> Fukamachi, H., Über den Unterschied der Reaktionen von Erythropräcipitin und Serumpräcipitin unter Benutzung von Pferdeblut als Antigen. Zeitschr. f. Sozial-Medizin 1920, Nr. 481.

(Japanisch.) — <sup>5</sup> *Heidelberger, M.*, und *K. Landsteiner*, On the antigenic properties of haemoglobin. Journ. of exp. med. **38**, 561. 1923. — <sup>6</sup> *Hektoen, L.*, und *K. Schulhof*, On specific erythroreceptins (Hemoglobin-Preceptins). Journ. of infect. dis. **31**, 32. 1922. — <sup>7</sup> *Hektoen, L.*, und *K. Schulhof*, On specific erythroreceptins (Hemoglobin-Preceptins). II. Hemoglobin-Preceptins in identification of blood. Ebenda **33**, 224. 1923. — <sup>8</sup> *Higashi, S.*, Serologische Untersuchungen über das Hämoglobin mit besonderer Berücksichtigung der praktischen Verwendbarkeit des Hämoglobinopräcipitins. Journ. of biochem. **2**. 1923. — <sup>9</sup> *Ide, M.*, Cellule **20**. 1902 (1903). — <sup>10</sup> *Ishikawa, T.*, et *K. Sakurabayashi*, Sur la précipitine de l'hémoglobine. Tohoku journ. of exp. med. **6**, Nr. 5/6. 1925. — <sup>11</sup> *Klein, A.*, Zur Kenntnis der Agglutinine und gewisser Präcipitine des Blutes. Wien. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 5, S. 117; Nr. 6, S. 156. — <sup>12</sup> *Leblanc*, zit. nach *Schmidt* und *Bennet* (15). — <sup>13</sup> *Leers, O.*, Die forensische Blutuntersuchung. 1910, S. 157. — <sup>14</sup> *Misao, T.*, Serologische Studien über das Bluteiweiß. Fukuoka Ikwa Daigaku Zasshi (Fukuoka Acta Medica) **18**, Nr. 11. 1925. — <sup>15</sup> *Schmidt, C. L. A.*, und *C. B. Bennet*, Is hemoglobin antigenic? Journ. of infect. dis. **25**, 403. 1919. — <sup>16</sup> *Tsukasaki*, Über die Extraktionsflüssigkeit der Blutspuren. Japan. Zeitschr. f. Staatsarzneikunde 1922, Nr. 427.

---