

(Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und soziale Versicherung der kgl. Universität zu Palermo. — Direktor: Prof. *Domenico Mirto*.)

Über präcipitierende Sera aus gekochtem Antigen¹.

Von

Prof. **Ferdinando Nicoletti**.

Fujiwara, der Kaninchen gekochtes Blutserum als Antigen einspritzte, erhielt präcipitierende Seren hohen Titters und spezifischer Art, die zwar nicht absolut, aber doch größer war als bei jenen Seren, welche mit genuinem Serum immunisierte Kaninchen lieferten.

Fujiwara stellte das gekochte Serum in folgender Weise dar: Das Blutserum wurde im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und ihm $\frac{1}{5}$ Volumen gesättigte Chlornatriumlösung nebst einigen Tropfen Essigsäure zugesetzt. Das Ganze wurde im Wasserbad bis zur vollständigen Präcipitation der Serumalbumine gekocht. Alsdann wurde durch Filtrierpapier filtriert, die auf dem Filter zurückgebliebenen Albumine wurden der Trocknung überlassen und unter Toluol verwahrt. Von dem so erhaltenen Antigen wurde eine kleine Menge, etwa 0,02 g in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulgiert und Kaninchen jeden 2. bis 3. Tag intravenös eingespritzt, im ganzen 10 Einspritzungen.

Durch dieses Vorgehen erhielt *Fujiwara* hochwertige Antiseren vom Titer 1 : 20000 bis 1 : 50000. Dabei blieb das Antigen lange Zeit unverändert.

Kürzlich erhielten *Dalla Volta* und *Del Carpio* gleich aktive und spezifische Antiseren schon nach 7—10 Tagen, indem sie das gekochte Antigen ähnlich wie *Fujiwara* herstellten (Verdünnung des Serums in destilliertem Wasser im Verhältnis von 1 : 10, Beifügung von 5 g Ammoniumsulfat und einigen Tropfen [5—6] Essigsäure auf je 100 ccm einer solchen Verdünnung, Präcipitation der Albumine durch Erwärmung im Wasserbad, Filtration, Trocknung der auf dem Filter zurückgebliebenen Albumine und Konservierung derselben unter Toluol), aber sie injizierten nur ein einziges Mal, und zwar endoperitoneal, eine viel stärkere Menge gekochten Antigens, im allgemeinen 1 g, ausnahmsweise 1,5 g, das in lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung emulgiert worden war.

Wir haben verschiedene Male in der gerichtsärztlichen Praxis die von *Dalla Volta* vorgeschlagene Technik erprobt und sind zu einem Ergebnis gekommen, das vollständig mit dem von diesem Autor erzielten übereinstimmt.

¹ Vortrag auf dem 4. Kongreß der Italienischen Gesellschaft für gerichtliche Medizin in Bologna vom 2. bis 4. VI. 1930.

Nichtsdestoweniger wollten wir besondere Untersuchungen anstellen sowohl über die Herstellung von Antimenschenserum mittels gekochtem Antigen, als auch über den Wert der Antiseren selbst in Hinsicht der Erfordernisse der gerichtsärztlichen Praxis. Wir beabsichtigten, genau festzustellen:

1. ob es möglich wäre, als gekochtes Antigen Leichenblut zu verwenden;

2. desgleichen, ob aus gekochtem Hämoglobin ein Antiserum gewonnen werden könnte, das bei unveränderter Artspezifität nur für Blut spezifisch wäre, oder auch die Organspezifität darböte, analog dem, wie es für das genuine Hämoglobin bereits festgestellt worden ist (*Klein, Leers, Mirto, Cevidalli* usw.);

3. ob und bis zu welchem Punkte die mit gekochtem Antigen erhaltenen Menschen-Antiseren mit menschlichen, nach verschiedenen Verfahren denaturierten Proteinen positiv reagieren könnten.

Ich möchte in gedrängter Kürze über die erhaltenen Resultate berichten, indem ich von der Wiedergabe der über die einzelnen Untersuchungen geführten und in der Registratur des Instituts aufbewahrten Protokolle absehe.

I. Herstellung von Antiseren mit gekochtem Leichenblut.

Von Leichen, die nicht über 2—3 Tage alt waren, wurde Blut aus dem Herzen, den großen Venen und vor allem aus den costovertebralen Gefäßen entnommen, und zwar in Mengen von etwa 100—200 ccm. Das Blut wurde bei gewöhnlicher Temperatur ungefähr 24 Stunden ruhig stehen gelassen. Innerhalb dieser, manchmal auch noch in kürzerer Zeit, vollzog sich die Abscheidung des Serums. Im allgemeinen wurde wenig Wert darauf gelegt, ein vollständig klares Serum zu erhalten, was immer sehr schwer zu erreichen ist.

Das so erhaltene Serum wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1 : 10 verdünnt, wonach zu jeweils 100 ccm der Verdünnung 5 g Ammoniumsulfat und 5—6 Tropfen Essigsäure zugefügt wurden. Dann wurde im Wasserbad bis zur vollständigen Präcipitation der Albumine gekocht und filtriert. Die auf dem Filter zurückgebliebenen Albumine wurden im Thermostaten getrocknet und unter Toluol aufbewahrt. Es wurde dann nach dem Verfahren von *Dalla Volta* und *Del Carpio* das bereits unter Toluol verwahrte Antigen getrocknet und fein zerrieben. Davon wurde 1—1,5 g in lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung emulgiert und intraperitoneal Kaninchen eingespritzt.

In allen Fällen ergab das durch Aderlaß nach etwa 1 Woche und spätestens am 10. Tage gewonnene Blut die Bildung von spezifischen und ausgesprochen aktiven Antikörpern. Der Antiserumtiter war fast immer nicht höher als 1 : 1000, nahm dann in den folgenden Tagen

rasch zu bis auf 1 : 20000, selbst bis 1 : 50000, worauf er allmählich wieder abnahm, so daß ungefähr 1 Monat nach dem Aderlaß jede spezifische Aktivität erloschen war. Von den 10 auf diese Weise immunisierten Kaninchen starb keines, und keines bot irgendwelche nennenswerten Störungen.

In einer 2. Untersuchungsreihe wurde das Leichenblut in toto verwendet, also nicht das Serum allein. Das in destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnte Blut wurde wie vordem mit gekochtem Antigen versetzt. Damit wurden Kaninchen nach der Technik von *Dalla Volta* immunisiert.

In allen Fällen ließen sich in dem nach etwa 1 Woche durch Aderlaß entnommenen Blut spezifische Antikörper mit dem Titer 1 : 1000 nachweisen. Nach einigen Tagen stieg der Titer des Serums auf 1 : 10000 bis 1 : 20000, ja einmal sogar bis 1 : 50000. Von den 7 immunisierten Kaninchen starb keines. Alle reagierten positiv mit der Produktion von spezifischen Antikörpern.

Die Möglichkeit, auf so einfache und bequeme Weise das zur Immunisierung der Tiere erforderliche Antigen zu gewinnen, veranlaßte uns, in den folgenden Untersuchungen das auf dem Filter zurückgebliebene Antigen sogleich Kaninchen einzuspritzen und so das langsame Trocknen der Albumine im Thermostaten und die übrigen eine gewisse Zeit beanspruchenden Hantierungen auszuschalten.

Zu diesem Zwecke wurden 10 ccm Leichenblut mit 100 ccm destilliertem Wasser verdünnt und wie in den vorhergehenden Fällen 5 g Ammoniumsulfat und einige Tropfen Essigsäure zugesetzt. Das Ganze wurde im Wasserbad gekocht. Nach Filtrierung wurden alsdann die auf dem Filter zurückgebliebenen und in lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Albumine Kaninchen intraperitoneal eingespritzt. Die Kaninchen vertrugen im allgemeinen gut eine derartige massive Einspritzung. Bisweilen gelang es sogar, das aus 15 ccm Leichenblut erhaltene Material einzuspritzen, ohne daß besondere Störungen sich bemerkbar machten.

Die so erhaltenen Resultate übertrafen bei weitem unsere Erwartung. Bei 3 Kaninchen konnte man im Aderlaßblut, das 6 Tage nach der immunisierenden Einspritzung entnommen worden war, das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern mit dem Titer 1 : 1000 nachweisen. Nach einigen Tagen stieg der Titer auf 1 : 10000 bis 1 : 20000 und dann bis 1 : 50000. Weitere 6 ebenso behandelte Kaninchen reagierten gleichfalls gut. Im allgemeinen bildete sich das spezifische Antiserum nicht später als 1 Woche nach der immunisierenden Einspritzung.

In allen Fällen waren 30—40 Tage nach der Immunisierung die spezifischen Antikörper wieder verschwunden. Das präcipitierende Serum dagegen, das steril in zugeschmolzenen Röhrchen aufbewahrt wurde,

behielt noch lange die spezifische Fähigkeit, deren Abnahme nur gering war: präcipitierende Seren mit dem Titer 1 : 10000 bis 1 : 20000 reagierten noch 8 Monate nach dem Einschluß in den Röhrchen positiv mit menschlichem Serum in Verdünnung von 1 : 1000 bis 1 : 5000.

Wir sind darum überzeugt, eine bequeme und einfache Technik zur Herstellung spezifischer Antisera mit gekochtem Antigen gefunden zu haben. In 6—7 Tagen ist es jetzt möglich, auch mit Leichenblut spezifische präcipitierende Seren mit hohem Titer zu erhalten. Wir erblicken in dem Verfahren die Methode der Wahl, die vollständig den Erfordernissen der gerichtsarztlichen Praxis entspricht.

II. Darstellung spezifischer Antisera mit gekochtem Hämoglobin.

Die mit Leichenblut erzielten befriedigenden Resultate bewogen uns, auch mit Hämoglobin aus Leichenblut derartige Untersuchungen anzustellen.

Von Leichen, deren Tod nicht mehr als 2 Tage zurücklag, wurden 150 bis 200 ccm Blut fast ausschließlich aus dem Herzen und den großen Gefäßen entnommen. Das im Erlenmeyer-Kolben aufgefangene Blut wurde bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang der Sedimentierung überlassen, darauf durch wiederholte Pipettierung das abgeschiedene Serum entfernt und der Rest, der fast ausschließlich aus roten Blutkörperchen bestand, in physiologischer Kochsalzlösung 3—4 mal jeweils 15—20 Minuten lang zentrifugiert. Nach Entfernung der Spülflüssigkeit wurden zu 10 ccm des Restes, nämlich der roten Blutkörperchen, 100 ccm physiologische Kochsalzlösung, 5 g Ammoniumsulfat und 10 Tropfen Essigsäure zugesetzt. Alsdann wurde die Mischung im Wasserbade gekocht bis zur vollständigen Präcipitation der Chromoproteide und der anderen Protein-substanzen. Das Ganze wurde auf Filtrierpapier filtriert, worauf, entsprechend unserer Technik, das auf dem Filter zurückgebliebene Material in lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und alsdann Kaninchen intraperitoneal eingespritzt wurde.

Das von 6 auf diese Weise immunisierten Kaninchen durch Aderlaß gewonnene Blut enthielt nach 8—12 Tagen spezifische Antikörper von dem Titer 1 : 1000 und nach einigen Tagen noch solche von dem Titer 1 : 10000 bis 1 : 20000. In einem Falle ergab die Aderlaßprobe in Verdünnung mit Menschenblut erst 15 Tage nach der immunisierenden Einspritzung eine positive Reaktion, nach 25 Tagen war jegliche präcipitierende Wirkung aufgehoben. Am 40. Tage wurde alsdann, wie das erstemal, und vor der Anaphylaxierung mit kleinsten Dosen desselben Antigens, eine weitere intraperitoneale Einspritzung mit gekochtem Hämoglobin vorgenommen. Die erste, 6 Tage nach der letzten Reinjektion vorgenommene Aderlaßprobe gab mit der Blutlösung 1 : 1000 eine positive Reaktion. Die folgenden Aderlässe zeigten das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern mit allmählich steigendem Titer bis zu 1 : 10000.

In allen Fällen erwies sich das mit gekochtem Hämoglobin gewonnene Antiserum nicht nur art-, sondern auch organspezifisch. Sperma, Nasenschleim, Vaginalsekret erfuhren eine leichte Trübung erst bei einer Verdünnung von 1 : 100 und nur bei Zusatz von Antiseren hohen Titers (1 : 20000), eine Trübung, die sich in jedem Falle deutlich unterscheiden ließ von der raschen und in die Augen fallenden Schichtreaktion, die immer auch bei starken Verdünnungen menschlichen Blutes eintrat. Stärkere Verdünnungen der genannten Substanzen dagegen gaben keinerlei Reaktion mit Antiseren vom Titer 1 : 1000. In dem einen oder anderen Falle konnte man eine leichte Trübung nach halbstündigem Verweilen im Thermostaten beobachten.

Wurde also als Antigen gekochtes Hämoglobin unter Benutzung von Leichenblut verwendet, so war es möglich, ein Antiserum von hohem Titer, mit Art- und Organspezifität oder, in unserem Falle, ein Antiserum zu erhalten, das nur für Menschenblut spezifisch war und deshalb vollkommen den Erfordernissen der gerichtsarztlichen Praxis entsprach. Dabei ist das Verfahren einfach und rasch ausführbar, sicherlich dem umständlichen Laboratoriumsverfahren der Immunisierung mit genuinem Hämoglobin vorzuziehen.

III. Wirkung der mit gekochtem Antigen hergestellten Antimenschenserum auf das in verschiedener Art denaturierte menschliche Blut.

Bei diesen Untersuchungen wurde das Augenmerk besonders auf diejenigen denaturierenden chemischen Stoffe gerichtet, welche am meisten auf Blutflecken vorkommen können und die vorzugsweise in der gerichtsarztlichen Praxis als Lösungsmittel alter Blutflecken Verwendung fanden. Weiter bezog sich die Untersuchung auf Blutflecken, die dem Einfluß verschieden hoher Temperaturen ausgesetzt worden waren.

Es sei daran erinnert, daß sich seinerzeit bereits *Carrara* in besonderer Weise mit ähnlichen Untersuchungen beschäftigt hat, soweit es sich um präcipitierende Seren aus genuinem Antigen handelte. Er fand, daß das Blut nach Einwirkung von Cyankalium, Ammoniak, Kalium- und Natronlauge keine Präcipitinreaktion mit wirksamem Serum gab; daß Blut nach Einwirkung von Salzsäure, Schwefelsäure und Essigsäure zwar einen Niederschlag gibt, der aber diagnostisch wertlos ist, da er bei Zusatz von Normalserum entsteht, daß aber die mit gesättigter Boraxlösung und Pacinischer Flüssigkeit behandelten Blutflecken noch einen charakteristischen Niederschlag lieferten, wenn sie mit wirksamem Serum versetzt wurden. Was die der Hitzewirkung ausgesetzten Blutflecken betrifft, so konnte *Carrara* feststellen, daß das Präcipitat bei einer Temperatur von 70° abzunehmen begann und bei 110° fast ganz fehlte.

Zur Ausführung der Untersuchungen wurden verschiedene Menschenblutflecke in Reagensgläsern, die jeweils Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, 10proz. NaOH, 10proz. KOH, Ammoniak enthielten, der Maceration überlassen. Ich hielt es nicht für nötig, auch Versuche in

gesättigter Boraxlösung und in Pacinischer Flüssigkeit anzustellen, da die von *Carrara* erhaltenen positiven Resultate eine genügende Gewähr für die übereinstimmende Anwendung dieser Substanzen bilden, natürlich bei Präcipitinseren aus genuinem Antigen.

Die Macerationsflüssigkeit in den Reagensgläsern wurde filtriert und so viel destilliertes Wasser zugesetzt, bis eine gleichmäßige hell strohgelbe Farbe entstand, ähnlich den zur Kontrolle angestellten Verdünnungen von 1:1000. Zu den verschiedenen so hergestellten und in gleichen Mengen in Reagensgläsern gegossenen Macerationsflüssigkeiten wurde Antimenschenserum aus gekochtem Antigen von nicht über 1:10000 Titer zugesetzt. Zur Kontrolle wurde daneben in eine 2. Gläserreihe der Auszug aus Blutflecken anderer Tierspezies (Hund, Pferd, Schaf), der ähnlich wie die anderen erhalten war, gegossen, und dann die gleiche Menge aus gekochtem Antigen hergestelltes Antimenschenserum zugefügt. In einer 3. Reihe von Röhren, die entsprechend sowohl den Auszug menschlicher Blutflecken, wie die Auszüge von Blutflecken anderer Tierspezies enthielten, wurde normales Kaninchenserum zugesetzt. Eine 4. Reihe von Röhren wurde schließlich mit den verschiedenen Macerationsflüssigkeiten ohne jeglichen Zusatz von Serum gefüllt. Die Resultate wurden innerhalb der ersten 5 Minuten bei Zimmertemperatur und nach 15, 30 und 60 Minuten langem Verweilen im Thermostaten bei 37° notiert.

In allen Röhren, die der denaturierenden Wirkung von Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure unterworfen gewesenes Blut enthielten, das teils vom Menschen, teils vom Tiere stammte und mit präcipitierendem Serum oder mit Normalserum geprüft worden war, konnte man, wie auch *Carrara*, fast immer nach 10—15 Minuten langem Verweilen im Thermostaten, manchmal auch sofort, die Bildung eines mehr oder weniger reichlichen, weißlichen, bisweilen flockigen Niederschlags bemerken. In den nur die verschiedenen Macerationsflüssigkeiten enthaltenden Röhren entstanden Trübung und Niederschlag nach 10—15 Minuten langem Verweilen im Thermostaten nur dort, wo Schwefelsäure eingewirkt hatte.

In den Gläsern mit Zusatz von 10% Kalilauge und 10% Natronlauge zum Blut entstand fast sofort nach Zufügung des präcipitierenden Serums eine Schichtreaktion, die wegen der Trübung des überstehenden Antiserums wenig sichtbar war. Nach 5—10 Minuten langem Verweilen im Thermostaten stellte sich eine diffuse Trübung der ganzen Flüssigkeit ein und nach 10—15 Minuten bildete sich noch ein flockiges Präcipitat.

Ähnlich verhielten sich die Tierblutproben, die mit Kali- und Natronlauge behandelt waren, nur fiel hier die Schichtreaktion noch weniger deutlich aus als in den vorigen Fällen.

Die Menschen- und Tierblutproben, die ebenso denaturiert und mit normalem Kaninchenserum versetzt waren, reagierten gar nicht; nur zeigte sich nach 15—30 Minuten langem Verweilen im Thermostaten manchmal eine leichte Trübung und ein geringer schwammiger Niederschlag.

In den die gleichen Macerationsflüssigkeiten enthaltenden Reagensgläsern, denen kein Serum zugesetzt war, trat gar keine Reaktion auf.

In den Röhren mit menschlichem, der Wirkung von Ammoniak ausgesetztem Blut bemerkte man schon innerhalb der ersten 5 Minuten nach Beifügung des spezifischen Antiserums eine Schichtreaktion und nach 15—30 Minuten langem Verbleiben im Thermostaten eine langsam sich vollziehende flockige Präcipitation.

Ähnliche, wenn auch bisweilen weniger deutlich und weniger rasch eintretende Erscheinungen bot das Tierblut, das auch mit Ammoniak denaturiert war.

In den Gläsern dagegen, die Menschen- und Tierblut enthielten, das der gleichen denaturierenden Wirkung des Ammoniaks ausgesetzt, und dem Normalserum zugegeben worden war, machte sich keinerlei präcipitierende Reaktion geltend, auch nicht nach langem Verweilen im Thermostaten.

In den die gleiche Macerationsflüssigkeit enthaltenden Röhren, denen weder Normalserum noch präcipitierendes Serum zugegeben worden war, kam keinerlei Reaktion zur Beobachtung.

Das mit gekochtem Antigen hergestellte Antimenschenserum (mit einem 1 : 10000 nicht übersteigenden Titer) gab also mit Menschenblut, das mit Salzsäure, Schwefelsäure und Essigsäure denaturiert war, eine Präcipitinreaktion, die aber wertlos ist, weil sie auch nach Zufügung von Normalserum auftrat. In, durch NaOH, KOH und NH_3 , denaturiertem, Menschenblut entstand eine positive Reaktion, die sich nach Zusatz von Normalserum nicht zeigte, aber auch mit ähnlich behandeltem Tierblut auftrat.

Demnach besäßen die in Frage stehenden präcipitierenden Seren die Eigenschaft, auf das gleiche auf verschiedene Weise denaturierte, genauer durch Einwirkung von NaOH, KOH und NH_3 denaturierte Antigen zu reagieren. Sie wären jedoch nicht zoologisch spezifisch, da sie auch auf analoges, in gleicher Weise denaturiertes Antigen anderer Tierarten reagieren würden.

Was schließlich das Verhalten der mit gekochtem Antigen hergestellten Präcipitinseren bei Blutflecken betrifft, die durch Hitze denaturiert waren, wurde folgendes gefunden:

a) Lösungen aus Menschenblutflecken, die Temperaturen von 80, 90, 100, 200, 250° 10—15 Minuten ausgesetzt gewesen waren, und denen Antimenschenserum aus gekochtem Antigen (mit einem Titer nicht über 1 : 10000) zugegeben wurde, zeigten immer eine rasche und charakteristische Schichtreaktion.

b) Blutfleckenlösungen verschiedener Tierspezies, die ähnlichen Temperaturen ausgesetzt worden waren und denen Menschenantiserum

aus gekochtem Antigen zugefügt wurde, ließen keinerlei präcipitierende Reaktion erkennen.

Somit erwiesen sich die Präcipitinseren aus gekochtem Antigen, im Gegensatz zu den aus genuinem Antigen hergestellten, als spezifisch für dasselbe Antigen, das bei sehr hohen Temperaturen denaturiert worden war.

Schlußfolgerungen: Aus allen unseren Untersuchungen, die sich auf die mit gekochtem Antigen hergestellten Antimenschenseren beziehen, geht hervor:

a) Zur Darstellung solcher Antiseren kann man als gekochtes Antigen sowohl das Blutserum allein als auch das Gesamtblut von Leichen benutzen.

b) Das auf geeignete Weise aus den roten Blutkörperchen der Leiche gewonnene Hämoglobin kann ebenfalls als gekochtes Antigen zur Erzeugung von hochwertigem Antiseren verwendet werden, die sowohl art- wie organspezifisch (Blut) sind.

c) Um die für die Darstellung der genannten Antiseren erforderliche Zeit abzukürzen, kann man Kaninchen intraperitoneal das eben auf dem Filter gesammelte und gut in lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Antigen einspritzen.

d) Die mit gekochtem Antigen hergestellten Antimenschenseren scheinen die Eigenschaft zu besitzen, auf das eigene, durch 10% NaOH, 10% KOH und NH_3 denaturierte Antigen zu reagieren (in diesem letzten Falle deutlicher und rascher als in den 2 anderen Fällen); sie scheinen aber nicht artspezifisch zu sein, da sie auch auf von anderen Tierspezies stammendes, in gleicher Weise denaturiertes Antigen reagieren.

e) Dieselben Antiseren geben jedoch eine spezifische Reaktion mit sehr hoch erhitztem Menschenblut.

Literaturverzeichnis.

Fujiwara, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **1**, 562 (1922) und **2**, 384 (1928). — *Dalla Volta* u. *Del Carpio*, Boll. Soc. Biol. sper. **3** (1928). — *Carrara*, L'Arte medica **1901**, Nr 34.
