

(Aus dem Institut für Experimentelle Medizin der Universität Krakau.  
Direktor: Prof. Dr. J. Nowak.)

## Untersuchungen über Präcipitine.

Von

Prof. Dr. med. J. Olbrycht und Dr. phil. S. Snieszko.

Mit 1 Abbildung und 7 Kurven im Text.

In dieser Arbeit soll ein Referat über die Art der Gewinnung von Präcipitationsseren gegeben werden, und zwar auf Grund von Experimenten, die wir im Laufe mehrerer Jahre an 237 Versuchstieren ausgeführt haben. Das Ziel dieser Experimente war außer der Kontrolle der bisherigen Methoden vor allem die Beantwortung der Fragen, wie oft, in welcher Menge, Zeit und in welchem Aggregatzustand das Antigen verwendet werden soll, um quantitativ und qualitativ die besten Antikörper zu erzielen, weiter in welchem Verhältnis die Intensität der Präcipitinreaktion zum Quantum des angewendeten Antigens steht, und endlich sollten sie die Ausarbeitung einer eigenen Methode auf Grund der gewonnenen Erfahrungen ermöglichen.

### Technik der Untersuchungen.

Unser Experimentiermaterial bestand ausschließlich aus Kaninchen, und zwar vorwiegend gewöhnlicher Rasse. Die Kaninchen wurden immer mit Serum immunisiert, mit Ausnahme einer Gruppe von Experimenten, in welcher wir zwecks Gewinnung von Erythropräcipitinen Hämoglobin verwendeten.

Das menschliche Serum entnahmen wir entweder aus Nabelschnurblut oder dem Blut von Aderlässen an gesunden Menschen, oder (jedoch selten) von Serum, das zur Wassermannschen Reaktion gewonnen war. Die Sera wurden nach Möglichkeit steril aufbewahrt oder zwecks Konservierung mit einer 0,25—0,5proz. Karbolkochsalzlösung behandelt.

Die Tiersera, und zwar die Rinder-, Schweine- und Pferdesera, entstammten dem Blute von Schlachttieren, das möglichst steril entnommen und steril oder mittels Karbolzusatz aufbewahrt wurde. Zur Injektion dienten Sera, die einige Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt und auf diese Weise inaktiviert waren.

Die Sera wurden in der ursprünglichen Konzentration und dem ursprünglichen Zustand eingespritzt. Zu Injektionen kleiner Dosen von 0,1—0,2 ccm wurde das Serum mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 oder 1:5 verdünnt, um eine größere Menge von Flüssigkeit zu gewinnen, die sich genauer injizieren ließ. Zu intraperitonealen Injektionen benutzten wir ein Serum, das bis 50% mit einer 0,85proz. Kochsalzlösung verdünnt wurde. Nur bei Wiederholung und Modifikation der Experimente von *Fujiwara* koagulierten wir das Serum nach einer von diesem Verf. angegebenen Methode.

Wir injizierten intravenös oder intraperitoneal, meist intravenös, nur zur Verhütung eines anaphylaktischen Shocks manchmal intraperitoneal. Gewöhnlich jedoch (besonders in den späteren Experimenten) injizierten wir zur Verhütung eines tödlichen Shocks 1 Stunde vor der normalen Dosis intravenös 0,1—0,2 ccm Serum, welches wir 5—10fach mit 0,85proz. Kochsalzlösung verdünnten. Auf diese Weise wurden 100% der Tiere vor tödlichem Shock bewahrt.

Die intravenösen Injektionen geschahen ausschließlich in die Randvenen des Kaninchenohrs, was bei einiger Übung keinerlei Schwierigkeiten bereitete. Gewarnt wird vor subcutanen Extravasaten des Serums, mit Rücksicht auf die Entstehung von Nekrosen, besonders bei Tieren, die bereits auf das gewisse Eiweiß sensibilisiert sind. Wir selbst haben trotz unserer zahlreichen Experimente niemals, auch nicht bei zufälligen subcutanen Extravasaten, Nekrosen beobachtet. Durch vorsichtiges Anstechen der Vene zuerst am Rande der Ohrspitze und allmähliche Annäherung an die Basis des Ohres konnten wir zahlreiche Injektionen ausführen. Selbst nach etwa 10 Injektionen und Probablutentnahmen aus den Ohrvenen konnten immer noch mehr Injektionen in dieselben Ohrvenen gegeben werden.

Mit Rücksicht auf die umständlichere Ausführung und die Gefahr einer Bauchfellentzündung bedienten wir uns der intraperitonealen Injektionen nur in den Fällen, in denen wir eine langsame Resorption des injizierten Materials anstreben, um einem tödlichen Shock aus dem Wege zu gehen. Das Verfahren schützt freilich nicht sicher vor einem protrahierten Shocktod; dieser ist jedoch selten. *Uhlenhuth* empfiehlt, die intraperitonealen Injektionen bei senkrechter Haltung, den Kopf nach unten, auszuführen, was die Senkung der Eingeweide zur Folge hat, wodurch der untere Teile des Bauches sich zur Injektion besser eignet. Er empfiehlt weiter, an der Stelle des Einstiches ein kleines Stückchen Haut herauszuschneiden und mittels stumpfer Nadel zu injizieren. Nach unseren wie auch nach *Pfeiffers* Erfahrungen ist es viel bequemer, die intraperitonealen Injektionen in Rückenlage vorzunehmen und die Haut nicht herauszuschneiden, da man damit das Kaninchen nur unnütz verletzt. Auch die Anwendung einer stumpfen Nadel scheint uns nicht geeignet, da sie nur das Durchstechen der Bauchdecke und der Muskeln erschwert. Wir selbst führten die intraperitonealen Injektionen in folgender Weise aus: Wir legten das Kaninchen, nur wenig gestreckt, auf den Rücken. An der Stelle des Einstiches wird die Haut rasiert und desinfiziert und nachher mit einer gewöhnlichen Nadel oberflächlich durchstoßen. Die Folge davon ist, daß das Kaninchen reflektorisch die Bauchdecken anspannt, so daß ein rascher Stoß mit der Spritze genügt, um in die Bauchhöhle zu gelangen. Bei dieser Ausführung der intraperitonealen Injektionen verloren wir kein einziges Kaninchen.

Zur Probetiterbestimmung entnahmen wir bei unseren Versuchen ständig das Blut aus den Ohrvenen der Kaninchen, welche wir durch 24 Stunden fasten ließen, um einer Opaleszenz des Serums vorzubeugen. Die Probablutentnahme geschah entweder mittels Spritze oder zur Gewinnung eines größeren Quantums Blut durch Einschnitt am Rande des Ohrs und Auffangen des Blutes in sterilen Zentrifugierröhrchen. Die Blutung stillten wir mittels Druck und bei verzögerter Stillung durch leichtes Anbrennen der Wunde. Die Kaninchen reagierten gar nicht auf die Anbrennung, und die Wunde heilte per primam.

Nachdem das Serum abzentrifugiert war, wurden seine Wertigkeit und Spezifität nach der Methode von *Uhlenhuth* und *Beumer* geprüft<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> In ganz schmale Röhrchen werden entsprechende Verdünnungen eines homologen bzw. heterologen Serums gegeben, in ein Stativ mit dunklem, verschiebbarem Hintergrund gestellt und mit dem Präcipitationsserum in der Weise behandelt, daß es ohne sich mit dem Antigen zu vermischen, auf den Boden der

Zur endgültigen Serumgewinnung wurde eine größere Menge Blut abgelassen oder das Tier ganz ausgeblutet. Partielle Blutentnahmen führten wir gewöhnlich mittels Herzpunktion aus. Trotzdem dieses Verfahren nicht ungefährlich ist, fielen uns bei der Herzpunktion nur 2 Kaninchen, hingegen führten wir mehr als 100 Herzpunktionen ohne Schaden aus, ja mehrmals konnten wir die Punktionen 2—3mal an demselben Kaninchen wiederholen. Dabei hatte diese Methode der Blutentnahme den Vorteil, daß man das Serum längere Zeit ohne irgendwelche antiseptische Zusätze aufbewahren konnte. Als bestes Entblutungsverfahren empfehlen wir, nach Desinfektion der rasierten Kaninchenhaut diese und die Muskeln scharf zu trennen und freizulegen. Die Carotiswand wird zwischen 2 Klemmen eingeschnitten und in das Lumen eine verengte und eingeschmolzene Glascapillare von entsprechender Weite eingeführt; nach Unterbindung des Gefäßes wird die proximale Klemme entfernt und dann das Blut steril in einen mittels Gummischlauches mit der Glascapillare verbundenen Erlenmeyerkolben mit

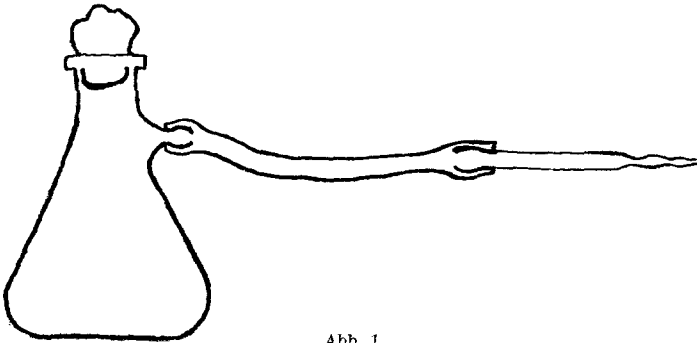


Abb. 1.

seitlichem Abflußrohr geleitet (vgl. Abb. 1). Nach dem Absetzen wird das Serum in sterile Röhrchen abgezogen und nach vollständiger Senkung der Blutkörperchen auf Ampullen verteilt, die zugeschmolzen werden.

Bei der Gewinnung hochwertiger und spezifischer präcipitirender Antisera ist die Immunisierungsmethodik der Tiere von besonderer und prinzipieller Bedeutung. Die zahlreichen Methoden und Modifikationen weichen meist nur ganz unbedeutend voneinander ab. Wir haben deshalb unsere Aufmerksamkeit nur solchen Methoden zugewendet, die wesentliche Änderungen gegenüber den oben beschriebenen Verfahren einführen und haben sie zum Ausgang unserer Versuche genommen.

Röhrchen hinabträufelt; nach der Intensität und Raschheit der entstandenen Ringe und Niederschläge an der Berührungsstelle des Antigens mit dem Serum liest man den Titer des Antiserums ab. Der Ausgangspunkt zur Bestimmung der Wertigkeit der Antisera ist eine Verdünnung des homologen Serums im Verhältnis 1:10, und gewöhnlich wird die Verdünnung des Antigens so lange fortgesetzt, bis die Höhe des Serumtiters erreicht wird. Die Spezifizitätsprüfung geschah auf obige Weise in einer Verdünnung der heterologen Sera von 1:10, 1:100 und 1:1000. Die Ergebnisse wurden bis zu 20 Minuten abgelesen, und zwar vom Moment des Anstellens der Reaktion gerechnet. Geschah die Ablesung zu anderer Zeit, so wurde es im Protokoll erwähnt.

Die klassische Methode zur Gewinnung der Präcipitine ist diejenige von *Uhlenhuth* und seiner Schule und auch die nahe verwandte Methode *Nuttals* sowie deren zahlreiche Modifikationen. Nach der Methode von *Uhlenhuth* werden in mehr oder weniger wöchentlichen Intervallen 1—3 ccm inaktivierten Serums intravenös injiziert. Die Injektionen sollen 3—4mal wiederholt werden. Die weitere Immunisierung hat keinen Einfluß mehr auf den Titer des Serums. Sobald der entsprechende Titer erreicht ist, wird das Kaninchen entblutet und das gewonnene Antiserum steril im Dunklen aufbewahrt. Wie erwähnt, werden eine Reihe von Modifikationen angeführt, und selbst *Uhlenhuth* führt gewisse Änderungen in den verschiedenen Ausgaben seiner „Technik zur Gewinnung der Präcipitine für forensische Zwecke“ an.

Die „Schnellmethode“ von *Fornet* und *Müller* beruht darauf, daß an 3 aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal steigende Dosen des Antigens injiziert werden, und zwar 5, 10 und 15 ccm, worauf am 12. Tage nach der letzten Injektion das Kaninchen entblutet wird. Diese Methode wurde mehrfach kontrolliert und bestätigt (*Bonhoff* und *Tsuzuki*, *Gay* und *Fitzgerald*, *Hectoen*), fand aber auch viele Gegner (*Uhlenhuth*, *Trommersdorf*, *Dold*, *Dikoff*, *H. Pfeiffer* u. a.), welche negative Resultate erzielten und beträchtliche Verluste an Tieren zu verzeichnen hatten.

*Raysky* und *Roček* haben eine wiederholte Immunisierung eingeführt (1914). Zuerst wird nach der klassischen Methode immunisiert und nach Ablauf einer längeren Frist, nach vollständigem Verschwinden der Präcipitine aus dem Blute des Tieres, wird eine zweite Serie von Injektionen gegeben. Nach *Raysky* genügt bei Tieren, welche schon nach der ersten Immunisierung gute Antisera lieferten, nach einigen Monaten die Wiederholung einer einzigen Injektion von 0,1—1,0 g des Antigens, um nach 6 Tagen schon sehr starke Antisera zu bekommen.

Die Methode von *Roček* unterscheidet sich insofern von der Methode *Rayskys*, daß er einige Zeit nach der ersten Immunisierung eine größere Dosis des Antigens verabreicht. Er erhält zwar auf diese Weise hochwertige Antisera, ein großer Teil der Tiere erkrankt jedoch nach den subcutanen Injektionen an langwierigen Abscessen oder geht an anaphylaktischem Shock zugrunde.

Eine originelle und neue Methode empfiehlt der Japaner *Fujiwara*. Als Antigen injiziert er durch Kochen koaguliertes Serum. Er macht 10 Injektionen in kurzen Intervallen und kleinen Dosen (0,02 g). Seine Resultate sind sehr befriedigend, sowohl hinsichtlich des Titers wie auch der Spezifität des Antiserums.

*H. Pfeiffer* empfiehlt eine Methode, welche gewissermaßen die Methoden *Rayskys* und *Fornet-Müllers* vereinigt. Er macht 3 intravenöse Injektionen in eintägigen Intervallen mit 1—2 ccm Serum oder kondensiertem Blutauszug. Nach 6—10tägiger Pause injiziert er intraperitoneal an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 2 ccm Serum, welches er mit der gleichen Menge 0,85 proz. NaCl verdünnt. Während der folgenden 3 Tage injiziert er wieder intravenös wie am Anfang. Nach 10—12 Tagen Blutentnahme. Die auf diese Weise gewonnenen Antisera sollen hochwertig und streng spezifisch sein.

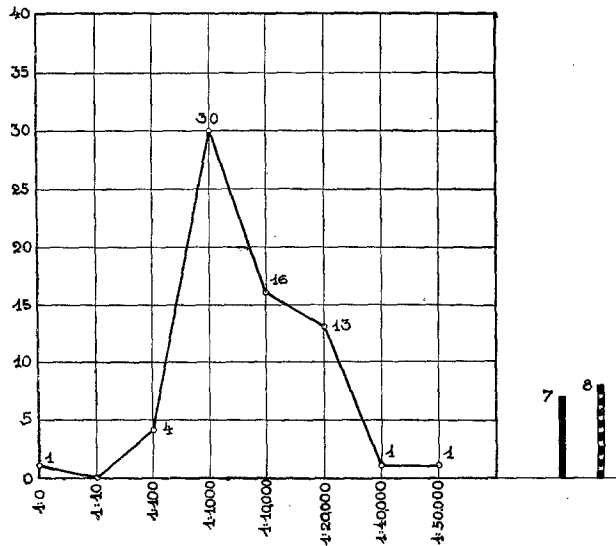
Von anderen Methoden soll noch einer Methode Erwähnung getan werden, welche von 2 Amerikanern, *Bull* und *King*, ausgearbeitet wurde. Die Kaninchen bekommen vier intravenöse Injektionen mit je 5 ccm Serum in 2tägigen Intervallen, worauf 9—12 Tage nach der letzten Injektion den Tieren zuerst 50 ccm Blut und nach weiteren 2 Tagen wieder 50 ccm entnommen werden. Nach einer Woche werden die intravenösen Injektionen wiederholt und auch das Blut wiederholt entnommen. Nach den Erfahrungen dieser Autoren kann man auf obige Weise die Tiere in 5 Serien immunisieren und in jeder Serie zweimal hintereinander das Blut entnehmen.

Endlich wird von *Stadenath* eine Modifikation zur Gewinnung von präcipitierenden Seren eingeführt; vor der Impfung der Kaninchen blockiert der Autor das reticulo-endotheliale System mit kolloidaler Tusche, was eine bedeutende Vermehrung der Präcipitine zur Folge haben soll.

### 1. Gruppe der Untersuchungen

enthält die Versuche an Kaninchen, welche nach der Methode von *Uhlenhuth* immunisiert wurden.

In der ersten Serie der Experimente, welche 81 Versuchskaninchen umfaßte, wurden diese viermal in wöchentlichen Intervallen mit 1 ccm Serum auf 1 kg Körpergewicht des Tieres immunisiert (Modifikation von *Leers*). Bei einem Kaninchen



Kurve 1. Die schwarze Säule bezeichnet die Tiere, welche an anaphylaktischem Shock zugrunde gingen. Die schwarzweiße Säule bezeichnet die Tiere, welche aus anderer Ursache fielen.

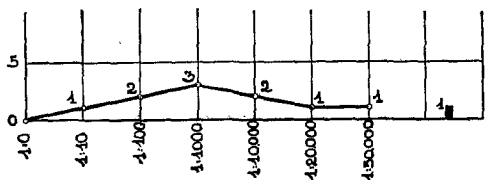
erhielten wir überhaupt keine Präcipitine, nicht einmal in einer Verdünnung des homologen Eiweißes von 1:10; 4 Kaninchen gaben Antisera mit Titer 1:100; die meisten Antisera erreichten nicht den Titer 1:10000. Mit dem weiteren Steigen des Antiserumtiters vermindert sich die Zahl der Kaninchen, so daß ein Titer über 1:10000 nur von 16 Kaninchen erreicht wurde; bei 13 Kaninchen kommt der Titer auf 1:20000; bei je einem Kaninchen auf 1:40000 und 1:50000. Während der Immunisierung gingen 7 Kaninchen an akutem anaphylaktischen Shock zugrunde, 8 Kaninchen fielen aus anderen Ursachen.

In der Kurve 1 sind obige Verhältnisse graphisch dargestellt. Die wagerechte Achse bezeichnet den Titer der Antisera, die senkrechte die Zahl der Kaninchen. Nach einer ganz einfachen Berechnung (alle Antiserumtiter werden summiert und die Summe durch die Zahl der Kaninchen dividiert) beträgt der Durchschnittstitel der mittels dieser Methode gewonnenen Antisera 1:8187.

Die mittels der klassischen Methode gewonnenen Präcipitationssera geben fast immer mit stark konzentrierten Antigenen (1:10 bis 1:1000)

innerhalb weniger Minuten grobflockige Niederschläge, welche sich rasch auf den Boden des Röhrchens senken. In einer Verdünnung von 1:10000 entstehen gewöhnlich nur Ringe und in weiteren Verdünnungen des Antigens wird die Intensität der Präcipitation rapid vermindert. Wir kommen darauf noch später zurück.

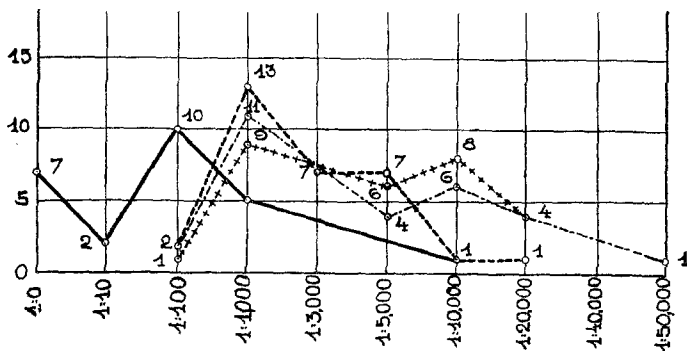
Die weiteren 11 Kaninchen wurden mittels dreier Injektionen immunisiert, welche in derselben Dosierung des Serums und in denselben Zeit-



Kurve 2.

intervallen ausgeführt wurden. Die erzielten Resultate bestätigten die Annahme der Verfasser, daß man bereits nach der dritten Injektion gute Antisera bekommen kann. 4 von den 11 Kaninchen gaben

einen Antiserumtiter von 1:10000, was bei dieser Immunisierungsmethode immerhin ein gutes Ergebnis darstellt. Die Kurve Nr. 2. ist bedeutend flacher als die Kurve Nr. 1, was auf die geringere Zahl der Kaninchen zurückzuführen ist. Ein Kaninchen ging an anaphylaktischem Shock zugrunde. Die Art der Niederschläge ist identisch mit



Kurve 3. Die fortlaufende Linie bezeichnet den Titer nach der 1. Injektion, die Strichlinie nach der 2. Injektion, die Kreuzlinie nach der 3. Injektion, die Strich-Punktlinie nach der 4. Injektion.

derjenigen der vorigen Serie. Der Durchschnittstiter beträgt 1:9321, ist also höher als in der vorigen Serie.

Wir beschäftigten uns nun mit der Frage, nach der wievielten Injektion das Antiserum bereits einen befriedigenden Titer erreicht, und in welchem Verhältnis die Entstehung der Präcipitine zu der Anzahl der gemachten Injektionen steht. Zu diesem Zwecke prüften wir an einem Material von 36 Kaninchen den Antiserumtiter unmittelbar vor jeder der folgenden Injektionen. Die Kurve Nr. 3 belehrt uns über das Verhältnis

der Zahl und der Zeit der Injektionen zur Entstehung der Präcipitine bei der *Uhlenhuths*chen Immunisierungsmethode. Wie aus dieser Kurve ersichtlich, verschiebt sie sich nach jeder Serie der Injektionen immer mehr nach oben und erreicht die höchste Lage nach der 3. und erst dann nach der 4. Injektion.

Der Durchschnittstiter nach der 1. Injektion beträgt 1:676. Der Durchschnittstiter nach der 2. Injektion beträgt 1:3360. Der Durchschnittstiter nach der 3. Injektion beträgt 1:9589. Der Durchschnittstiter nach der 4. Injektion beträgt 1:7190. Bereits nach der dritten Injektion erzielen also die Sera einen sehr hohen Titer, die 4. Injektion beeinflußt das Steigen desselben nur in wenigen Fällen.

Um den Einfluß der längere Zeit wiederholten wöchentlichen Injektionen festzustellen, immunisierten wir 1 Kaninchen mittels 11 intravenöser Injektionen und bestimmten den Titer vor jeder folgenden Injektion. Der Verlauf der Injektionen und die Titerbestimmung ist aus folgendem Protokollauszug ersichtlich:

Kaninchen 102. Gewicht 2,550 g. Antigen: intravenöse Injektion von Menschenserum.

Injektion:		Titerbestimmung:	
Datum:	Quantum in ccm:	Datum:	Ergebnis:
4. VII. . . . .	5	17. VII.	1:1000
11. VII. . . . .	3	25. VII.	1:10000
18. VII. . . . .	3	2. VIII.	1:10000
26. VII. . . . .	3	7. VIII.	1:15000
2. VIII. . . . .	3	14. VIII.	1:10000
7. VIII. . . . .	3	Ohne Bestimmung des Titers	
14. VIII. . . . .	3,5		
22. VIII. . . . .	3,5	29. VIII.	1:1000
29. VIII. . . . .	5	13. IX.	1:5000
14. IX. . . . .	3,5	21. IX.	1:5000

Wie also auch aus obigem ersichtlich, erreichte der Antiserumtiter schon nach der 3., bzw. nach der 4. Injektion seinen Höhepunkt, um dann nach einigen Schwankungen bedeutend zu sinken. Dies einzige Experiment bestätigt zur Genüge die Untersuchungen *Uhlenhuths* und seiner Schule und stimmt auch mit unseren auf der Kurve Nr. 1 dargestellten Ergebnissen überein.

## 2. Gruppe der Untersuchungen.

Die Kaninchen, die wir nach drei- oder viermaliger Impfung nicht entbluteten (hauptsächlich wegen ihres zu niedrigen Antiserumtiters) überließen wir der Ruhe, und nach einiger Zeit (3 Wochen bis 2 Monate) führten wir eine zweite Serie von Injektionen in ähnlicher Weise wie die erste aus. Die Kaninchen, welche nach der ersten Serie der Injektionen

nicht reagierten, gaben bei der wiederholten Immunisierung viel stärkere Antisera.

Wie bereits erwähnt, bearbeiteten *Ryasky* und auch *Roček* eine Methode, welche auf wiederholter Immunisierung beruht. Abgesehen von geringen Abweichungen betreffs der Zahl der Injektionen und der Dosierung des Serums verhielten sich in unseren Experimenten die Kaninchen dieser Gruppe im allgemeinen so, als ob sie nach den Methoden obiger Autoren immunisiert wären.

Immunisiert wurden nach obiger Methode 9 Kaninchen; an 6 wurde nach der ersten Serie der Injektionen die Titerbestimmung ausgeführt. Der Durchschnittstiter betrug nach der ersten Serie der Injektionen 1:2500, nach der zweiten 1:11333.

Wenn man also bedenkt, daß die Mehrzahl der untersuchten Kaninchen nach der ersten Serie der Injektionen ziemlich schwache Antisera lieferten (1:1000), so spricht die bedeutende Erhöhung des Titers nach der zweiten Serie der Injektionen entschieden zugunsten der wiederholten Immunisierung.

### 3. Gruppe der Untersuchungen.

Folgende Gruppe umfaßt ein Experimentierungsmaterial von 20 Kaninchen, welche nach den verschiedensten Methoden immunisiert wurden. Da eine tabellarische oder graphische Übersicht der Gesamtergebnisse dieser Gruppe nicht möglich ist, beschränken wir uns auf kurze Protokollauszüge aus unseren Experimenten.

Kaninchen 1, ♂, 2830 g. In Zeitintervallen von 8—10 Tagen führten wir 4 intravenöse Injektionen aus, und zwar von je 2,5—4,5 ccm Menschenserum. Die 18 Tage nach der letzten Injektion erfolgte Titerbestimmung ergab 1:20000 mit sehr schwachem Präcipitationsring. 6 Tage nach der Titerbestimmung injizierte man 2,2 ccm Serum. 23 Tage später dieselbe Titerhöhe, jedoch mit noch schwächeren Ringen.

Kaninchen 2, ♂, 2800 g. 3 intravenöse Injektionen von je 2,5—4,5 ccm Menschenserum in Zeitintervallen von 8—10 Tagen. 18 Tage nach der letzten Injektion Titer 1:20000 innerhalb von 10 Minuten.

Kaninchen 3, ♀. 3 intravenöse Injektionen in wöchentlichen Abständen von je 2,5 ccm Menschenserum. Bei der 18 Tage nach der letzten Injektion erfolgten Titerbestimmung konstatierte man keinen Niederschlag.

Kaninchen 4, ♀, am Anfang der Immunisierung 3000 g, am Schluß derselben 5550 g. 3 intravenöse Injektionen: am 1., 16. und 27. Tage von je 3, 2,5 und 4 ccm Menschenserum. 10 Tage nachher ergab die Titerbestimmung 1:10000 nach 15 Minuten.

Kaninchen 5, ♀, 2770 g. 3 intravenöse Injektionen am 1., 8. und 19. Tage von je 1,5, 2 und 1,9 ccm Menschenserum; 8 Tage darauf ergab die Titerbestimmung 1:10000 innerhalb von 10 Minuten. 15 Tage nach der letzten Injektion noch eine Injektion von 1,2 ccm Serum und nach 8 Tagen Titerbestimmung mit Ergebnis 1:20000 nach 20 Minuten. 8 Tage nach dieser Injektion weitere Injektion von 1,2 ccm Menschenserum. 10 Tage darauf erreichte das Antiserum einen Titer von 1:20000 nach 7 Minuten.

Kaninchen 6, ♀, erhielt intravenös am 1. Tage 1,8 ccm, am 6. Tage 1,2 ccm und am 24. Tage 1 ccm Menschenserum. 8 Tage darauf Titerbestimmung mit



Ergebnis 1:10000 nach 5 Minuten. Am selben Tage Injektion von 2,2 ccm Serum und 9 Tage darauf Titerbestimmung mit Ergebnis 1:5000 nach 2 Minuten. Endlich 3 Tage später neuerliche Injektion von 2,2 ccm Serum und 12 Tage darauf Titerbestimmung mit sofortigem Niederschlag von 1:5000 und 1:10000 nach 5 Minuten.

Kaninchen 7, ♀, 1880 g, 1., 6. und 24. Tag intravenös 1,1—1,6 ccm Menschen-serum. Nach 9 Tagen Titerbestimmung vollständig negativ. Am selben Tage intravenös 1 ccm Serum und intraperitoneal 3,5 ccm. 9 Tage später ergab die Titerbestimmung 1:1000 (schwache Niederschläge). 12 Tage darauf wiederholte Injektion von 1,3 ccm Serum, die am 9. Tage erfolgte Titerbestimmung zeigte dieselbe Höhe des Titers 1:1000.

Kaninchen 8, ♂, 2070 g. Intravenöse Injektion von 2,3 ccm Menschenserum am 1., 8. und 15. Tage. 9 Tage darauf wurde ein Titer von 1:1000 nach 3 Minuten festgestellt. Am selben Tage neuerliche Injektion von 2,1 ccm Serum und 9 Tage später Titerbestimmung mit Ergebnis von 1:5000 nach 5 Minuten. 2 Tage später wieder 2,1 ccm Serum intravenös und 12 Tage darauf wurde ein Titer von 1:10000 nach 5 Minuten, hingegen bei 1:20000 nur eine Spur von einem Niederschlag festgestellt.

Kaninchen 9, ♀, 1870 g. Am 1., 4. und 11. Tage intravenöse Injektionen von je 2 ccm Menschenserum. Die 9 Tage später erfolgte Titerbestimmung ergab gar keine Präcipitation. Am selben Tage und 8 Tage später 2 intravenöse Injektionen von je 1,2 ccm Serum und 2 Wochen darauf wurde ein Titer von 1:1000 nach 5 Minuten festgestellt.

Kaninchen 10, ♀. Am 1. und 7. Tage je 2 ccm Menschenserum intravenös. 9 Tage darauf Titerbestimmung mit Titer 1:5000 nach 3 Minuten. Am selben Tage wieder intravenös 2 ccm Serum. Die 9 Tage später erfolgte Titerbestimmung ergab wieder 1:5000. 2 Tage darauf Injektion von 1,2 ccm Serum und nach weiteren 12 Tagen hatte das Antiserum einen Titer von 1:10000 sofort und 1:20000 nach 3 Minuten.

Kaninchen 11, ♀, 2010 g. Am 1., 10. und 33. Tage intravenöse Injektionen von 1—2 ccm Menschenserum. 9 Tage darauf ergab die Titerbestimmung 1:1000 sofortige starke Niederschläge und 1:20000 nach 5 Minuten.

Kaninchen 12, ♂, 2900 g. Am 1., 11. und 27. Tage intravenöse Injektion von 1,2—4 ccm Menschenserum. 10 Tage darauf Titerbestimmung mit Ergebnis 1:1000, sofortige starke Präcipitation und 1:40000 nach 10 Minuten.

Kaninchen 13, ♂, kastriert, 3250 g. Wir führten 4 intravenöse Injektionen mit Menschenserum aus, und zwar am 1., 15., 26. und 36. Tage, jedesmal von 2—4 ccm Serum. 12 Tage darauf ergab die Titerbestimmung 1:1000 mit deutlichen und 1:10000 schwach angedeuteten Präcipitaten bis zu 2 Minuten.

Kaninchen 29, ♂, 1750 g. Täglich 3 intravenöse Injektionen von je 1 ccm Pferdeserum. Nach 6tägiger Pause 5 weitere intravenöse Injektionen, ebenfalls täglich mit 1,5—4 ccm Serum. 10 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Titerbestimmung mit Ergebnis 1:10000. Nach 3monatiger Pause gab man wieder 3 intravenöse Injektionen in wöchentlichen Intervallen von 1,5—2 ccm Serum. Eine Woche nach der letzten Injektion ergab die Titerbestimmung 1:5000 nach 1 Minute und 1:15000 nach 10 Minuten.

Kaninchen 31, ♂, 1900 g. Fünf intravenöse Injektionen von 1—2,5 ccm Pferdeserum am 1., 2., 9., 18. und 23. Tage. Am 31. Tage Probeblutentnahme und Titerbestimmung mit Ergebnis 1:15000.

Kaninchen 32, ♂, 2000 g. Vorgehen wie beim vorigen. Titer 1:10000.

Kaninchen 196, ♀, 2350 g. Intravenöse Injektion von 2 ccm Menschenserum und nach 24 Stunden neue Einverleibung von 5 ccm dieses Serums. Die nach

7 Tagen erfolgte Titerbestimmung ergab schwache Präcipitate in einer Verdünnung von 1:1000 nach 10 Minuten.

Kaninchen 197, ♀, 2170 g. Dasselbe Vorgehen wie beim vorigen. Titer 1:100 nach 5—10 Minuten (schwache Niederschläge).

Kaninchen 198, ♀, 2450 g. Dasselbe Vorgehen wie bei Nr. 196 und 197. Einige Stunden nach der 2. Injektion ging das Tier zugrunde.

Kaninchen 33, ♀, 3400 g. Niederkunft während der Immunisierung. Ausschalten des Tieres.

Die Schlußfolgerung aus den Experimenten dieser Gruppe ist nicht leicht, da die Kaninchen nach so verschiedenen Methoden immunisiert wurden, daß diese Gruppe als Ganzes kaum in Betracht kommen kann. Auch bei der Einteilung auf Untergruppen stößt man auf Schwierigkeiten, da ja nur ausnahmsweise 2 oder 3 Kaninchen mit gleichen Mengen Serum und in gleichen Zeitintervallen immunisiert wurden. In manchen Fällen ergaben sich ziemlich befriedigende Resultate. Ob jedoch diese Ergebnisse von der Art der Immunisierung oder von der Individualität der Kaninchen abhängig waren, konnte nicht festgestellt werden. Im allgemeinen kann jedoch bemerkt werden, daß verhältnismäßig die besten Antisera nur dann zu erzielen sind, wenn die Immunisierung nicht über 3 Wochen dauert, wenn die Dosis des Antigens nicht groß ist und dasselbe nicht zu oft verabreicht wird. Die Verlängerung der Immunisierung auf mehr als 4 Wochen ist zwecklos, es sei denn, daß man eine längere Pause einschaltet, wie sie *Raysky* und auch *Roček* empfehlen. Der Durchschnittstiter der in dieser Gruppe der Untersuchungen erzielten Antisera beträgt 1:12394 — ist also der höchste in allen bis jetzt erwähnten Gruppen.

#### 4. Gruppe der Untersuchungen

enthält Kontrollexperimente zwecks Prüfung der Resultate *Fujiwaras*, welcher eine neue und originelle Methode zur Gewinnung hochwertiger Antisera empfiehlt.

Der erwähnte Verf. führt 2 grundsätzliche Modifikationen ein. Erstens verwendet er nicht Normalserum, sondern durch Kochen koaguliertes Serum, zweitens nimmt er zur Immunisierung geringe Mengen des Antigens in kürzeren Intervallen, jeden 2. oder 3. Tag. Nach der Ausführung von 5—10 intravenösen Injektionen — was von der Menge des verwendeten koagulierten Serums abhängt — bestimmt der Verf. die Wertigkeit des Antiserums. Die Resultate, welche *Fujiwara* mittels dieser Methode erzielt, sollen sehr gut sein, wovon man sich übrigens aus den seiner Arbeit beigelegten Tabellen überzeugen kann. Von 10 Kaninchen gab eines ein Antiserum mit Titer 1:50000, eines 1:20000 und ein Kaninchen mit Titer 1:10000.

An dieser an und für sich guten Methode wäre nur auszusetzen, daß die Präcipitation sehr langsam vor sich geht, nämlich nach 1 bis 2 Stunden, was nach der *Uhlenhuths*chen Methode unstatthaft ist, nach welcher bekanntlich die Zeit der Titerbestimmung 20 Min. nicht überschreiten darf, ja in Verdünnungen von 1:20000 soll der Ring

schon nach 5 Min. zu sehen sein. Aber selbst wenn das Erscheinen des Ringes bis zur äußersten Zeit, also bis 20 Min. berücksichtigt würde, so müßten wir auch dann den Titer der Antisera reduzieren im Verhältnis zu den vom Verfasser angegebenen. In diesem Falle könnte nur ein Antiserum als wirklich hochwertig angesehen werden (1:50 000), die anderen hätten einen Titer von 1:20 000 und 1:1000. Es ist begreiflich, daß das Ablesen bis zu 20 Min. nur für praktische forensische Untersuchungen von Bedeutung ist, während bei der rein theoretischen Bearbeitung die Ablesung auch nach 24 Stunden erfolgen kann. In unseren Untersuchungen bestimmten wir ständig den Titer nach der allgemein angenommenen Methode von *Uhlenhuth-Beumer*. Um also unsere Ergebnisse mit denen *Fujiwaras* vergleichen zu können, müssen wir eine Zeitkorrektur vornehmen und die Resultate bis zu 20 Min. ablesen.

Bei der Kontrolle der Experimente von *Fujiwara* hielten wir uns genauestens an seine Vorschriften bei der Zubereitung und Einverleibung des Antigens. Wir immunisierten 7 Kaninchen 10mal jeden 2. Tag in die Ohrvene, und zwar 3 Kaninchen mit Pferdeserum und 4 mit Schweineserum. Während der ganzen Immunisierung verhielten sich die Kaninchen normal, nahmen an Gewicht zu, ohne jede Spur von Überempfindlichkeit, was sehr zugunsten dieser Immunisierungsmethode spricht. 7 Tage nach der letzten Injektion gingen wir an die Probablutentnahme und Titerbestimmung des Antiserums. Die Ergebnisse, die einige Male alle paar Minuten abgelesen wurden, sind aus Tab. 1 ersichtlich und sind ziemlich befrie-

Tabelle 1.

Nr. des Kaninchens	Gewicht des Tieres: am Anf. u. am Ende der Untersuchung	Geschlecht	Infektionsmaterial	Quantum des Antigens	Injektionsart	Zeitintervall zwi- schen Injektionen	Zahl d. Injektionen	Titerbestimmung	Spezifizitätsprüfung
122	2400 2630	♂	Koagulierendes Pferdeserum	0,02 g in 2 ccm 0,85 proz. NaCl	Intravenös	Jeden zweiten Tag	10	1:1000 nach 10 Min. 1:50000 „ 1 Std.	Mit Menschenserum 1:100 deutl. Ring.
123	2900 2780	♂				desgl.	10	1:10000 „ 10 Min. 1:50000 „ 1 Std.	Spezifisch
124	2250 2350	♀				desgl.	10	1:10000 „ 10 Min. 1:20000 „ 30 „	Mit Menschenserum unspezifisch 1:1000
125	2550	♀				desgl.	10	1:50000 „ 20 „ 1:80000 „ 1 Std.	Spezifisch
126	2400 2600	♂	Koagulierendes Schweineserum	desgl.		desgl.	10	1:20000 „ 20 Min.	desgl.
127	2050 2170	♂		desgl.		desgl.	10	1:20000 „ 20 „	desgl.
128	2320 2350	♀		desgl.		desgl.	10	1:10000 „ 15 „	Mit Hammelserum unspezifisch 1:100

digend. Die Antiserumwertigkeit ist in 2 Zahlen angegeben. Die obere Zahl gibt einen Überblick über das Ergebnis der Titerbestimmung bis zu 20 Minuten, die untere bis zu 1 Stunde. Das Vorkommen *einer* Ziffer bedeutet, daß nach längerer Zeit gar keine Änderung in der Reaktion eintrat.

Als charakteristisch für die mittels dieser Methode gewonnenen Präcipitine ist hervorzuheben, daß in einer Verdünnung des Antigens von 1:10 und manchmal auch 1:100 eine deutliche Hemmung der Präcipitation eintrat. Bei einer Verdünnung von 1:1000 war der Niederschlag am größten und schon nach 5 Min. zu sehen. Bei weiterer Verdünnung des Antigens kommt es zu einer unbedeutenden Verminderung der Niederschläge. Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Beobachtungen *Fujiwaras* sind die Ringe weniger deutlich, kommen viel langsamer zum Vorschein und sind sehr zart. Nach der Resumierung der Ergebnisse dieser Gruppe stimmen wir vollständig mit dem Verfasser sowie mit *Laguna* und mit *Meissner* überein, die ebenfalls die Untersuchungen *Fujiwaras* kontrollierten. Die Spezifität der mittels dieser Methode hergestellten Antisera ist recht befriedigend.

Manche Autoren wie *Obermayer*, *Pick*, *Bruyonoghe* und *Meissner* prüften noch das Verhalten der Präcipitation bei Anwendung gekochten Antigens, um die besondere Spezifität der Antisera gegen gekochtes Eiweiß (sog. konstitutive Gruppierung) festzustellen, was wir jedoch nicht nachkontrollierten. Nach *Rosenberg* sollen die mittels gekochten Antigens hergestellten Antisera mehr artspezifisch sein als wie die mittels ungekochten Antigens. Diese Beobachtungen finden jedoch keine Bestätigung in den von *Meissner* ausgeführten Kontrollexperimenten. Nach dieser Verf. „traten im Gegenteil weitgehende unspezifische Reaktionen auf, die durchschnittlich sowohl in der Stärke wie in der Höhe der Reaktion über das bei Nativantiserum mit Nativantigen beobachtete weit hinausgehen“.

#### 5. Gruppe der Untersuchungen.

*Fujiwara* fordert bei der Gewinnung präcipitirender Sera grundsätzlich zweierlei: 1. durch Kochen koaguliertes Antigen und 2. häufige intravenöse Verabreichung desselben in kleinen Dosen. Zwecks Entscheidung, was den faktischen Vorzug der Methode *Fujiwaras* ausmacht, trennten wir die oben angegebenen Prinzipien, um experimentell festzustellen, ob und welchem von ihnen ein entscheidender Einfluß zuzuschreiben ist, bzw. ob beide untrennbar miteinander verknüpft sind.

Zur Beantwortung dieser Frage führten wir eine Reihe von Experimenten aus, in welchen wir koaguliertes Serum 4mal in 7-tägigen Pausen intravenös verabreichten, bzw. normales Serum 10mal jeden 2. Tag. Zu diesen Experimenten verwendeten wir 12 Kaninchen, die wir in 4 Serien einteilten.

1. Serie. Um den Einfluß der Koagulation auf die Präcipitinbildung festzustellen, experimentierten wir an 3 Kaninchen und injizierten 4mal in die Ohrvene koaguliertes Menschen Serum in 7—8-tägigen Pausen. Die Menge des verwendeten Materials betrug pro Kaninchen und Injektion 0,35—0,40 g koaguliertes Serum, welches in 3—4 ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieben wurde (1 ccm

Normalserum entspricht nach *Fujiwara* 0,2 g koagulierten Serums). Diese Serie der Experimente würde also eine Kombination der *Uhlenhuths*chen Methode mit derjenigen *Fujiwaras* darstellen.

2. *Serie*. Wir injizierten weiteren 3 Kaninchen 4 mal in denselben Zeitintervallen koagulierte Serum jedesmal nur 0,02 g. Die Menge des in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung enthaltenen Antigens ist also sehr klein, da zur ganzen Immunisierung ein dem 0,4 ccm Normalserum entsprechendes Quantum verwendet wurde.

3. *Serie*. Den Kaninchen dieser Gruppe injizierten wir Normalserum 10 mal jeden 2. Tag. Dieses Immunisierungsverfahren bezweckte die Feststellung, ob mehr und häufigere Injektionen einen Einfluß auf die Wertigkeit der Antisera ausüben. Zu den Injektionen verwendete man jedesmal 2 ccm Normalmenschenserum.

4. *Serie*. Sie umfaßte 3 Kaninchen und stellte sich die Beantwortung der Frage zur Aufgabe, ob das Wesentliche der Methode *Fujiwaras* auf den kleinen oft angewendeten Dosen des Präcipitinogens beruht. Zu diesem Zwecke injizierten wir den Kaninchen dieser Serie je 0,1 ccm Normalserum. Da die exakte Injektion von  $\frac{1}{10}$  ccm Flüssigkeit Schwierigkeiten bereitet, verdünnten wir unmittelbar vor jeder Injektion das Serum 10fach mit physiologischer Kochsalzlösung.

Sämtliche 12 Kaninchen wurden gleichzeitig immunisiert; alle wurden in gleicher Weise behandelt und gefüttert. Die Injektionen wurden in den oben erwähnten Dosen in die Randvenen des Ohres ausgeführt; allen Kaninchen wurde am 8. Tage nach der letzten Injektion nach 24stündigem Hungern Probelblut entnommen und der Titer nach der *Uhlenhuths*chen Methode bestimmt.

Tab. 2 enthält die Ergebnisse der Titerbestimmung und der Experimente. Ein Blick auf die Tabelle belehrt uns, daß die Kaninchen der 1. Serie verhältnismäßig sehr schwache Antisera lieferten. Die ersten 2 Kaninchen (Nr. 131 und 132) reagierten normal und gaben entsprechende Präcipitine. Das 3. Kaninchen (Nr. 133) reagierte überhaupt nicht auf die Injektionen heterologen Serums und erzeugte gar keine Präcipitine. Die Antisera der Kaninchen 131 und 132 hemmten die Präcipitation in Verdünnungen 1:10 und 1:100. Beim Kaninchen Nr. 133 wurde eine Hemmung nicht beobachtet. Die Tiere wiesen fast gar keine pathologischen Symptome auf; nur nach der 3. und 4. Injektion bekamen sie einen leichten anaphylaktischen Shock, der jedoch nie so heftig war, wie man ihn nach intravenöser Einverleibung derselben Menge von Normalserum beobachtet. Man könnte dies so deuten, daß das koagulierte Eiweiß nicht imstande ist, mit den entsprechenden Antikörpern sofort zu reagieren und daß kleine Dosen des sich langsam zersetzenden Antigens zur allmählichen Neutralisierung der anaphylaktischen Antikörper genügen. Die Ringe, welche bei der Titerbestimmung dieser Antisera entstehen, gleichen denen nach der Methode von *Fujiwara*, d. h. sie sind zart und entstehen langsam. Auch begegnen wir hier dem in der Methode *Fujiwaras* erwähnten Phänomen der Hemmung in Verdünnungen von 1:10 und 1:100.

Etwas bessere Resultate erzielten wir in der 2. Serie, in welcher wir kleine Dosen Antigen verwendeten. Es gelang uns hier nicht, irgendeine

Tabelle 2.

Nr. des Kaninchens	Gewicht	Geschlecht	Qualität, Quantität und Einverleibungsart des des Antigens	Zeitintervall zwischen Injektionen	Zeitintervall zwischen der letzten Injektion u. Blutprobenentnahme	Zahl der Injektionen	Titerbestimmung							Spezifitätsprüfung	Art des Präcipitins	
							Verdünnung des homologen Serums									
							1:10	1:100	1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	1:30000			
131	2400	♂	Intravenös. Kochkoaguliertes Menschenserum 0,85 g pro Injektion	7-8 Tg.	8 Tg.	4	+ Teilw. Hemm.	+ Hemmung	+ 5 Min.	+ 5 Min.	+ 5 Min.	+ 5-7 Min.	+ 30 Min.	Mit Schweineserum 1:100	Menschenpräcipitin desgl.	
132	2190	♂		7-8 Tg.	8 "	4	+ desgl.	+ desgl.	+ 5 Min.	+ 5 Min.	+ 10 Min.	-	-	Mit Pferdeserum 1:10		
133	2450	♀		7-8 Tg.	8 "	4	+ Nach 30-50 Min. Spur.	+ +	+ 5 Min.	-	-	-	-	Mit Schweineserum 1:100		desgl.
134	2550	♀	Intravenös. Kochkoaguliertes Menschen-serum 0,02 g pro Inj.	7-8 Tg.	8 "	4	+ Teilw. Hemm.	+ Teilw. Hemm.	+ 5 Min.	+ 5 Min.	+ 10 Min.	+ 10-20 Min.	+ 1 Std.	Spezifisch	desgl.	
135	2100	♀		7-8 Tg.	8 "	4	+ desgl.	+ +	+ 5 Min.	+ 5 Min.	+ 5 Min.	+ 20 Min.	-	Spezifisch		desgl.
136	1300	♂		7-8 Tg.	8 "	4	+ Hemm.	+ +	+ 5 Min.	+ 5 Min.	+ 5-8 Min.	+ 10-20 Min.	+ 1 Std.	Mit Schweineserum 1:100		desgl.
129	2150	-	Intravenös. Norm Menschenserum 2 ccm pro Inj.	Jeden 2. Tag			+ +	+ Sofort	+ 2 Min.	+ 5 Min.	+ 10 Min.	-	-	Spezifisch	desgl.	
130	1650	♂		8 "	8 "	10	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ 15 Min.	-	Mit Schweine- u. Rinderserum 1:1000	desgl.	
137	1600	♂		8 "	8 "	10	+ +	+ +	+ +	-	-	-	-	Mit Rinderserum 1:10	desgl.	

[illegible]

toxische Wirkung zu bemerken, sie konnte also höchstens ganz unbedeutend sein. Nicht die geringsten Symptome von Überempfindlichkeit waren festzustellen, was auf die geringen Dosen des Antigens zurückzuführen wäre. Zur Immunisierung genügt nämlich ein dem 0,4 ccm Normalserum entsprechendes Quantum, also 20mal weniger als in der *Uhlenhuth*schen Originalmethode. Alle 3 Antisera (134, 135, 136) gaben gute Resultate. Zwei erreichten den Titer 1:30 000, freilich erst nach einer Stunde, das dritte 1:20 000 nach 20 Min. In einer Verdünnung von 1:10 wurde eine starke, 1:100 eine geringere Hemmung beobachtet. Die Art der Ringe und die Zeit ihrer Entstehung ist dieselbe wie bei Verwendung koagulierten Antigens.

Die dritte Serie ähnelt der ersten. In beiden bei Anwendung großer Dosen Präcipitinogens verhältnismäßig niedrige Antiserumtiterwerte. Die Kaninchen zeigten keine anaphylaktischen Symptome, magerten jedoch ab, waren verstimmt, vertrugen sehr schlecht die großen Dosen heterologen Serums. Wir injizierten insgesamt 20 ccm Antigen pro Kaninchen, also 50mal mehr als in der vorherigen Gruppe und 20mal mehr als in der Originalmethode von *Fujiwara*.

Die Reaktion selbst verläuft typisch wie bei Verwendung mittels normaler Antigene hergestellter Antisera. In Verdünnungen von 1 : 10 starke Niederschläge, um so stärker, je größer die Konzentration des homologen Serums ist (also ganz ohne Hemmung). Der Titer ist niedriger als in der 2. und 4. Serie.

Die besten Ergebnisse gaben 3 Kaninchen der 4. Serie (Nr. 138, 139 und 140), welche oft und mit kleinen Dosen Normalserum immunisiert wurden. Ihre Titer überstiegen deutlich 1:30 000. Die Methode, die wir bei der Immunisierung dieser Kaninchen anwendeten, übertrifft die Methode *Fujiwaras* auch darin, daß die Ringe überall sofort und deutlich auftreten, und zwar um so stärker, je stärker die Konzentration des Antigens ist, sie sind jedoch nie so intensiv wie bei der *Uhlenhuth*schen Methode. Die charakteristische Hemmung, die bei der Verwendung der mit koaguliertem Serum erzeugten Präcipitine auftritt, blieb bei den Tieren dieser Serie vollständig aus; auch Überempfindlichkeitssymptome wurden nicht beobachtet.

Um festzustellen, daß die befriedigenden Resultate der 4. Serie bei Immunisierung mit wiederholten und kleinen Dosen nicht zufällig sind, immunisierten wir nach dieser Methode noch 13 Kaninchen (5. Serie, Tab. 2). Sämtliche Kaninchen bekamen je 10 intravenöse Injektionen mit je 0,1 ccm Normalserum, das unmittelbar vorher mit 0,9 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde. Während der Immunisierung waren die meisten Tiere vollständig gesund. Erst bei der 5. und 6. Injektion bekamen manche von ihnen ganz leichte anaphylaktische Symptome. Eine Woche nach der letzten Injektion (beim Kaninchen Nr. 141



nach 11 Tagen) machten wir Probeblutentnahme und Titerbestimmung. Die Ergebnisse (Tab. 2) stimmen mit den Resultaten der an 3 Kaninchen (Tab. 2: Kaninchen Nr. 138, 139 und 140) vorgenommenen Anfangsexperimenten überein. Mit Ausnahme von 2 Antisera (Nr. 159 und 170) besaßen alle einen für praktische Zwecke genügenden Titer; sechs erreichten sogar den Titer von 1:40 000 in dem von *Uhlenhuth* vorgeschriebenen Zeitpunkte. Bei anderen bisher von uns angewendeten Methoden gehörten derart hochwertige Antisera zu den Seltenheiten.

Diese befriedigenden Resultate nach wiederholter Immunisierung mit kleinen Dosen von Präcipitinogen dürften ihre Analogie in der Technik der Gewinnung von Agglutinationsseren (*Pinner*) haben, wo bereits geringe Dosen von bakteriellem Antigen hinreichen, die Produktion von Antikörpern anzuregen, wahrscheinlich, weil so minimale Mengen sogar hochvirulenter Bakterien dem Organismus unschädlich sind. Es ist allgemein bekannt, daß die parenterale Einverleibung von artfremdem Eiweiß einen um so schädlicheren Einfluß auf den Organismus ausübt, je größer die Eiweißmenge und je toxischer dasselbe ist. Schon dieser Umstand, daß die mittels sehr kleiner Dosen immunisierten Tiere nicht erkranken, macht es verständlich, daß sie auch eher hochwertige Antikörper produzieren können. Im Zusammenhang damit soll noch der in letzter Zeit gemachten Experimente gedacht werden, daß die Antikörper sogar dann entstehen, wenn nach intracutaner Injektion des Antigens rasch die Haut herausgeschnitten wird, also noch ehe die ganze Dosis in den Kreislauf gelangt ist.

Was die Spezifität der eben erwähnten Antisera anbetrifft, so sind die Resultate der in dieser Hinsicht durchgeführten Experimente (in der Tabelle nicht erwähnt) weniger befriedigend. Wie bei anderen Immunisierungsmethoden gibt es auch hier einen ziemlich hohen Prozentsatz von Antisera, welche mit konzentrierten Lösungen von artfremdem Eiweiß ebenfalls positive Resultate geben, wobei das Menschenpräcipitin noch am wenigsten spezifisch gegen Schweineeiweiß sich verhält.

Aus der Übersicht der Experimente dieser Gruppe ersehen wir, daß mit der Bestätigung der Ergebnisse *Fujiwaras* auch gleichzeitig entschieden werden kann, ob das Wesentliche dieser Methode in der Art der Immunisierung bzw. Zeitpunkt und Dosis oder in der Kochkoagulation liegt. Wir sehen, daß kleine, intravenöse Dosen von normalem, nicht koaguliertem Antigen genügen, um hochwertige Antikörper zu erzeugen; dagegen ist die Verwendung größerer Dosen Antigens zwecklos, ja schädlich, da das Tier erkrankt und dann nicht imstande ist, genügend hochwertige Antikörper zu erzeugen. In den Reaktionen, die mit so gewonnenen Präcipitinen ausgeführt werden, treten die Ringe zwar rasch und deutlich auf, sind jedoch nie mit den Niederschlägen zu vergleichen, die man bei der Immunisierung mit großen Dosen Antigen erzielt, weder

nach der Dichtigkeit noch nach der Menge der Präcipitate. Ferner sank der Titer dieser Präcipitationssera ziemlich stark und rasch, wie sich nach wiederholten Titerbestimmungen dieser Antisera herausstellte. Zwecks Vermeidung dieser Fehler und Erzielung besserer Resultate gingen wir an die weiteren Experimente.

#### 6. Gruppe der Untersuchungen.

Sie besteht aus 2 Serien. In beiden Serien wurden die Injektionen wiederholter kleiner Antigendosen mit der leicht modifizierten Methode von *Raysky* sowie von *Roček* verbunden, die auf wiederholter Immunisierung beruhen. In der 1. Serie immunisierten wir in 2 Perioden mit etwa 3monatigem Intervall, in der 2. Serie in 3 Perioden mit 2 Intervallen auch von je etwa 3 Monaten. Nach jeder Immunisierung wurden Wertbestimmungen der Antisera vorgenommen.

Die ersten 8 Kaninchen (Tab. 3: Kaninchen 142, 145, 146, 153, 154, 155, 156 und 171) bekamen jeden 2. Tag und im ganzen 7—10 mal 1 cem 10fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Serum. Eine Woche nach der letzten Injektion (bei den Kaninchen 142 und 145 nach 11 bzw. nach 10 Tagen) Probelutentnahme und Titerbestimmung nach *Uhlenhuth*. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, sind die Ergebnisse ziemlich befriedigend. Nach einer Pause von über 3 Monaten wurden noch 5—8 Injektionen gegeben, 1 Woche nach der letzten Injektion der Titer wieder bestimmt. Fast alle Kaninchen gaben hochwertige Präcipitine, eines sogar mit Titer 1:160000, 2 andere 1:80000 nach 5 Minuten. Beim Kaninchen 171 wurden nach 11tägiger Pause nur 2 Injektionen ausgeführt und trotzdem erhöhte sich der Titer vierfach.

Wie erwähnt, enthielt die 2. Serie 2 Intervalle, zwischen der 1. und 2. Serie der Injektionen eine ungefähr 3monatige Pause, zwischen der 2. und 3. Serie eine 4monatige (Tab. 3: Kaninchen 152, 157 und 158) oder 11tägige Unterbrechung (Nr. 163 und 164). Nach jeder Injektionsreihe, die stets nach derselben Methode ausgeführt wurde, wurden die Titer bestimmt und die Tiere zu weiteren Injektionen reserviert. Bei den ersten 3 Kaninchen (Nr. 152, 157 und 158) erhöhte sich der Titer nach jeder Serie fast um das Doppelte; in einem Falle ergab sich sogar der ausnehmend hohe Titer 1:160000; der Präcipitationsring erschien nach 15 Minuten, war zart, jedoch ganz deutlich. Die restlichen 2 Kaninchen (Nr. 163 und 164) gehörten zu Tieren, welche überhaupt gar keine Präcipitine produzieren und deren Serum trotz 3maliger Immunisierung selbst in kleinsten Verdünnungen keine Niederschläge erzeugte. Auch in dieser Gruppe der Experimente konnte man — wenn auch in geringerem Maßstabe — wie in den vorigen Gruppen das interessante Phänomen beobachten, daß die mit kleinen Dosen Antigen gewonnenen Präcipitine trotz hohem Titer keine so starken Niederschläge geben wie die Antisera der mittels hoher Dosen von heterologem Eiweiß immunisierten Tiere. Da uns leider der Apparat von *Nuttall* und *Inchley* nicht zur Verfügung stand, konnten wir die quantitativen Unterschiede in den mittels verschiedener Methoden gewonnenen Antisera nicht feststellen. Die Unterschiede in der Trübung beurteilten wir somit nur mit dem Auge. Zwecks Vermeidung auf Suggestion beruhender Irrtümer wählten wir eine Reihe von Antisera mit gleichnamigem Titer von nach verschiedenen Methoden immunisierten Tieren, führten die Reaktionen in demselben Stativ aus und konnten verhältnismäßig genau vergleichsweise feststellen, wo und in welcher Intensität der Niederschlag auftrat. Auf Grund dieser Experi-

mente überzeugten wir uns, daß kleine und oft wiederholte Dosen Antigen, in einer oder mehreren Injektionsreihen angewandt, im allgemeinen viel hochwertigere Antisera geben als diejenigen, welche mittels großer Dosen Antigen nach älteren Methoden erzielt werden; die Intensität der Ringe ist jedoch schwächer und unterliegt in verschiedenen Konzentrationen von homologem Eiweiß kleinen Schwankungen. Hingegen erzielten wir mit älteren Methoden, z. B. der *Uhlenhuthschen*, Antisera, die zwar nicht so hochwertig waren, die jedoch sehr deutliche und rasch auftretende Niederschläge in kleinen Verdünnungen des Antigens erzeugten (1:100 und 1:1000); in weiteren Verdünnungen werden die Ringe zarter, um endlich in Verdünnungen, welche sich dem Titer des Antiserums nähern, kaum bemerkbar zu machen.

Die Tatsache, daß bei Anwendung desselben Antigens die mittels verschiedener Methoden gewonnenen Antisera verschiedene Niederschläge erzeugen, verschafft uns einen gewissen Einblick in das Entstehungsproblem der Präcipitine. Bei der Immunisierung mit kleinen Dosen Antigen erhalten wir zwar hochwertige Antisera, jedoch mit schwachen Niederschlägen. Diese Antisera sind also quantitativ nicht schlecht, qualitativ minder gut. Umgekehrt erhalten wir bei der Immunisierung mit großen Dosen Antigen qualitativ sehr gute Antisera, die jedoch quantitativ sich verschieden verhalten (deutlich und rasch auftretende Niederschläge bei verschieden hohem Titer). Man könnte daraus den Schluß ziehen, daß Quantität und Qualität der Präcipitine im Serum immunisierter Kaninchen in keinem stabilen Verhältnis zueinander stehen, daß sie je nach der Immunisierungsmethode oder anderen noch unbekannten Faktoren Schwankungen unterliegen können.

Im Zusammenhang damit könnte man das Sinken des ursprünglichen Titers der Präcipitationssera erklären. Bekanntlich sinkt der Titer der Antisera am meisten kurze Zeit nach der Entblutung des Kaninchens. Nach diesem anfänglichen, ziemlich raschen Sinken des Titers lassen sich manchmal die Antisera monatelang, sogar jahrelang aufbewahren, ohne an ihrer Wertigkeit besonders viel einzubüßen. Wenn wir also ein exquisit-quantitatives Serum vor uns haben, welches noch in sehr hohen Verdünnungen langsam auftretende und schwache Niederschläge gibt, so könnte man annehmen, daß dieses Antiserum in der Volumeinheit wenige gewissermaßen akkumulierte Präcipitine enthält, somit zartere Niederschläge erzeugt, sich rascher erschöpft und binnen kurzer Zeit seinen Titer verliert und derart minderwertig wird, daß es für praktische Zwecke sich nicht mehr eignet. Hingegen, je mehr Antikörper in einer Volumeinheit des Präcipitationsserums akkumuliert sind, desto länger läßt es sich ohne bedeutendere Einbuße an seiner Wertigkeit aufbewahren. Um also ein Antiserum, welches sich längere Zeit und unverändert halten kann, zu erzielen, müßte man die Tiere mit größeren Dosen Antigen immunisieren. Man muß also den Organismus nicht nur zur Produktion der Präcipitine anregen, sondern ihn auch zwingen, dieselben in größerer Menge zu erzeugen.

Tabelle 3.

Nr. des Kaninchens	Gewicht	Geschlecht	Zahl der Immunisierungen	Immunisierung I			Zeitintervall zwischen Immunisierung I und II	Immunisierung II		
				Zahl der Injektionen	Einverleibungsart des Antigens	Zeitintervall zwischen der letzten Injektion und Blutprobeentnahme		Zahl der Injektionen	Einverleibungsart des Antigens	Zeitintervall zwischen der letzten Injektion und Blutprobeentnahme
142	2520	♀	2	10	Intravenöse Injektion jeden 2. Tag von 0,1 cem Normalserum verdünnt 1:10 mit 0,85 proz. NaCl	10 Tage	110 Tage	5	Intraperit. Injektion jeden 2. Tag von 0,1 cem Normalserum verdünnt 1:10 mit 0,85 proz. NaCl	7 Tage
145	2700	♂	2	10		11 "	110 "	5		7 "
146	1970	♂	2	10		11 "	110 "	5		7 "
158	2500	♀	2	7		7 "	105 "	5		7 "
154	2400	♂	2	7		7 "	105 "	5		7 "
155	2450	♂	2	7		7 "	105 "	5		7 "
156	2850	♂	2	7		7 "	105 "	5		7 "
171	1870	♂	2	7		7 "	11 "	5		8 "
152	2900	♀	3	9		7 "	105 "	5		10 "
157	2200	♂	3	7		7 "	105 "	5		7 "
158	2800	♀	3	7	Intravenöse Injektion jeden 2. Tag von 0,1 cem Normalserum verdünnt 1:10 mit 0,85 proz. NaCl	7 "	105 "	5	Intraperit. Injektion jeden 2. Tag von 0,1 cem Normalserum verdünnt 1:10 mit 0,85 proz. NaCl	7 "
163	2230	♀	3	10		7 "	89 "	7		10 "
164	2700	♀	3	10		7 "	89 "	7		10 "
172	3150	♀	2	9		—	7 "	3		6 "
173	3000	♀	2	9		—	7 "	3		6 "
174	3650	♀	2	9		—	7 "	3		6 "
175	2650	♀	2	9		—	7 "	3		6 "
176	2850	♂	2	9		—	7 "	3		6 "
177	2400	♂	2	8		—	22 "	1		7 "
178	2500	♂	2	8		—	22 "	1		7 "
179	2000	♂	2	8		—	22 "	1		7 "
180	2550	♂	2	8		—	22 "	1		7 "
199	3100	♀	2	9	Intravenöse Injektion jeden 2. Tag von 0,1 cem Normalserum verdünnt 1:10 mit 0,85 proz. NaCl	8 Tage	24 "	2	Zuerst antianaphylaktisch 0,15 cem Normalserum verdünnt mit 0,85 NaCl bis 1 cem und 1 Std. nachher 2—3 cem Normalserum. Nach 24 Std. wieder Injektion von großer Dosis serum.	7 "
200	3300	♀	2	9		8 "	24 "	2		7 "
201	3100	♀	2	9		8 "	24 "	2		7 "
202	2550	♀	2	9		8 "	24 "	2		7 "
203	2350	♀	1	9		8 "	24 "	2		7 "
204	2450	♀	2	9		8 "	24 "	2		7 "
205	2650	♀	2	9		8 "	24 "	2		7 "
206	1950	♀	2	9		8 "	24 "	2		7 "
207	2200	♀	2	9		8 "	24 "	2		7 "
208	2600	♂	2	10		7 "	33 "	2		7 "
209	3300	♀	2	10	Intravenöse Injektion jeden 2. Tag von 0,1 cem Normalserum verdünnt 1:10 mit 0,85 proz. NaCl	7 "	33 "	2	Zuerst antianaphylaktisch 0,15 cem Normalserum verdünnt mit 0,85 NaCl bis 1 cem und 1 Std. nachher 2—3 cem Normalserum. Nach 24 Std. wieder Injektion von großer Dosis serum.	7 "
210	2000	♂	2	10		7 "	33 "	2		7 "
211	2100	♂	2	10		7 "	33 "	2		7 "
212	2200	♂	2	10		7 "	33 "	2		7 "
213	2550	♂	2	10		7 "	33 "	2		7 "
213	2600	♂	2	10		7 "	33 "	2		7 "

Anmerkung: Kaninehen Nr. 152, 157, 158 wurden nach 130 Tagen zum dritten Male in analoger Weise immunisiert. Titer ihrer Sera stieg nach Immunisierung III ziemlich erheblich, und

Tabelle 3.

Titer nach Immunisierung I	Titer nach Immunisierung II	Spezifizitätsprüfung	Art des Präcipitins
1:20 000 nach 5 Min.	1:160 000 nach 20 Min.	} Mit Pferde- u. Schweineserum 1:1000 Spezifisch	Menschenpräcipitin
1:20 000 „ 10 „	1:80 000 „ 5 „		desgl.
1:10 000 „ 10 „	1:80 000 „ 5 „	desgl.	desgl.
1:20 000 „ 8 „	1:40 000 „ 5 „	desgl.	Schweinepräcipitin
1:1 000 „ 5 „	1:1 000 „ 5 „	Mit Rinderserum 1:100	desgl.
1:20 000 „ 5 „	1:40 000 „ 8 „	Spezifisch	desgl.
1:40 000 „ 10 „	1:40 000 „ 5 „	Mit Menschenserum 1:10	desgl.
1:10 000 „ 15 „	1:40 000 „ 8 „	Spezifisch	Pferdepräcipitin
—	1:10 000 „ 15 „	desgl.	desgl.
1:20 000 „ 5 „	1:40 000 „ 8 „	Mit Menschen-, Pferde- und Rinderserum 1:1000	Schweinepräcipitin
1:20 000 „ 10 „	1:40 000 „ 5 „	desgl.	desgl.
} Trotz dreimaliger Immunisierung besitzt nicht einmal Titer von 1:10		—	Pferdepräcipitin
—	1:40 000 nach 10 Min.	Spezifisch	desgl.
—	1:60 000 „ 15 „	Mit Menschen- und Rinderserum 1:10	desgl.
—	1:20 000 „ 10 „	Mit Menschen- u. Schweineserum 1:100	desgl.
—	1:60 000 „ 10 „	Mit Rinder- und Schweineserum 1:10	desgl.
—	1:10 000 „ 10 „	Spezifisch	desgl.
—	1:80 000 „ 20 „	Mit Schweineserum 1:100	Menschenpräcipitin
Tod vor Titerbestimmung		—	desgl.
—	1:20 000 nach 15 Min.	—	desgl.
—	1:40 000 „ 10 „	Mit Pferdeserum 1:100	desgl.
1:10 000 nach 15 Min.	1:20 000 „ 20 „	Mit Pferdeserum 1:100	desgl.
1:100 „ 5 „	1:10 000 „ 20 „	Mit Schweineserum 1:10	desgl.
1:10 000 „ 10 „	1:10 000 „ 2 „	desgl.	desgl.
1:1 000 „ 20 „	1:1 000 „ 2 „	Mit Pferdeserum 1:1000	desgl.
1:1 000 „ 15 „	1:1 000 „ 2 „	Mit Schweineserum 1:100	desgl.
1:100 „ 5 „	Tod vor Immunisierung II		desgl.
1:1 000 „ 10 „	1:1 000 nach 2 Min.	—	desgl.
1:10 000 „ 5 „	1:10 000 „ 15 „	—	desgl.
1:20 000 „ 10 „	1:20 000 „ 5 „	Mit Pferde- und Schweineserum 1:100	desgl.
1:10 000 „ 5 „	1:40 000 „ 10 „	Mit Pferde-, Schweine- und Menschenserum 1:1000	Pferdepräcipitin
1:1 000 „ 5 „	1:20 000 „ 8 „	desgl.	desgl.
1:1 000 „ 3 „	Tod während Immunisierung II		desgl.
1:1 000 „ 4 „	1:1 000 nach 5 Min.	Spezifisch	desgl.
1:10 000 „ 10 „	1:20 000 „ 20 „	Mit Menschen-, Schweine- und Rinderserum 1:100	desgl.
1:10 000 „ 10 „	1:40 000 „ 20 „	Mit Menschen-, Schweine- und Rinderserum 1:10	desgl.
1:10 000 „ 10 „	1:20 000 „ 10 „	Mit Rinderserum 1:10	desgl.
		Mit Schweine- u. Menschenserum 1:100	

zwar beim Kaninchen Nr. 152 bis 1:20 000, Kaninchen Nr. 157 bis 1:80 000, Kaninchen Nr. 158 bis 1:160 000. Kaninchen Nr. 200 Geburt von 5 Jungen nach 9 Injektionen.

Auf Grund der obigen Experimente und Erfahrungen kamen wir zur Überzeugung, daß die Quantität des zur Immunisierung angewandten Antigens in direktem Verhältnis zur Quantität des Niederschlages steht, selbstverständlich bis zu einer gewissen Grenze. Wenn nämlich die Dosen des Antigens zu groß sind, schädigen sie den immunisierten Organismus und erschöpfen ihn derart, daß seine Fähigkeit zur Bildung von Antikörpern herabgesetzt wird. Die Mehrzahl der früheren allgemein angewandten Methoden zur Gewinnung der Präcipitationssera bediente sich bei der Immunisierung großer Dosen von heterologem Eiweiß. *Fujiwara* führte eine Neuerung ein, indem er nachwies, daß man mittels Injektion auch kleiner Dosen Antigen hochwertige Antisera erzeugen kann. Bei Anwendung älterer Methoden erzielten wir zwar selten quantitativ hochwertige Präcipitine, jedoch von ausgezeichneter Qualität des Niederschlages. Hingegen bei der Immunisierung der Tiere mit kleinen Dosen Präcipitinogens erzielten wir quantitativ hervorragende Antisera, die Niederschläge sind jedoch qualitativ weniger stark und deutlich.

In Berücksichtigung obiger Ergebnisse unserer Experimente, daß die Fähigkeit der Präcipitine, starke oder schwache Niederschläge zu erzeugen, sowie die Sensibilität der Reaktion von der Quantität des Antigens und der Art der Immunisierung abhängen, versuchten wir in der folgenden Gruppe der Experimente die auf großen Dosen heterologen Serums beruhende Immunisierungsmethode mit der Methode der oft wiederholten und kleinen Dosen zu vereinigen und ein Antiserum zu gewinnen, welches die Eigenschaften beider Methoden in sich vereinigt.

#### 7. Gruppe der Untersuchungen.

Wir experimentierten an 24 Kaninchen, die wir in 2 Serien verteilten.

Bei den Kaninchen der 1. Serie führten wir 9 intravenöse Injektionen aus mit je 1 ccm 10fach in physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Normalpferdeserum. Nach 1 wöchiger Pause wurden (zwecks Vermeidung von anaphylaktischem Shock) intraperitoneale Injektionen von je 4 ccm unverdünntem Normalpferdeserum an 3 Tagen gegeben. 6 Tage nach der letzten Injektion Probelutentnahme und Titerbestimmung nach der *Uhlenhuth'schen* Methode. Die Ergebnisse sind aus Tab. 3, Nr. 172—176 ersichtlich.

In der 2. Serie, welche 19 Kaninchen umfaßte, injizierten wir im 1. Teil der Immunisierung kleine Antigendosen (0,1 ccm), welche wir 8—10mal jeden 2. Tag wiederholten. Nach 22—33tägigem Intervall 2. Teil der Immunisierung und zwecks Vermeidung von Anaphylaxie Verabreichung von 0,15—0,2 ccm verdünnten Serums in der vorhin erwähnten Weise. Nach 1 Stunde Seruminjektion entsprechend 1 ccm auf 1 kg Körpergewicht. Am nächsten Tage wiederholte Injektion derselben Dosis. Um Vergleiche anzustellen, führten wir die Titerbestimmung nach der 1. und 2. Immunisierung aus. Die Ergebnisse obiger Experimente sind auf Tab. 3, Nr. 177—213, dargestellt.

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, sind die Antiseratiter beider Serien sehr hoch. Bei der Ausführung der Immunisierung nach älteren Methoden mit großen Dosen Antigens waren solche Antisera von 1:60 000 oder 1:80 000 Seltenheiten. Die von *Fujiwara* erzielten Antisera sind zwar hochwertig genug, besitzen jedoch die oben erwähnten Mängel, welche seine Methode für praktische Zwecke wenig geeignet machen. Die bereits erwähnte Modifikation der Methode *Fujiwaras*, welche auf Anwendung von kleinen Dosen nichtkoagulierten heterologen Serums beruht, beseitigt nur zum Teil die Fehler seiner Originalmethode. Die mittels dieser modifizierten Methode hergestellten Antisera verursachen keine Hemmung des Antigens in Verdünnungen von über 1:10, die Niederschläge sind jedoch nicht viel deutlicher als in der Originalmethode *Fujiwaras*. Die Reaktion dieser Antisera ist zwar quantitativ stark, läßt aber an qualitativer Intensität viel zu wünschen übrig.

Wie erwartet, gaben die Kaninchen beider Serien die besten Antisera von allen bisher erwähnten Methoden.

Offenbar reizten die anfänglichen Injektionen mit oft wiederholten kleinen Antigendosen den Organismus des Kaninchens zur Produktion spezifischer, quantitativ hochwertiger Präcipitine, welche selbst auf geringfügige Dosen Antigen reagierten. Nach der 1. Serie der Injektionen sind jedoch diese Antisera qualitativ noch ungenügend, sie geben nur ganz zarte Niederschläge selbst in niedrigen Antigenverdünnungen. Erst nach der 2. Immunisierungsserie kommt es zu einer bedeutenden Änderung dieses Bildes. In kleinen Verdünnungen entstehen fast sofort starke flockige Niederschläge und auch die Raschheit und Intensität der Reaktion wird verdoppelt. Der Durchschnittstiter der menschlichen Präcipitationssera steigt nur unbedeutend, hingegen kommt es zu einem rascheren Niederschlag, die Qualität und Quantität der Präcipitate wird viel stärker. Der Durchschnittstiter der menschlichen Präcipitine, der nach der 1. Immunisierung 1:5512 betrug, steigt bei der wiederholten Immunisierung auf 1:8857. Hingegen erreicht der Titer der Pferdeantisera, welcher nach der 1. Immunisierung 1:8714 betrug, bei der 2. Immunisierung 1:23 500. Die Intensität und der Verlauf der Reaktion sind die gleichen wie bei Anwendung von menschlichen Präcipitinen. Worauf dieser bedeutende Unterschied im Titer der Menschen- und Pferdeantisera dieser Gruppe der Untersuchungen beruht, ist zur Zeit schwer zu beantworten.

Wir kommen nun zur Besprechung der Spezifizität der Antisera. In dieser Hinsicht überprüften wir die Mehrzahl der auf Tab. 3 angegebenen Antisera mit den am meisten üblichen heterologen Seren, und zwar menschliche Präcipitine mit Rinder-, Pferde- und Schweineserum, Pferdepräcipitine mit Menschen-, Rinder- und Schweineserum. Wie aus

Tab. 3 hervorgeht, sind die Antisera um so weniger spezifisch, einen je höheren Titer sie erreichen. Dieses Phänomen könnte man mit der großen Anzahl der Injektionen erklären, was die Annahme von *Manteufel* und *Beger* bestätigen würde, daß mehr als 3 Injektionen die Spezifität der Präcipitine herabsetzen. Gegen diese Ansicht sprechen die Experimente von *Fujiwara*, welcher ebenfalls zwar mit kleinen, jedoch oft wiederholten Antigendosen immunisierte. Man bemühte sich auch — mehrmals sogar mit Erfolg — nachzuweisen, daß eine größere Spezifität der Präcipitine durch erwärmte Antigene zu erreichen ist. Die nach der Methode *Fujiwaras* gewonnenen menschlichen Präzipitine sollen sehr schwach selbst auf Affeneiweiß reagieren, was übrigens der Verfasser selbst angibt. *Manteufel* und *Beger* stellten bei der Kontrolle der Experimente *Fujiwaras* eine größere Spezifität der auf diese Weise erzielten Präcipitine fest mit Ausnahme der nahe verwandten Tierarten, wo eine Abgrenzung der Heterologie nicht zu bemerken ist. Die letzteren von *Meissner* ausgeführten Experimente weisen keine wesentlichen Unterschiede in der Spezifität der mit normalem und gekochtem Antigen gewonnenen Antisera auf. Sowohl auf Grund eigener Beobachtungen, wie auch hier angeführter fremder Experimente läßt sich auf jeden Fall schwer annehmen, daß nicht denaturierte Antigene eine merkliche Unspezifität verursachen könnten. Man kann höchstens voraussetzen, daß die vorbereitenden Injektionen in der 1. Serie der Immunisierung gerade wegen der kleinen Dosen Antigen eine Allergie höheren Grades hervorrufen als die in anderen Methoden ausgeführten Injektionen mit großen Dosen Antigens, wo die Reaktion des Organismus einen mehr spezifischen als Gruppencharakter aufweist.

Erst nach Beendigung der Experimente dieser Gruppe erschien die Arbeit von *Blumenthal*, welche sich an die Erfahrungen von *Yoshioki* (Antipneumokokkenserum), *Fornet* und *Müller*, sowie *Fujiwara* anlehnt. Der Vorzug der Methode *Blumenthals* beruht auf der wiederholten Verabreichung des Antigens nach einem mindestens so langen Zeitintervall, wie zur Entstehung der Überempfindlichkeit nötig ist. Das erinnert stark an die vom Verf. nicht erwähnten Experimente von *Rayssky* und von *Roček*, welche uns als Grundlage für die von uns bearbeitete Modifikation der wiederholten Immunisierung dienen. Sowohl die Experimente *Blumenthals* wie auch die unserigen geben ganz gute Ergebnisse und beide Arbeiten bestätigen einander.

### 8. Gruppe der Untersuchungen.

Aus dem Institut *H. Pfeiffers* erschien die Arbeit von *Standenath*, in welcher der Verf. auf Grund seiner an 2 Kaninchen ausgeführten Experimente zur Überzeugung gelangt, daß die Ergebnisse bei der Gewinnung der Serumpräcipitine sich steigern, wenn vor der eigentlichen Immunisierung das reticulo-endotheliale System blockiert wird. Zu diesem Zwecke verwendet der Verf. eine neutrale kolloidale Tuscheemulsion. Diese Tusche, von der Firma *Grübler* in Leipzig eigens zu diesem Zwecke hergestellt, ist vollkommen steril, ohne Zusatz schädlicher Antiseptica. Einige Tage vor der Serumimmunisierung injiziert der Verf. intravenös



die entsprechend mit destilliertem Wasser verdünnte Tusche und geht erst dann an die eigentliche Immunisierung des Kaninchens. Wie schon erwähnt, führt der Verf. als Beweismaterial nur 2 Kaninchen an; 2 weitere Kaninchen, welche in derselben Weise mit Serum immunisiert werden, jedoch ohne vorherige Blockade des Reticulo-Endothels, dienen zur Kontrolle. Die mit vorangegangener Blockade des Reticulo-Endothels immunisierten Kaninchen produzieren gute Präcipitine; das eine mit Titer 1:20000, das andere 1:40000, während bei den Kontrolltieren der Titer nur 1:2500 und 1:10000 ausmacht. Das endgültige Ablesen der Ergebnisse geschah nach 16 Stunden, hingegen gibt der Verf. nicht an, wie hoch der Titer nach der üblichen Ablesung, d. h. nach 20 Minuten sich stellte.

Da nicht lange darauf die Publikation von *Nadine-Collon* erschien, nach welcher die Injektionen von Tusche die Produktion der Serumpräcipitine nicht beeinflussen und die Blockade des reticulo-endothelialen Systems auch bei der Gewinnung anderer Antikörper eine untergeordnete Rolle spielt, beschlossen wir, die Sache nachzukontrollieren, indem wir einerseits die Originalexperimente *Standenaths* wiederholten, andererseits unserer in Gruppe 7 beschriebenen Methode die Blockade des Reticulo-Endothels vorausschickten. Als Kontrollmaterial benutzten wir Versuchskaninchen, welche zwar in einem anderen Zeitpunkt, jedoch in derselben Weise immunisiert wurden wie die Kaninchen mit vorheriger Blockade. Um uns die exakte Vergleichung der Ergebnisse zu ermöglichen, benützten wir zur Immunisierung mit vorheriger Tuscheblockade dieselbe Anzahl von Tieren, welche mittels derselben Methode jedoch ohne vorangegangene Blockade immunisiert wurden.

Bei der Wiederholung der Versuche *Standenaths* führten wir an 5 Kaninchen je 2 Injektionen mit kolloidaler Tusche nach *Pfeiffer* aus. 2 Tage nach der 2. Tuscheinjektion führten wir 4 Injektionen mit inaktiviertem Menschenserum aus, und zwar täglich je 2 ccm in die Ohrvene. 10 Tage nach der letzten Injektion Probelutentnahme und Titerbestimmung. 2 Kaninchen gaben einen Titer 1:10000; eines einen Titer 1:1000; 2 fielen gleich nach den Tuscheinjektionen (1 Kaninchen nach der ersten, das 2. unmittelbar nach der wiederholten Injektion).

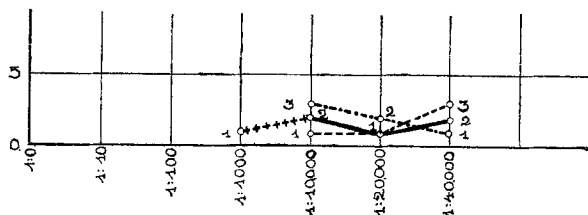
Die nächsten Experimente vollführten wir an 18 Kaninchen und begannen mit der Blockade des Reticulo-Endothels, worauf wir die Tiere nach der genau in der 7. Gruppe der Untersuchungen beschriebenen Methode immunisierten.

In der 1. Serie dieser Experimente führten wir zuerst 2 intravenöse Injektionen mit 1:15 bzw. 1:20 in destilliertem Wasser verdünnter, filtrierter und auf Körpertemperatur erwärmter Tuschelösung aus. Zwischen der 2. und 3. Injektion machten wir eine 3tägige Pause. Vom nächsten Tage nach der letzten Tuscheinjektion ab machten wir 10 intravenöse Injektionen, jeden 2. Tag mit je 0,1 ccm 10fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Pferdeserum. Nach 17tägiger Pause 3 Injektionen von Pferdeserum an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, je 1 ccm Serum auf 1 kg Körpergewicht des Kaninchens. Eine Stunde vor der 1. Injektion der wiederholten Immunisierung Verabreichung von 1 ccm 10fach verdünnten Serums, um einem eventuellen anaphylaktischen Shock vorzubeugen. Ein Kaninchen (Nr. 223) ging während der 1. Immunisierung an Pyämie zugrunde.

In der 2. Serie der Experimente gaben wir — wie in der 1. Serie — zuerst 2 Tuscheinjektionen, nachher führten wir in analoger Weise die 1. Immunisierung durch und 13 Tage nach der letzten Seruminjektion wieder 2 intravenöse Tusche-

injektionen mit 1 tägiger Pause. Diesmal enthielten die wiederholten Tuscheinjektionen die gleichen Dosen, also je 10 ccm 7,5proz. Tuschelösung (ein Kaninchen fiel sofort nach der 2. Tuscheinjektion). 2 Tage später die wiederholte Immunisierung mit Pferdeserum in derselben Weise wie in der vorigen Serie.

In der 3. Serie der Experimente wurde zuerst mit kleinen Dosen vorimmunisiert, 13 Tage später 2mal intravenös mit 1 tägiger Pause je 10 ccm 7,5proz.

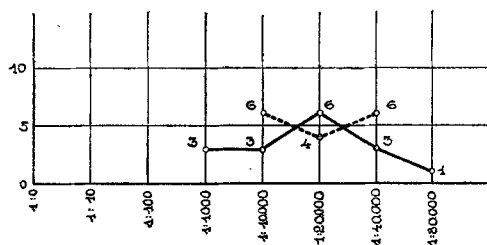


Kurve 4. Die Kreuzlinie bezeichnet die Experimente an den Kaninchen Nr. 214—218. Die fortlaufende Linie bezeichnet die Experimente an den Kaninchen 219—224. Die Strichlinie bezeichnet die Experimente an den Kaninchen Nr. 225—230. Die Strich-Punktlinie bezeichnet die Experimente an den Kaninchen 231—236.

Tusche injiziert. 2 Tage darauf Reimmunisierung in analoger Weise wie in den vorigen Serien.

Es wurde also in der 1. Serie die Tusche nur vor der 1. Immunisierung, in der 2. Serie sowohl vor der 1. wie vor der 2., in der 3. Serie nur vor der 2. Immunisierung gegeben.

Der Titer wurde nach der 1. und 2. Immunisierung untersucht. Die Resultate sind aus Tab. 4 und Kurve 4 ersichtlich.



Kurve 5. Die fortlaufende Linie bezeichnet die Antisera, welche nach der in der 7. Gruppe der Experimente erwähnten Methode erhalten wurden; Kaninchen Nr. 177 bis 213 (mit Ausnahme der gefallen Kaninchen). Die Punktlinie bezeichnet die Antisera, welche nach der in der 8. Gruppe der Experimente erwähnten Methode gewonnen wurden; Kaninchen Nr. 219—236 (mit Ausnahme der gefallen Kaninchen).

Die Ergebnisse stimmen so ziemlich mit der Zusammenstellung auf Tab. Nr. 3 überein, wo die Immunisierung in derselben Weise, jedoch ohne Blockade des Reticulo-Endothels ausgeführt wurde.

Um einen Vergleich mit den Ergebnissen auf Tab. 4 zu ziehen, stellten wir dieselbe Anzahl in gleicher Weise immunisierter Ka-

ninchen zusammen, und zwar Kaninchen Nr. 177, 178, 180, 199, 200, 201, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 212 und 213 (vgl. Tab. 3 und Kurve Nr. 5).

In der 1. Serie, in welcher die Tusche nur vor der ersten Immunisierung verabreicht wurde, ist der Durchschnittstiter der Antisera verhältnismäßig am niedrigsten: 1:14000. In der 2. Serie, wo die Tusche 2mal vor der 1. und nach der 2. Immunisierung angewendet

Tabelle 4.

Nr. des Kaninchens	Gewicht	Geschlecht	I. Tuscheinjektionen	Zeitintervall zwisch. I. Tuscheinjekt. u. Seruminjektion	I. Seruminjektionen	Zeitinterv. zwisch. d. letzt. Seruminj. u. Blutprobeentnahme	I. Titerbestimmung	Pause	II. Tuscheinjektionen	Zeitintervall zwisch. II. Tuscheinj. und II. Seruminjektion	II. Seruminjektionen	Zeitinterv. zwisch. d. letzt. Seruminj. u. Blutprobeentnahme	II. Titerbestimmung	Spezifitätsprüfung	Art der Präcipitine
214	2100	♂	15 ccm	10 %	4 Intrav. Inj. jeden Tag 2 ccm Menschen-serum	10 Tg.	1:10000	Tod	—	—	—	—	—	Spezifisch	Menschenpräcipitin
215	2050	♂	15 "	10 %		10 "	1:10000	—	—	—	—	—	—	—	—
216	2050	♂	15 "	5 %		10 "	1:10000	Tod	—	—	—	—	—	—	—
217	2050	♂	10 "	10 %		10 "	1:10000	—	—	—	—	—	—	Spezifisch	Menschenpräcipitin desgl.
218	2250	♂	10 "	5 %	1 Tag	10 "	1:10000	—	—	—	—	—	—	"	—
219	2170	♂	10 "	5 %	1 "	10 "	1:10000	—	—	—	—	—	—	"	—
220	2500	♂	10 "	1:20	1 "	10 "	1:1000	17 Tg.	—	—	—	7 Tage	1:10000	—	Pferdepräcipitin desgl.
221	2550	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:100	17 "	—	—	—	7 "	1:40000	Mit Menschen-, Rinder- u. Schweineserum 1:1000	Pferdepräcipitin desgl.
222	2200	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:20000	17 "	—	—	—	7 "	1:40000	desgl.	—
223	2450	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:1000	17 "	—	—	—	7 "	1:10000	desgl.	—
224	2750	♂	10 "	1:15	1 "	10 Tg.	1:10000	17 Tg.	—	—	—	7 Tage	1:20000	welchen Tod des Kaninchens eingetreten	Pferdepräcipitin desgl.
225	2070	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:10000	18 "	10 ccm 1:15	2 Tage	—	7 "	1:40000	Mit Menschen-, Rinder- u. Schweineserum 1:1000	Pferdepräcipitin desgl.
226	2600	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:1000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:40000	Spezifisch	—
227	2170	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:10000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:40000	Spezifisch	—
228	2070	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:10000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 Tage	1:40000	Tod des Kaninchens sofort nach letzter Tuscheinjektion	Pferdepräcipitin desgl.
229	2350	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:20000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:40000	Mit Menschen-, Rinder- u. Schweineserum 1:1000	Pferdepräcipitin desgl.
230	2100	♂	10 "	1:15	1 "	10 "	1:20000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:40000	desgl.	—
231	2700	♂	—	—	—	10 "	1:1000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:10000	Mit Rinder- u. Schweineserum 1:100	Pferdepräcipitin desgl.
232	2350	♂	—	—	—	10 "	1:10000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:20000	desgl.	—
233	2300	♂	—	—	—	10 "	1:1000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:10000	desgl.	—
234	2700	♂	—	—	—	10 "	1:10000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:40000	Mit Rinder-, Schweine- u. Menschenserum 1:1000	Pferdepräcipitin desgl.
235	2800	♀	—	—	—	10 "	1:1000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:10000	Mit Menschen- u. Schweineserum 1:100	Pferdepräcipitin desgl.
236	2100	♀	—	—	—	10 "	1:10000	18 "	10 "	1:15	2 "	7 "	1:20000	Mit Menschen-, Rinder- u. Schweineserum 1:1000	Pferdepräcipitin desgl.

wurde, entstanden die besten Resultate mit dem durchschnittlichen Titer 1:30 000. In der 3. Serie endlich, in welcher die Tusche nur vor der 2. Immunisierung verabreicht wurde, war der Durchschnittstiter 1:18 333.

Der Durchschnittstiter aller in diesen 3 Serien erzielten Antisera beträgt 1:23 750.

In analoger Weise stellt sich der Durchschnittstiter der Antisera bei den Kontrollkaninchen dar, er beträgt nämlich 1:22 062.

Die stärkste Abweichung von der Kontrolle besteht in der zweiten Serie (Kaninchen Nr. 225—230), wo der Unterschied zwischen dem Durchschnittstiter der Kontrollantisera und der Antisera dieser Serie 1:7938 ausmacht, zugunsten also derjenigen Kaninchen, bei welchen die Blockade des reticulo-endothelialen Systems 2mal, d. i. vor der 1. und 2. Immunisierung ausgeführt wurde.

Was die Spezifität der Antisera anbetrifft, so stimmen die Ergebnisse ohne bemerkenswerte Unterschiede mit denjenigen der Kontrolltiere überein, wie man sich durch Vergleich der entsprechenden Tabellen überzeugen kann.

Man kann also aus obigen Experimenten den Schluß ziehen, daß die Injektionen von Tusche tatsächlich die Bildung der Präcipitine ziemlich günstig beeinflussen, jedoch nicht in dem Grade, wie in den Experimenten von *Standenath*, welcher mit einer zu geringen Zahl von Tieren experimentierte.

### 9. Gruppe der Untersuchungen.

Diese umfaßt eine Reihe von Experimenten, welche zwecks Gewinnung von Erythropräcipitinen ausgeführt wurden.

Bekanntlich gelang es *Leblanc* und *Klein*, durch Immunisierung der Kaninchen mit menschlichen Hämoglobinlösungen Erythropräcipitine zu gewinnen, welche nur in Hämoglobinlösungen und Blutextrakten Niederschläge erzeugten, hingegen sich negativ gegen hämoglobinfreies Serum verhielten. Auch *Leers* bestätigte diese Experimente. Auf diese Weise würde die Erythropräcipitationsreaktion infolge der spezifischen Wirkung der Erythropräcipitine nur auf homologe Hämoglobinlösungen es ermöglichen, sofort die Art des Hämoglobins zu bestimmen und hätte noch den Vorteil, 2 gesonderte Untersuchungen zu ersparen, nämlich die chemisch-physikalische zum Hämoglobinnachweis und biologische zur Bestimmung der Artspezifität des Blutes, was eine bedeutende Vereinfachung in der Methodik der Blutspurenuntersuchung ausmachen würde.

In unseren Experimenten gingen wir genau nach den Vorschriften *Kleins* vor, nur entnahmen wir das menschliche Blut nicht den Leichen, sondern aus der Nabelschnur. Nach der Blutentnahme und Defibrinierung wurden die Blutkörperchen so lange mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bis dieselbe keine Eiweißreaktion mehr aufwies. Durch 3—4fache Verdünnung mit destilliertem Wasser löste man die Blutkörperchen auf und zentrifugierte alsdann bis zur kompletten Ab-

setzung der Blutschatten (stromata). Nachher führte man vier intravenöse Injektionen von je 2 ccm dieser Hb-Lösung in einwöchigen Intervallen aus. Zu jeder Injektion benützte man immer frisch hergestellte Lösungen. Auf diese Weise immunisierten wir 10 Kaninchen, und zwar 5 mit Hammel- und 5 mit Menschenhämoglobinlösungen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind aus Tab. 5 ersichtlich.

Tabelle 5.

Nr. des Kaninchens	Gewicht	Geschlecht	Qualität, Quantität u. Einverleibungsart des Antigens	Zeitintervall zwischen der letzten Injektion und Blutprobeentnahme	Titerbestimmung	Anmerkungen
181	2800	♂	4 malige Intravenöse, in einwöchigen Zeitintervallen ausgeführte Injektionen von je 2 ccm immer frisch nach <i>Klein</i> angefertigten Blutfarbstoffextrakts	7 Tage	1: 10—1000 sofort 1: 10 000 nach 10 Min.	Hammelerythropräcipitin
182	2750	♂		7 "	1: 1000 " 10 " schwach 1: 10 000 " 40 " deutlich	desgl.
183	2250	♀		7 "	1: 10 000 " 15 " "	desgl.
184	2050	♀		7 "	1: 10 " 10 " schwach 1: 1000 " 3 " deutlich 1: 10 000 " 40 " schwach	desgl.
185	1950	♂		7 "	1: 10 " 30 " " 1: 1000 " 30 " deutlich 1: 10 000 " 30 " schwach	desgl.
186	2300	♂		7 "	1: 10 " 10 " "	Menschenerythropräcipitin
187	2600	♀		7 "	1: 10 " 10 " "	desgl.
188	2250	♂		7 "	1: 10 " 10 " "	desgl.
189	2300	♀		7 "	1: 10 " 10 " "	desgl.
190	1850	♀		7 "	1: 10 " 10 " Spur 1: 10 000 " 10 " schwach	desgl.

Die Hammelerythropräcipitine sind im allgemeinen ziemlich gut; auf 5 Kaninchen gaben 2 einen Titer 1:1000 und 3 1:10 000. Hingegen läßt die Wertigkeit der Menschenerythropräcipitine viel zu wünschen übrig: nur 1 Antiserum gab einen Titer 1:10 000, 4 kaum 1:10, also soviel wie Null. Worauf dieser Unterschied beruht, läßt sich zur Zeit schwer beantworten: ob die Antigeneigenschaften der menschlichen Hb-Lösungen kleiner sind, oder ob die Kaninchen der einen Gruppe zufällig stärker als die der anderen Gruppe reagierten. Es ist dies um so sonderbarer, als nach den Experimenten von *Batelli* gerade die Hammelhämoglobinlösungen sowie die des Schweines und der Ratte toxisch und hämolytisch auf das Kaninchen wirken im Gegensatz zu den Injektionen von Menschen-, Hund-, Katzen- und Rinderhämoglobinlösungen, welche von den Kaninchen gut vertragen werden.

Sämtliche Erythropräcipitine unserer Experimente erwiesen sich als streng art- und organspezifisch, was auch die Kontrollexperimente bestätigten. Nur sind die Ringe in der Erythropräcipitationsreaktion viel zarter und erscheinen viel langsamer als bei den Serumpräcipitinen, verursachen auch eine ständige Hemmung in Antigenlösungen von 1:10 und 1:100, was bei Serumpräcipitinen selten vorkommt. Die höchste Intensität der Ringe kommt in Antigenverdünnungen von 1:1000 vor.

Die Ergebnisse aus den Experimenten dieser Gruppe bestätigen also die Erfahrungen der mit dem Problem der Erythropräcipitation sich befassenden Autoren, daß die Gewinnung so hochwertiger Menschenerythropräcipitine, wie es die Praxis voraussetzt, sehr schwer ist<sup>1</sup>, da aus kleinen und meistens älteren Blutspuren die Gewinnung genügend konzentrierter Hämoglobininlösungen nicht gelingt. Daher wird die Erythropräcipitationsreaktion — wenigstens so wie die Sachen jetzt stehen — keinen festen Fuß in der gerichtlichen Medizin fassen können, da man bei der Untersuchung von Blutspuren mittels chemisch-physikalischer Proben und der ihnen folgenden Serumpräcipitationsreaktion viel sicherer zum Ziele gelangt.

#### *Schlußfolgerungen.*

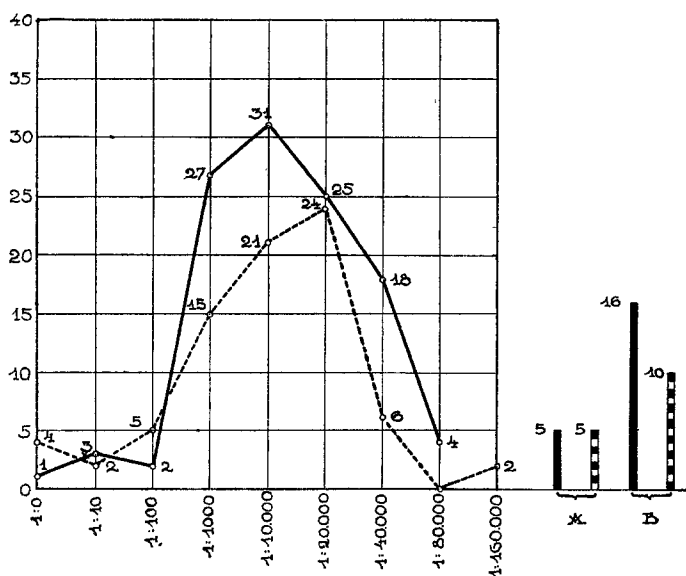
Wie bereits eingangs erwähnt, stützten wir uns in unseren Experimenten auf ein Material von 237 Kaninchen, wovon 134 Männchen, 95 Weibchen, in 11 Fällen ist das Geschlecht im Protokoll nicht bezeichnet, waren. Wir bemerkten hierbei in Übereinstimmung mit anderen Verfassern, daß die Männchen sich besser zur Gewinnung der Präcipitine eignen als die Weibchen. Die Unterschiede sind jedoch ziemlich unbedeutend. Der Durchschnittstitel der Antisera der Männchen beträgt 1:18189, der der Weibchen 1:16019 (vgl. Kurve Nr. 6).

In unseren Experimenten immunisierten wir die Kaninchen mit Menschen-, Pferde-, Rinder- und Schweineserum. Obgleich in manchen Serien unserer Experimente die Ergebnisse zugunsten des einen oder des anderen Serums sprachen, bemerkten wir bei der prozentualen Berechnung sämtlicher Experimente keine bemerkenswerten Unterschiede in den Antigeneigenschaften der erwähnten Sera. Hingegen ließen sich bedeutende Unterschiede zwischen Menschen- und Hammelerythropräcipitinen zugunsten der letzteren nachweisen.

Was den Einfluß der Jahreszeit auf die Wertigkeit der Präcipitationssera betrifft, so berücksichtigen wir — wie die anderen Verfasser — eine kalte, während welcher die Tiere nur mit Hafer, Heu und Rüben gefüttert wurden, und eine warme Jahreszeit, wo den Tieren außer dem oben erwähnten Futter noch frisches Gras verabreicht wurde. Vom Ein-

<sup>1</sup> Erst nach der Drucklegung unserer Arbeit erschien im Band 11 dieser Zeitschrift die Mitteilung *Fujiwaras* über Herstellung hochwertiger Hämoglobinpräcipitine.

fluß der Vitamine sehen wir hier ab, da sie in beiden Futterarten enthalten sind. Die Unterschiede im Titer der Präcipitine, welche in diesen Jahreszeiten gewonnen wurden, sind ziemlich groß, sie betragen nämlich  $\frac{1}{3}$  des Durchschnittstiters. Der Durchschnittstiter der Präcipitine aus den Wintermonaten November bis April beträgt nämlich 1:14 617, dagegen der aus den Sommermonaten 1:21 023. In den Wintermonaten gaben 14 Kaninchen gar keine oder nur ganz schwache Präcipitine; hingegen betrug selbst der niedrigste Titer der Präcipitine in den Sommermonaten 1:1000. Auch der Verlust an Kaninchen durch ana-

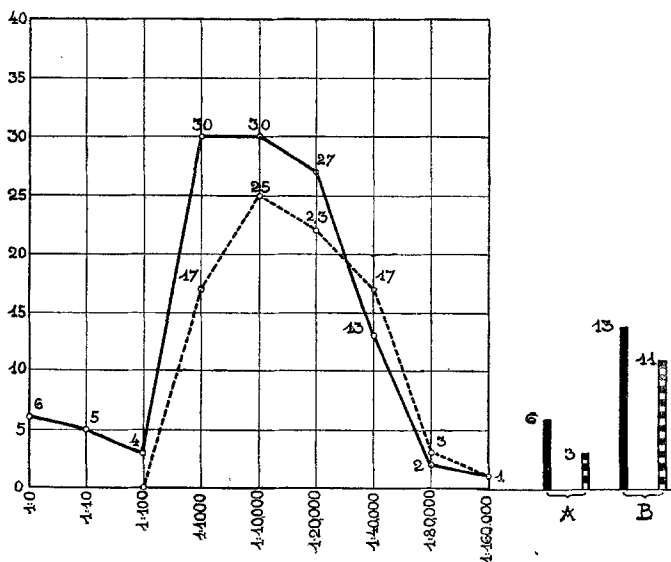


Kurve 6. Die fortlaufende Linie bezeichnet das männliche Geschlecht der Tiere; Durchschnittstiter der Antisera 1:18,189. Die punktierte Linie bezeichnet das weibliche Geschlecht der Tiere; Durchschnittstiter der Antisera 1:16,019. A bezeichnet die Tiere, welche an anaphylaktischem Shock zugrunde gingen. B bezeichnet die Tiere, welche aus anderen Gründen fielen.

phylaktischen Shock oder aus anderen Ursachen ist größer in den Wintermonaten als in den Sommermonaten. Kurve Nr. 7 gibt die graphische Darstellung dieser Verhältnisse. Erwähnt sei noch, daß nach den Ergebnissen der Experimente von *Manteufel* und *Beger* sowie von *Meissner* auch die Spezifität der Präcipitine in gewissem Grade von der Jahreszeit abhängig ist. In den Sommermonaten erhielten sie nämlich eine größere Menge spezifischer Antisera als in den Wintermonaten, was unsere Experimente ebenfalls bestätigen.

Als beste Immunisierungsmethode, welche in jeder Hinsicht die besten Präcipitine liefert, muß die Methode der wiederholten Immunisierung angesehen werden, wie aus den Ergebnissen der 5., 6. und 7. Gruppe unserer Experimente hervorgeht. Sämtliche Präcipitine

dieser Gruppen gaben die höchsten Titer und reagierten sowohl qualitativ wie auch quantitativ am besten. Die Präcipitate entstehen prompt, sind dicht und reichlich. In Antigenverdünnungen von 1:10 bis 1:1000 bemerken wir schon nach einer Minute auf dem Boden des Röhrchens einen reichlichen Niederschlag. Eine Hemmung läßt sich nicht nachweisen. Auch die Spezifität der Präcipitine — wenn man von den ziemlich bedeutenden, jedoch in den forensischen Blutuntersuchungen nicht in Betracht kommenden Konzentrationen (1:10 bis 1:100) des heterologen Eiweißes absieht — bleibt hinter der Spezifität derjenigen



Kurve 7. Die fortlaufende Linie bezeichnet die Monate: November, Dezember, Januar, Februar, März und April; Durchschnittstiters der Antisera 1:14,617. Die punktierte Linie bezeichnet die Monate: Mai, Juni, Juli, August, September und Oktober; Durchschnittstiters der Antisera 1:21,028. A bezeichnet die Tiere, welche an anaphylaktischem Shock zugrunde gingen. B bezeichnet die Tiere, welche aus anderen Gründen fielen.

Präcipitine nicht zurück, welche nach anderen Immunisierungsmethoden gewonnen wurden. Die Kaninchen unserer Methode, welche während der 1. Immunisierung mittels kleiner, oft wiederholter Dosen normalen Serums zur Bildung sehr empfindlicher Präcipitine angeregt wurden, produzieren unter dem Einflusse der Antigeninjektionen bei der wiederholten Immunisierung spezifische Präcipitine in großer Menge. Die 1. Immunisierung kann also gewissermaßen als eine allmähliche Vorbereitung des tierischen Organismus betrachtet werden, um im Bedarfsfalle eine größere Menge von Präcipitinen produzieren zu können. Die Blockade des reticulo-endothelialen Systems vor der ersten und vor der wiederholten Immunisierung übt einen noch etwas günstigeren Einfluß auf die Wertigkeit der Präcipitationssera aus (wie aus der 8. Gruppe



unserer Experimente, 2. Serie der Tiere, hervorgeht), man muß jedoch in diesem Falle mit einem größeren Verlust an Tieren rechnen. Im einzelnen würde sich also unsere Immunisierungsmethode der Kaninchen zwecks Gewinnung hochwertiger Präcipitationssera folgendermaßen darstellen:

1. Blockade des Reticuloendothels mittels zweier intravenöser Injektionen von 5—7,5% kolloidaler Tuschelösung in eintägigem Intervall.
2. Erste vorbereitende Immunisierung mittels zehn, jeden zweiten Tag ausgeführter intravenöser Injektionen von je 0,1 ccm Normalserum + 0,9 ccm physiologischer Kochsalzlösung.
3. Pause von einigen Wochen bis einigen Monaten.
4. Wiederholte Blockade des reticuloendothelialen Systems wie unter 1.
5. Wiederholte Immunisierung mit einigen intravenösen Injektionen Normalserums 1 ccm auf 1 kg Körpergewicht des Kaninchens in eintägigen Intervallen. Zwecks Verhütung eines anaphylaktischen Shocks eine Stunde vor der ersten Injektion intravenöse Injektion von 0,1 ccm Serum + 0,9 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Die Art der Antigeneinverleibung, die Ausführung der Probeblutentnahme und Titerbestimmung sowie der Entblutung der Tiere, wie sie sich auf Grund unserer Experimente als die besten erwiesen, sind eingangs in der Technik der Untersuchungen dargestellt.

Was die Konservierung der Präcipitationssera anbetrifft, erwies sich von allen angegebenen Methoden die Aufbewahrung in flüssigem Zustande, steril, an kühlem und dunklem Orte, in eingeschmolzenen Glasampullen als die beste. Von zahlreichen vorgeschlagenen Serumkonservierungszusätzen (Chloroform, Diaphtherin, Phenol, Trikresol, Lysoform, Xylol, Benzol, Toluol, Chinosol, Sublimat, Formalin, Glycerin usw.) bewährte sich noch am meisten ein 0,25—0,5proz. Phenolzusatz, oder, wie es *Beger* empfiehlt, das Eintauchen auf etliche Tage eines Kupferplättchens in das Serum. Wir überzeugten uns, daß die nach der Methode *Begers* konservierten Antisera wirklich steril waren, jedoch eine deutlich grüne Färbung annahmen, was einiges Mißtrauen beim Ankauf solcher Antisera erweckt und auch die Ablesung ihrer Titer nicht erleichtert. Die mittels Phenolzusatz aufbewahrten Antisera verhielten sich im allgemeinen ähnlich wie die sterilen Sera, nur fällt ihr Titer rascher. So z. B. stellten wir einige nach derselben Methode gewonnenen Präcipitationssera zusammen, von denen die einen mit 0,25—0,5proz. Phenollösung, die anderen aseptisch konserviert wurden. Der Durchschnittstiter der Antisera mit Phenolzusatz, welcher nach der Entblutung 1:28000 ausmachte, fiel nach 12—18 Monaten auf 1:4200, also ungefähr sechsfach. Hingegen fiel der Durchschnittstiter der aseptisch aufbewahrten Antisera, welcher nach der Entblutung 1:18125 war, nach 12—18 Monaten auf 1:6875, also nur etwas über 50%. Auf Grund unserer Experimente kamen wir jedoch zur Überzeugung, daß

die länger als 12—18 Monate konservierten Präcipitationssera ohne Rücksicht auf die Art ihrer Gewinnung im allgemeinen selten einen genügend hohen Titer beibehalten, um in der Praxis noch verwendet werden zu können. Nur ausnahmsweise behalten manche Antisera ihren hohen Titer eine Reihe von Jahren. So behielten z. B. von 18 steril ohne Zusatz von Antiseptica 4—6 Jahre aufbewahrten Antiseren nur 4 einen Titer von 1:10000, also einen evtl. für praktische Zwecke noch geeigneten Wert. Hingegen behielt von den mit Phenolzusatz konservierten Antiseren nur ein Antiserum noch nach 6 Jahren seinen anfänglichen Titer 1:5000; ein Antiserum mit anfänglichem Titer 1:20000 behielt ihn unverändert 2 Jahre, nach 6 Jahren präcipitierte es nur in Antigenkonzentrationen von 1:10. Auch unsere Experimente bestätigen also in dieser Hinsicht die Erfahrungen anderer Verfasser, vor allem *Uhlenhuths*, daß die Präcipitationssera sich am besten ohne Zusatz von antiseptischen Mitteln aufbewahren lassen.

#### Literaturverzeichnis.

- Batelli* (1905), Bull. Soc. biol. **48**, 450 — Fol. haemat. (Lpz.) **2**. — *Beger*, H. (1924), Zbl. Bakter. I Orig. **91**, 519. — *Blumenthal*, E. (1927), Dtsch. Z. gerichtl. Med. **10**, 17. — *Bonhoff*, H., und *M. Tsuzuki* (1909), Z. Immun.forschg **4**, 180 u. 194. — *Bruyonoghe*, R. (1924), C. r. Soc. Biol. **91**, Nr 24, 384—386 — (1924), Arch. internat. Méd. expér. **1**, 373. — *Bull*, C. G., und *W. King* (1923), Amer. J. Hyg. **3**, 491. — *Collon*, *Nadine G.* (1927), C. r. Soc. Biol. **96**, 427. — *Dikoff* (1926), Zbl. Bakter. I Orig. **99**, 478. — *Dold*, H. (1921), in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden Abt. **13**, T. 2, H. 1, 97. — *v. Dungern* (1903), Die Antikörper. Jena, Fischer. — *Fornet*, W., und *M. Müller* (1908), Z. f. biol. Techn. u. Methodik **1**, H. 3 — (1910), Z. Hyg. **66**, 215. — *Fujiwara*, K. (1922), Dtsch. Z. gerichtl. Med. **1**, 562. — *Gay*, F. P., und *T. G. Fitzgerald* (1912), Univ. California Publ. Path. **2**, Nr 8. — *Hectoën*, L. (1914), J. inf. Dis. **14**, 403. — *Kraus*, R. (1913), in Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen **3**. — *Laguna*, S. (1926), Now. Lekarskie, **38**, 423. — *Leers*, O. (1910), Die forensische Blutuntersuchung. Springer, Berlin. — *Leblanc* (1901—1903), Contribution à l'étude de l'imm. acquise. Cellule T. **18**. — *Manteufel*, P., und *H. Beger* (1921), Z. Immun.forschg **33**, 348. — *Meissner*, G. (1923), Zbl. Bakter. I Orig. **100**, 258. — *Klein*, E. (1905), Zbl. Bakter. I Orig. **39**. — *Obermeyer* und *Pick* (1903), Wien. klin. Wschr. S. 659. — *Pfeiffer*, H. (1923), in E. Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden Abt. IV, T. 12, H. 1. — *Pinner*, M. (1921), Beitr. Klin. Tbk. **46**, 460. — *Raysky*, M. (1914), Z. Hyg. **78**, 151. — *Roček* (1914), Arch. f. Hyg. **82**, 321. — *Rosenberg*, R. (1926), Zbl. Bakter. I Orig. **98**, 259. — *Snieszko*, St. (1926), Now. Lekarskie, **38**, 452. — *Standenath*, F., (1923) Z. Immun.forschg Org. **38**, 19. — *Trommsdorff*, R. (1908), Arb. ksl. Gesdh.amt **32**, 2. — *Uhlenhuth*, P. (1901), Dtsch. med. Wschr. S. 82, 260 u. 499. — *Uhlenhuth*, P. und *Beumer* (1903), Z. Med.beamte Nr 5 u. 6. — *Uhlenhuth*, P., und *K. Steffenhagen* (1913), in Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen **3**, 257. — *Uhlenhuth*, P., und *O. Weidanz* (1912), in Kraus-Levaditi, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung **2**, 721. — *Wachholz*, L. (1920), Med. sadowa. Kraków. — *Wachholz*, L., und *J. Olbrycht* (1924), Med. kryminalna. Warszawa.