

(Aus dem Chemischen Untersuchungsamt der Stadt Stuttgart.)

Warum kann die Präcipitinreaktion versagen?

Von

O. Mezger, H. Jesser und M. Volkmann.

Ein Ehemann stand im Verdacht, seiner Frau den Schädel eingeschlagen zu haben. Es wurden zur Untersuchung eingeliefert: 1 Schrubber mit Stiel, 1 Holzkistchen und 1 Beil. Am Schrubber sowohl als auch an dessen Stiel (etwa in der Mitte) sowie am Kistchen fanden sich blutverdächtige Flecken, am Beil dagegen waren keine solche zu sehen. Die Benzidinreaktion fiel bei den verdächtigen Flecken am Schrubber, dessen Stiel und am Kistchen positiv aus, auch gelang es, Teichmannsche Krystalle von den genannten verdächtigen Flecken herzustellen. Der Nachweis, daß Blut vorlag, war somit erbracht. Der Ehemann hatte ein Geständnis abgelegt und es war somit bei der serologischen Untersuchung eine positive Menscheneiweißreaktion zu erwarten. Für diese Untersuchung wurde unsererseits das Blut von den Holzteilen abgeschabt und in üblicher Weise mit physiologischer Kochsalzlösung auf Eiweißverdünnungen von 1 : 1000 gebracht. Die Reaktion mit einem präcipitierenden hochwertigen Menschenantiserum fiel nun wider Erwarten (innerhalb von 5 Minuten) negativ aus. Man mußte deshalb — trotz des Geständnisses — daran denken, daß evtl. doch eine andere Blutart vorliegen könnte. Wir prüften daher weiter mit verschiedenen anderen Antiseren und zwar mit Hühner-, Katzen-, Kaninchen-, Hunde-, Schweine-, Rinder-, Pferde-, Ratten- und Mäuseantiserum. Die Reaktion verlief aber mit allen diesen Antiseren ebenfalls negativ. Nach diesem durchweg negativen Befund erwogen wir nun die Möglichkeit, ob die betreffenden Gegenstände evtl. nach der Tat mit Chemikalien (z. B. Soda) in Berührung gekommen sein könnten. Es konnten aber weder Laugen noch Säuren in den Holzauszügen nachgewiesen werden. Auch wäre es evtl. möglich gewesen, daß ein Teil des Untersuchungsmaterials in der Nähe des Ofens längere Zeit gelagert hätte und infolge zu starker Erwärmung das Eiweiß nicht mehr in Lösung gegangen wäre. Wir entnahmen daher noch blutverdächtige Stellen vom Fußboden des Tatzimmers. Diese blutverdächtigen Stellen waren zweifellos nicht erwärmt, da die verdächtigen Stellen sich in der Mitte des Zimmers, ent-

fernt vom Ofen befanden. Auch an diesen Stellen konnten weder Laugen noch Säuren nachgewiesen werden. Die Präcipitinreaktion mit Menschenantiserum fiel auch bei den Auszügen aus diesen Flecken innerhalb von 5 Minuten negativ aus. Bei einer Wiederholung der Untersuchung der betreffenden Gegenstände mit einem anderen hochwertigen Menschenantiserum trat eine schwach positive Reaktion erst nach etwa $1/2$ Stunde ein. (Solche Reaktionen dürfen natürlich an sich nicht als positive Reaktionen gewertet werden.) Es mußte hier ein ganz besonderer Fall vorliegen, und wir vermuteten, daß irgendeine unbekannte Ursache das Eintreten der Präcipitinreaktion verhinderte. Nach Meinung des sezierenden Arztes bestand die Möglichkeit, daß zu dem Blut auch wohl noch *Liquor aus den Hirnwunden* hinzugetreten sein könnte.

Im Interesse der weiteren Klärung des Falles ließen wir uns von einem Arzt eines hiesigen Krankenhauses von ein und demselben Individuum sowohl Blut als auch Liquor geben. Blut sowie Liquor mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Eiweißverdünnung von 1 : 1000 gebracht und mittels der Salpetersäurekochprobe in üblicher Weise geprüft, gaben innerhalb von 5 Minuten mit einem präcipitierenden Menschenantiserum starke Reaktionen. Ebenso lieferte eine *Mischung* von Blut und Liquor eine deutlich positive Reaktion. Um nun der Sache weiter auf den Grund zu gehen, haben wir auf ein Tannenholzbrett einerseits Menschenblut, andererseits Menschenblut mit Liquor gemischt, an der Luft bei Zimmertemperatur eingetrocknet. Den übrigen frischen Liquor trockneten wir einerseits im Porzellanschälchen im Faust-Heimschen Apparat bei 37° ein, andererseits in Porzellanschälchen bei Zimmertemperatur an der Luft. Ferner fingen wir einige Tropfen Menschenblut aus einer frischen Wunde auf demselben Brettchen auf und ließen sie ebenfalls eintrocknen. Nach etwa 14 Tagen kratzten wir vorsichtig von allen eingetrockneten Substanzen die oberste Schicht ab, lösten dieselbe wie üblich in physiologischer Kochsalzlösung und brachten diese Lösungen wieder auf eine Eiweißverdünnung von 1 : 1000. Die untere Blutschicht, die in das Holz eingezogen war (in der Hauptsache wohl Blutserum und Liquor) wurde aus dem Brettchen dünn herausgeschnitten, mit physiologischer Kochsalzlösung ausgelaugt und ebenfalls auf 1 : 1000 eingestellt. Dann wurde noch Menschenblutkuchen und Serum (von ein und demselben Blutspender stammend) getrennt — auch in Verdünnungen 1 : 1000 — für die folgenden Reaktionen mit herangezogen. Jetzt versetzten wir alle diese Lösungen, welche eine Eiweißkonzentration von 1 : 1000 hatten, mit einem hochwertigen präcipitierenden Menschenantiserum. Dabei zeigte es sich, daß alle Lösungen aus der unteren, in das Holz eingezogenen Schicht, eine stärkere Reaktion gaben als die Lösungen von der oberen Schicht. Nur in 2 Fällen war die Reaktion sowohl aus der oberen als aus der unteren Schicht

gleich stark. Bei *nicht* eingetrocknetem *Blutkuchen* trat *gar keine*, dagegen in dem nicht eingetrockneten Serum eine *starke* Reaktion ein. Blut + Liquor auf Holz eingetrocknet verhielten sich ebenso: Obere Schicht schwache, untere Schicht stärkere Reaktion. Aus dem Liquor, welcher im Faust-Heimschen Apparat eingetrocknet war, war kein Eiweiß mehr in Lösung zu bringen. Die Präcipitinreaktion fiel dementsprechend negativ aus. Der Liquor, der im Zimmer an der Luft eingetrocknet wurde, enthielt dagegen lösliches Eiweiß und gab eine sehr schwach positive Reaktion. Zwischen einem Liquor, bei dem der Wassermann positiv war und einem Wassermann-negativen Liquor war bei der Präcipitinreaktion kein Unterschied wahrzunehmen.

Es liegt also die Möglichkeit vor, daß das bei der Untersuchung beobachtete negative Ergebnis darauf zurückzuführen ist, daß in der Hauptsache nur das Blut von der oberen Fläche der Untersuchungsobjekte zur Untersuchung gelangte. Um weiteren Aufschluß in der Sache zu bekommen, haben wir ein Kaninchen (Nr. 1) mit Menschenblutkuchenauszug und ein weiteres (Nr. 2) mit dem Serum desselben Blutes eingespritzt.

Die Gewinnung des Blutkuchens geschah auf folgende Weise: Das frische Menschenblut stand über Nacht im Eisschrank, das klar abgeschiedene Serum wurde durch starkes Zentrifugieren vom Blutkuchen getrennt und letzterer *nicht* ausgewaschen. Der so erhaltene Blutkuchen wurde in großen Petri-Schalen im Faust-Heimschen Apparat eingetrocknet, fein zerrieben und zur Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt, nicht zentrifugiert und nicht filtriert.

Die von diesen beiden Kaninchen 1 und 2 gewonnenen Antiseren (Menschenblutkuchenantiserum = MBK-AS und Menschenblutserum-antiserum = MBS-AS) wurden nun wie folgt weiter geprüft:

Einerseits wurden Verdünnungen hergestellt aus demselben Menschenblutserum, mit dem das Kaninchen 2 eingespritzt worden war, andererseits aus Blutkuchenauszug, mit dem das Kaninchen 1 behandelt worden war. Beide Antiseren gaben noch in Verdünnungen von Menschenblutserum 1 : 20000 deutliche Reaktionen. Das Menschenblutkuchen-Antiserum gab aber mit Menschenblutkuchenauszug 1 : 1000 nur eine schwache Reaktion, während das Menschenblutserum-Antiserum mit Menschenblutkuchenauszug 1 : 1000 überhaupt keine Reaktion gab. Anschließend an diese Versuche haben wir nun nochmals von dem Untersuchungsobjekt das blutbefleckte Material des Schrubbers und der Borsten mit beiden Antiseren geprüft. Hierbei ergab sich folgendes Bild: Wiederum traten Reaktionen erst nach $1/4$ Stunde ein, und zwar war die Reaktion mit dem aus Menschenblutkuchen auszug gewonnenen A.S. etwas stärker als die Reaktion mit dem A.S., welches aus Menschenblutserum hergestellt war.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß MBS-AS u. MBK-AS mit MB-Serum etwa gleich stark reagieren, daß aber Menschenblutkuchen-auszüge 1 : 1000 von MBS-AS überhaupt nicht und von MBK-AS nur schwach gefällt wurden. Ganz so verhielten sich auch die Flecken an dem Untersuchungsmaterial. Daraus muß man für die Praxis schließen, daß der Träger der artspezifischen Reaktion vorwiegend im Serum sitzt. Deshalb ist es erforderlich, daß zumal die präcipitierenden Antiseren fast stets unter Verwendung von Blutserum hergestellt werden, insbesondere das Material, welches das Blutserum aufsaugte, zum Auslaugen, also bei Blutflecken auf Holz, auch Holzbestandteile *unter* den Blutflecken genommen werden und nicht nur die auf dem Holz sitzende rote Kruste. Selbstverständlich muß natürlich nebenher unverdächtiges Holz darauf geprüft werden, ob es an physiologische Kochsalzlösung keine Stoffe abgibt, die in dem Antiserum bzw. einem Normalserum an sich schon Trübungen hervorrufen.

Wir haben schon öfters bei alten Blutflecken durch Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung wohl Eiweiß in Lösung gebracht, konnten aber trotz Anwendung aller möglichen Antiseren mit keinem derselben Präcipitate erhalten. Außerdem beobachteten wir, daß an der Luft von uns eingetrocknete Blutseren — namentlich Menschenserum —, die uns (in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen) zur Herstellung von präcipitierenden Antiseren dienen sollten, so stark verhornten, daß Eiweiß nicht mehr in Lösung ging. Aus diesen Beobachtungen schließen wir, daß auch durch das Unlöslichwerden des Blutserumeiweißes der Nachweis der Blutart evtl. unmöglich werden kann. Das von uns wie oben beschrieben hergestellte Blutkucheneiweißantiserum enthielt wohl vorwiegend auf Blutserum ansprechende Antigene, weil das Einspritzmaterial eben neben Blutkucheneiweiß noch Serum enthielt.

Um nun den Einfluß des Serumeiweißes auszuschalten, haben wir versucht, ein Antiserum von *ausgewaschenen* roten Menschenblutkörperchen zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde das frische Menschenblut über Nacht kalt gestellt (Eisschrank), das abgeschiedene Serum vom Blutkuchen scharf abzentrifugiert, der Blutkuchen mit physiologischer Kochsalzlösung gut durchgemischt, die Aufschwemmung abgegossen und zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung durchgerührt und zentrifugiert, bis anzunehmen war, daß die Blutkörperchen restlos vom Serum befreit waren. Mit den so vorbereiteten roten Blutkörperchen wurden 2 Kaninchen (ein männliches und ein weibliches) je 5 mal (mit einer Aufschwemmung von 2 ccm Menschenblutkörperchen + 3 ccm Kochsalzlösung) in die Bauchhöhle eingespritzt. Nach dieser Zeit (25 Tagen) wurde eine Titerbestimmung vorgenommen, dieselbe verlief in beiden Fällen negativ. Alsdann wurden 2 mal je 2 ccm Blutkörperchenaufschwemmung mit 3 ccm destillier-

tem Wasser gemischt, wobei fast vollständige Lösung eintrat, dann filtriert und dem Filtrat je 0,024 g festes Kochsalz zugesetzt und diese Mischung dann in Abständen von 4 Tagen dem männlichen Kaninchen in die Vene, dem weiblichen in die Bauchhöhle eingespritzt. Das männliche Tier wurde dann nach 3 Tagen noch einmal mit derselben Blutkörperchenmischung, jedoch *unfiltriert*, in die Bauchhöhle eingespritzt, während das weibliche Tier ebenfalls nach 3 Tagen wie zuvor behandelt wurde. 10 Tage nach der letzten Injektion wurden wieder Titerbestimmungen vorgenommen, jedoch wiederum mit negativem Erfolg. Um nun zu sehen, ob die Tiere überhaupt unfähig waren, Antigene zu bilden, erhielten beide Kaninchen 3 Spritzen von je 4 ccm eines frischen Menschennormalserums abwechselungsweise in die Bauchhöhle bzw. in die Vene. Die hierauf vorgenommene Titerbestimmung ergab, daß beide Tiere ein gegen Menschennormalserum hochwertiges Antiserum gebildet hatten.

Damit scheint uns erwiesen, daß man mit ausgewaschenen Menschenblutkörperchen kein Antiserum erzeugen kann. Hat man also in der Praxis Blutflecken, die auf Holz eingetrocknet sind, auf ihre Herkunft serologisch zu untersuchen, so empfiehlt es sich, nicht nur die oberste Schicht abzukratzen und zu untersuchen, sondern auch das in die Tiefe des Holzes gedrungene Serum auszulaugen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Auf Holz angetrocknetes Menschenblut lieferte keine einwandfreie Präcipitinreaktion. Chemikalien, die dieselbe verhindert haben könnten, waren nicht nachzuweisen. Menschlicher Liquor liefert mit Menschenblutantiserum, das durch Einspritzen von Blutserum gewonnen wurde, eine positive Präcipitinreaktion. Menschlicher Liquor und auch Blutsera verschiedener Herkunft können, an der Luft eingetrocknet, so verhornen, daß mit physiologischer Kochsalzlösung kein Eiweiß mehr in Lösung geht. Mit physiologischer Kochsalzlösung wiederholt ausgewaschener und dadurch von Blutserum befreiter menschlicher Blutkuchen lieferte, 2 Kaninchen eingespritzt, kein präcipitierendes Antiserum. Die betreffenden Tiere lieferten aber, mit Blutserum nachbehandelt, beide ein hochwertiges präcipitierendes Menschenantiserum. Bei Blutflecken auf Holz untersuche man nicht nur das oberflächlich abgeschabte, sondern lauge auch das darunterliegende ausgeschnittene Holz aus, in welches das Blutserum eingedrungen ist. Der Träger der Präcipitinreaktion sitzt nicht im Blutkucheneiweiß, sondern im Serum-eiweiß.