

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. H. ELBEL).

Präzipitationsversuche mit *in vitro* faulendem und erhitztem Menschenblutantigen.

Von

Dr. F. L. SCHLEYER.

(*Eingegangen am 11. September 1947.*)

Die nach UHLENHUTH benannte Präzipitinreaktion zur Identifizierung der Blutart wird in der gerichtlich-medizinischen Praxis im allgemeinen in der Weise ausgeführt, daß ein mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellter Auszug des zu untersuchenden Substrates mit verschiedenen artspezifischen Kaninchen-Immunseren (Anti-Mensch, Anti-Rind, Anti-Schaf u. dgl.) in engkalibrigen Röhrchen zusammengebracht (unter- bzw. überschichtet) wird; bei positivem Ausfall der Reaktion mit einem der Testseren tritt an der Berührungsschicht der beiden Flüssigkeiten innerhalb von einigen Minuten ein Trübungsring (Ausflockung) auf (HAUSER, WALCHER I, WERKGARTNER).

Üblicherweise gelangen als präzipitierende Immunseren durch Injektion von Serum der betreffenden Tierart erzeugte Antiseren zur Verwendung, im Rahmen der spezifischen Immunisierung gegen Blut wurde indes eine Antikörperbildung auch durch Injektion von Albumin (NICOLETTI, HEKTOEN und WELKER I), Pseudoglobulin (HEKTOEN-WELKER I), Hämoglobin (zahlreiche Autoren, Lit. bei FUJIWARA II), globinfreiem Hämoglobinextrakt (HEKTOEN und SCHULHOF), Globin (WENT), Erythrocyten (KLEIN, LEERS, MIRTO, HEKTOEN und SCHULHOF), Leukocyten (YORIMITSU), Muskelpreßsaft (MARX), eiweißhaltigem Harn und pleuritischem Exudat (ZIEMKE) erzielt. Allerdings präzipitieren die Hämoglobin- und Blutkörperchen-Antiseren nur Vollblut, Erythrocytenextrakt und Hämoglobin (sowie Globin, MIZOKUTI), sind also antigenspezifisch (ebenso wie Albumin- und Globulin-Antiseren), während Serum- oder Plasma-Antiserum nur homologes Vollblut, Plasma, Serum, Serumalbumin, Fibrinogen und Pseudoglobulin (aber nicht Blutkörperchen oder Hämoglobin, NOLF, UHLENHUTH und WEIDANZ, MEZGER, B. MUELLER), Körperflüssigkeiten, Organ- und Knochenextrakte präzipitiert. Bei Immunisierung mit nativem Globin entstehen Antikörper gegen Globin und Hämoglobin (MIZOKUTI, SUZUKI). Hämoglobinfreies Blutkörperchenstroma erzeugt keine Antikörper (NOLF, MEZGER). Einige andere dieser Relationen sind noch nicht bekannt.

Durch Alkoholfällung oder Hitzegerinnung verliert das als Antigen dienende Bluteiweiß nicht die Fähigkeit zur Antikörpererzeugung, sofern es nicht vollständig denaturiert ist. Daher konnten FUJIWARA I mit kochkoaguliertem Serum eiweiß und DALLA VOLTA und DEL CARPIO und NICOLETTI mit Albumin bzw. Hämoglobin, das durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat und anschließendes Kochen aus Serum bzw. Erythrocyten gewonnen war, hochwertige, spezifische Antiseren erzeugen. Ein durch Immunisierung mit gekochtem Eiweiß gewonnenes Antiserum, das im Gegensatz zum gewöhnlichen „Nativpräzipitin“ als „Hitzepräzipitin“ bezeichnet wird, präzipitiert sowohl gekochtes, wie natives homologes Eiweiß (LOEFFLER, OBERMAYER und PICK, W. A. SCHMIDT I, FORNET und MÜLLER, MARX, ROSENBERG, NICOLETTI), das mit dem nativen Antigen hergestellte Immunserum präzipitiert dagegen durch längeres Kochen denaturiertes Antigen nicht mehr.

Hinsichtlich der Natur der bei der Präzipitinreaktion miteinander in Beziehung tretenden Körper steht fest, daß der durch die Immunisierung erzeugte Antikörper vom Globulin des Immunserums nicht trennbar, wiewohl wahrscheinlich nicht mit ihm identisch ist (BREINL und HAUROWITZ). Das Blutantigen ist an das Bluteiweiß gebunden. Die Untersuchungen und Theorien über das Mengenverhältnis von Antigen und Antikörper im Präzipitat, die Abhängigkeit der Präzipitatsmasse vom quantitativen Antigen-Antikörpervorhältnis, den aktiven Anteil des Präzipitinogens an der Ausflockung, das Wesen der Reaktion („chemisch“ oder mehr „physikalisch“) und ihre optimalen Bedingungen haben keinen unmittelbaren Zusammenhang mit den Fragen, die in dieser Arbeit geklärt werden sollten, können daher übergangen werden.

Ein erfolgreicher Nachweis von Blut mit dem artspezifischen Antiserum hat zur Voraussetzung, daß die zu untersuchende Blutspur denjenigen Bestandteil des Blutes enthält, der als immunisierendes Antigen wirksam gewesen war. So können Blutflecke, die nur noch aus korpuskulären Elementen bestehen, bei denen also das Serum ganz ausgepreßt und dann verdunstet oder in die Unterlage eingesickert ist, bei Verwendung von Serum-Antiserum einen negativen Ausfall der Präzipitinprobe ergeben; es ist dies eine der möglichen Fehlerquellen der Reaktion (MEZGER u. a., MUELLER). Das gleiche gilt für Blutspuren, bei denen, etwa durch zu kurzes Extrahieren, nur Hämoglobin in die Auszugsflüssigkeit übergeht (FUJIWARA II, MUELLER). Ist umgekehrt z. B. bei einem Blutfleck nur Serum in die Unterlage eingedrungen, so wird man bei Extraktion des Stoffes und Verwendung eines Hämoglobin-Antiseraums keine Präzipitierung erwarten dürfen. Im übrigen scheinen sich sowohl die präzipitable Substanz wie das Präzipitin des Immunserums durch Adsorbentien, aber auch durch Aufnahme in Papier und Seide unwirksam machen zu lassen (SHI-KONG).

Dies zur Einführung in dieses Teilgebiet der forensischen Serologie. In eigenen Untersuchungen wurde der Ausfall der Präzipitinreaktion bei menschlichem Blut verfolgt, welches *in vitro* dem natürlichen Fäulnisprozeß unterlag oder der Erhitzung ausgesetzt wurde.

Es ist bekannt, daß Auszüge von Jahren, ja viele Jahrzehnte alten Blutflecken noch präzipitabel sind, ebenso sind bereits kurz nach der Entdeckung der Reaktion entsprechende Versuche mit faulem Leichenblut und im Reagensglas faulendem Blut und mit Trockenspuren unternommen worden. So wiesen UHLENHUTH und seine Mitarbeiter und GRAHAM-SMITH gefaultes Blut noch nach 1, 2 und 10 Jahren als solches nach.

Was *künstlich erhitztes Blut* betrifft, so hat MODICA (1901) Blutflecke „einer hohen Temperatur“ ausgesetzt und mit den Auszügen Präzipitinreaktionen erhalten. CARRARA (1901) fand, daß der Präzipitationsniederschlag bei einer Erhitzung des Fleckes über 70° abzunehmen begann und bei Erhitzung auf 110° kaum noch auftrat. NUTALL (1901) hat Filtrierpapier mit Blutflecken 42 Tage bei 37° und 1 Stunde bei 100° liegen lassen, die Reaktion blieb auslösbar.

FERRAI (1901) stellte fest, daß Menschenblutflecke nach einer Erhitzung von 60 Min. auf 130°, 20 Min. auf 140°, 10 Min. auf 150° und 5—10 Min. auf 160° die Präzipitabilität eingebüßt hatten. BIONDI (1902) konnte die Befunde FERRAIS bestätigen und meinte sagen zu dürfen, daß eine länger fortgesetzte Erhitzung bei mäßig hoher Temperatur (24 Stunden bei 120°) die Serumweiße derartig verändert, daß beim Präzipitationsversuch „nur eine leichte Trübung in Erscheinung tritt.“ — Erwähnt sei, daß NICOLETTI mit durch gekochtes Antigen gewonnenen Antiseren Extrakte aus weit höher erhitzten Blutflecken zur Präzipitation bringen konnte.

Neuerdings gaben SMITH und GLAISTER (1939) folgende eigene Befunde: positive Reaktion mit Auszügen von Blutflecken auf Stoff nach trockener Erhitzung auf 100° für 1—3 Stunden, auf 130 und 140° für 15 bzw. 75 Min., auf 150 und 160° für 15 Min. und auf 200° für 2 Min. Negative Reaktion nach Erhitzung auf 230° für 5 Min. Für die Extraktion des Serums aus den über 160° erhitzten Stoffstückchen war lange Zeit erforderlich. Nach Kochen von Blutflecken auf Stoff in Wasser von 5 Min. bis zu 1 Stunde war die Präzipitabilität erhalten, aber nur bei langer Ausdehnung der Extraktion mit Kochsalzlösung.

Weiterhin beobachtete GRAHAM-SMITH (1903), daß Rinderserum, das im Wasserbad auf 64° und mehr Wassertemperatur erhitzt worden war, bei nachträglicher Lösung in Kochsalzflüssigkeit keinen Niederschlag mit Nativ-Antiserum mehr gab; er folgerte, daß Serum schon nach 3minütigem Erhitzen auf 64° die Präzipitabilität verlor. OBERMAYER und PICK (1903) machten die Feststellung, daß Rinderserum, welches $\frac{1}{2}$ Stunde auf 70° erhitzt worden war, eine deutliche Abschwächung seiner Ausfällbarkeit erfahren hatte. In Versuchen NUTALLS erwies sich 1 Stunde auf 100° erhitztes Serum als nicht mehr präzipitabel.

FORNET und MÜLLER (1910) nahmen wahr, daß die spezifische Präzipitabilität 100fach verdünnten, über der Flamme aufgekochten Pferdeserums noch in Verdünnungen des Serums erhalten war, die weit über der Titergrenze des benutzten Antiserums lagen. Pferdeserumverdünnungen von 1:1000 reagierten nach 8, 10 und 15minütigem Kochen im Wasserbad (bei Anwendung der Ringprobe-Technik) nur noch in Form einer Trübung an der Schichtgrenze, bei 20 Min. langem Kochen fiel die Reaktion negativ aus.

JONES sah an bis zur Trübung erhitztem Serum eine massigere Präzipitierung als an unerhitzten oder weniger erhitzten Vergleichsproben. Die suspendierten koagulierten Eiweißteilchen seien, so sagt er, von einer Hülle nicht denaturierten

Antigens umgeben, das durch das Präzipitin ausgeflockt werde und dabei die koagulierten Eiweißteilchen mit sich reiße. H. SCHMIDT glaubt indes, die intensivere Fällung sei darauf zurückzuführen, daß die denaturierten Eiweißmizellen des Antigens bessere Adsorptionskerne für das Globulin des Immunserums abgeben als die nicht denaturierten.

W. A. SCHMIDT I (1908) hat das Verhalten der Präzipitinreaktion bei erhitztem Bluteiweiß mehr systematisch untersucht. Eine 10 Min. lange Erhitzung unverdünntes Menschenserums bis auf 65° erwies sich als ohne Einfluß, bei Erhitzung auf 68 und 70° ging die Reaktion mit einer gewissen Verzögerung (obwohl qualitativ gleich stark wie vorher) vonstatten. Bei Ausführung der Versuche mit 1:1 und 1:10 verdünntem Serum trat die Präzipitation (Flockenbildung) mit gewöhnlichem Antiserum um so langsamer und in so geringerem Maße ein, je höher die Temperatur gesteigert wurde; immerhin hatte Serum in der Verdünnung von 1:1 nach 1stündigem Erhitzung auf 90° noch eine genügende Präzipitierbarkeit behalten, um seine Artdifferenzierung zu gestatten. Gänzlich negativ wurde die Reaktion in beiden Verdünnungen erst bei Serum, das 30 Min. bei 100° erhitzt worden war. (Abweichend hiervon hatte MARX mit 1:10 verdünntem, 30 Min. auf 100° erhitztem Serum mit Muskelpreßsaft-Nativpräzipitin noch schwache Trübungen erzielt.) — Mit einem „Hitzepräzipitin“ ließ sich die Reaktion allerdings noch nach 3ständigem Kochen von Serum auslösen (SCHMIDT II, ROSENBERG I).

Ferner erhitzte W. A. SCHMIDT Röhrchen mit getrocknetem Pferdeserum im Paraffinbade und fand, daß Kochsalzauszüge von 2 Stunden auf 110° erhitztem Serum noch ebenso rasch und intensiv präzipitiert wurden, wie der Auszug des unerhitzten Serums; 1/2 Stunde auf 130° erhitztes Serum lieferte noch „einen voluminösen Niederschlag“, bei 1 Stunde und 130° war der Niederschlag geringer, aber noch „ziemlich kräftig“, nach 1/2 stündiger Erhitzung bei 150° Null. NUTALL hatte ebenfalls mit trockenem Bluteiweiß bei 1/2 stündigem Erhitzen auf 100° eine positive Reaktion verzeichnet.

Dagegen meint R. ROSENBERG II, daß die Präzipitinreaktion mit gewöhnlichen Antiseren bei über 70° erhitzten Eiweißpräparaten „fast vollkommen“ versage. Sie kochte tierisches, bereits gekochtes Fleisch noch einmal 10 Min. bis 2 Stunden bei 98° im Wasserbad und erhielt mit den Extrakten weder bei Verwendung gewöhnlichen Antiserums, noch auch eines mit hitzekoaguliertem Serum eiweiß nach FUJIWARA bereiteten Antiserums, sondern nur mit durch Immunisierung mittels Muskelkochextrakten gewonnenen Antiseren Präzipitationen. Auch WEIDANZ und BORCHMANN gelang es nicht, mit dem Fleisch heiß geräucherter und danach gebrühter Pferdewurst bei einer Brühdauer von 15 Min. an (Temperatur im Wurstinneren nach Kontrollversuchen von W. A. SCHMIDT dann 86°) eine Präzipitation zu erzielen (in den Extrakten fiel auch die Eiweißprobe negativ aus). In den Untersuchungen FORNETS und MÜLLERS war nach 1stündigem Brühdauer (Temperatur im Wurstinneren 75°) noch eine Präzipitierung möglich; 10 Min. gekochte Brühwurst bzw. Fleisch erforderten zur Auslösung einer (für Fleisch nur schwachen) Präzipitinreaktion eine Kochsalzextraktionsdauer von 48 bzw. 96 Stunden, längeres Kochen ergab negative Resultate. Mittels „Hitzepräzipitinen“ ist die Artdifferenzierung gekochten Fleisches allerdings auch dann noch möglich, wenn die „Nativpräzipitine“ versagen (ROSENBERG).

Bei all diesen Versuchen war indes die Reaktion nicht als Schichtprobe ausgeführt, sondern nach dem sich bildenden flockigen Bodensatz und der Intensität der Klärung der überstehenden Flüssigkeit bewertet worden (nur FORNET und MÜLLER bedienten sich der Schichtprobe), zudem beziehen sie sich nur auf Vollblut oder Serum (oder Fleisch).

Die eigenen Versuche wurden auch auf Plasma und Korpuskeln ausgedehnt.

Um einer unzweideutigen experimentellen Einwirkung und des Angriffes des Präzipitins unmittelbar am Antigen sicher zu gehen, wurde nicht mit „Flecken“ und ihren Extrakten oder mit nachträglich erhitzten Auszügen von Blutflecken, sondern mit den nativen, unverdünnten Blutbestandteilen und (beim erhitzten Blut) ohne koagulationshemmende Zusätze gearbeitet. Unverdünntes hitzegeronnenes Blut bzw. seine koagulierten Einzelbestandteile lösen sich bekanntlich schlecht — ein technisches Hauptproblem derartiger Untersuchungen — so daß die Frage berechtigt ist, ob ein negativer Ausfall der Präzipitinreaktion geronnenen Blutes einer Strukturänderung der präzipitablen Substanz durch die Hitze zuzuschreiben ist, oder nicht vielmehr einfach auf die Unlöslichkeit des Eiweißes infolge der Koagulation zurückgeführt werden muß. Mit anderen Worten: wird das Antigen mit der Koagulation des Eiweißes so *fixiert*, daß es durch das Lösungsmittel nicht mehr eliminierbar ist und *daher* reaktionsunfähig wird, oder wird es durch die Erhitzung spezifisch *verändert* in dem Sinne, daß der Antikörper keinen entsprechenden Ansatzpunkt mehr findet?

Manche Autoren nehmen an, daß die „präzipitable Substanz“ aus einer thermolabilen und einer hitzebeständigen Komponente bestehe, auf diese Weise sei auch die Tatsache der „Hitzepräzipitine“ zu erklären, indem das erhitzte Eiweiß offenbar eine Eigenschaft des Antigens besitze, die entweder durch das Erhitzen allein übriggeblieben oder durch dieses erst gebildet worden sei und bei Immunisierung besondere Antikörper erzeuge, die erhitztem Eiweiß dann in ähnlicher Weise entsprächen „wie das Nativpräzipitin dem nativen Eiweiß“ (W. A. SCHMIDT I). OBERMAYER und PICK dachten an einen Übergang der Artspezifität in eine „Zustandsspezifität“ durch das Erhitzen; ein solches modifiziertes Eiweiß erzeuge bei Immunisierung Antikörper, welche auf die durch Erhitzen veränderte Zustandsphase eines erhitzten Antigens „abgestimmt“ seien. Stellt dann die hitzestabile Substanz etwa eine „haptophore Gruppe“ dar, wie EISENBERG und OBERMAYER und PICK meinten, die zur Bindung an den Antikörper notwendig, aber selbst nicht präzipitabel ist? Oder enthält das Eiweißmolekül, wie W. A. SCHMIDT behauptete, eine ganze *Kette* labiler, präzipitabler Stoffe, die bei fortschreitendem Erhitzen in allmählichem Übergang abgespalten werden und somit trotz unverändertem „Eiweißgehalt“ der Lösung der Reaktion verloren gehen (so daß diese immer langsamer und schwächer verläuft), bis schließlich ein Punkt erreicht wird, an dem die Fällbarkeit des Eiweißantigens — entweder durch Vernichtung aller labilen Gruppen oder durch deren nunmehr zu gering gewordene Anzahl — gänzlich geschwunden ist?

Entscheiden lassen sich diese Fragen nur mit Hilfe komplizierter Immunisierungsversuche. Die eigenen Untersuchungen beschränkten sich auf die Ermittlung, ob bei fortschreitender Fäulnis und bei zunehmender Erhitzung von Blut bzw. seinen Komponenten etwa Veränderungen der präzipitablen Substanz auftreten, die im Ausfall der Reaktion wahrnehmbar werden, d. h. konkret: ob und an welchem Punkte bei der üblichen Technik der Reaktion ein Schwächerwerden oder gar ein Ausbleiben der Reaktion zu verzeichnen ist. Ergebnisse solcher Art könnten nicht nur den Einblick in die Natur des Eiweißantigens vertiefen, sondern auch für die Praxis Hinweise geben, wie sich Blut im Verlaufe der Fäulnis verhält, und inwieweit etwa bei Blutspuren, die langanhaltender oder stärkerer Hitze ausgesetzt waren, noch auf einen positiven Ausfall der Schichtreaktion bei Verwendung gewöhnlicher Antiseren gerechnet werden kann.

Methodik.

Wegen der durch die Zeitumstände bedingten Schwierigkeiten der Antiserumgewinnung (Mangel an Versuchstieren und Tierfutter), um ferner die Versuche dem Routineverfahren möglichst angepaßt zu halten, und um schließlich nur *einen* Bestandteil der Reaktion abzuwandeln, wurde als Testserum nur *Serum-Antiserum* (Titer 1:10000) verwendet; die Titerhöhe des Immunserums war bei dem rein qualitativen Charakter der Versuche an sich irrelevant. Die Reaktion wurde in Glasröhren von 3 mm lichter Weite und 2,5 cm Höhe ausgeführt; im allgemeinen wurde mittels Kapillaren zunächst das Antiserum (1—2 Tropfen) eingefüllt und dieses sodann unter starkem Neigen des Röhrchens mit der gleichen Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit über- bzw. unterschichtet (nicht immer erwies sich das Antiserum als spezifisch schwerer); danach wurde das Röhrchen vorsichtig aufgerichtet, in Plastilmasse gesetzt und unter Herausheben wiederholt gegen einen hellen farblosen Hintergrund betrachtet. Auch hauchfeine Trübungsringe waren auf diese Weise stets deutlich zu erkennen. Die verwendeten Antiseren wurden vorher auf ihre Wirksamkeit gegenüber starken Verdünnungen von Menschen serum geprüft, eine Kontrolle ihrer Artspezifität erübrigte sich begreiflicherweise. Da alle Testseren auch mit unverdünntem Menschen serum scharfe Trübungsringe ergaben, brauchte die Möglichkeit einer initialen Hemmung nicht in die Überlegungen einbezogen zu werden, immerhin wurden aber einige Antigensubstanzen noch verdünnt, um eine Hemmungszone zu umgehen.

Bei der Ausführung der Antigenreaktion ist es allgemein üblich, eine Verdünnung des zu prüfenden (Eiweiß-) Antigens von 1:1000 anzustreben, da bei dieser Konzentration erfahrungsgemäß das Optimum der Reaktion gewährleistet ist. Die ausschließlich qualitative

Natur unserer Versuche, bei denen außerdem gerade wegen der unausbleiblichen Denaturierung der Bluteiweiße eine noch möglichst hohe Eiweißkonzentration erwünscht war, verbot — zumal angesichts der unbekannten wirklichen Eiweißkonzentration der Ausgangsflüssigkeiten — das Arbeiten mit einer solchen Standardverdünnung. Da alle Ausgangssubstrate eine positive Präzipitinreaktion gaben, konnte ein abgeschwächter oder negativer Ausfall eines der Teste im Verlaufe der Untersuchung ohne weiteres auf eine (sei es physikalische, sei es strukturelle) Veränderung des Präzipitinogens bezogen werden.

Es ist theoretisch nicht ausgeschlossen, daß einige der in den zu beschreibenden Versuchen erzielten Präzipitationen eine Herabminderung ihrer potentiellen Intensität erfahren hatten. Das aus Leitungswasser hergestellte destillierte Wasser, das zur Bereitung der als Verdünnungs- und Extraktionsmedium dienenden Kochsalzlösung verwendet wurde, enthält durch Chlorieren reichlich freies Chlor. Dieses wird auch bei mehrfachem Destillieren nicht ganz entfernt und kann mit dem Eiweiß der zu präzipitierenden Lösung eine Chlor-Antigenverbindung eingehen, so daß dem Präzipitin kein oder weniger Antigen zur Verfügung steht, als eigentlich vorhanden war. Diese Fehlermöglichkeit wurde uns indes erst bekannt, als die Versuche im wesentlichen bereits abgeschlossen waren.

An allen Substraten wurde gleichzeitig eine Eiweißreaktion durch Auftröpfen eines Tropfens Sulfosalicylsäure zu einem Tropfen des Extraktes auf dem Objektträger angestellt. Diese Art des Eiweißnachweises war wegen der oft nur sehr geringen Flüssigkeitsmenge, die zu prüfen war, angezeigt. Das Anstellen einer Schaumprobe mit der Spur zur Feststellung ihres Eiweißcharakters war ausgeschlossen wegen der geringen Mengen, und um die oft an sich schon bestehende Trübung nicht noch zu verstärken.

I. Die Präzipitinreaktion an faulendem Blut.

Es wurde geprüft, wie lange auf natürliche Weise sich zersetzendes Blut und Blutkomponenten eine Präzipitation geben. Systematische Versuche in dieser Richtung liegen bisher nicht vor. Zu diesem Zweck wurden Plasma, Serum, durch Ausschleudern und nachträgliches Trocknen auf Filterpapier erhaltener Blutkuchen, sowie durch Natriumzitratzusatz gewonnener Blutkörperchenrückstand bei Zimmertemperatur und Tageslicht der Fäulnis überlassen. Das Plasma nahm im Laufe der Zeit einen moderigen, das Serum einen mehr fötiden Fäulnisgeruch an, der Blutkuchen und der Blutkörperchenrückstand bekamen allmählich einen mehr aromatischen Ton. Mit den Flüssigkeiten bzw. Verdünnungen wurde zunächst wöchentlich, später in größeren Abständen die Präzipitinreaktion angestellt. Die Ergebnisse waren folgende:

1. *Plasma.* Während die Reaktion nach 1 Woche stark positiv war, war nach 2 Wochen eine Intensitätsabschwächung des Trübungsringes

festzustellen, die auch im weiteren Verlauf bestehen blieb. Nach 4 Wochen hatte sich das Plasma selbst so stark getrübt, daß auch durch langes Zentrifugieren keine Klärung erzielt werden konnte; um daher die Fortsetzung der Versuche zu ermöglichen (die Reaktion kann ja nur bei wasserklaren Medien ausgeführt werden), wurde das Plasma von der 5. Woche an jeweils mit physiologischer Kochsalzlösung um das doppelte Volumen verdünnt; eine weitere wahrnehmbare Abschwächung der Reaktion erfolgte dadurch nicht, es kam unverändert zur Ausbildung eines feinen, aber immer deutlichen Ringes innerhalb weniger Minuten (nur nach 6 Wochen erst nach längerem Warten). Nach 10 Wochen hatte sich die Flüssigkeit unter Bildung eines starken Bodensatzes wieder ziemlich geklärt. Bei der nach 19 Wochen angestellten Reaktion lag der Ring etwas unterhalb der Grenzschicht, das gleiche fiel auch nach Verdünnung des Plasmas auf 1:3 auf. Die Eiweißreaktion war nach 19 Wochen ebenfalls noch stark positiv (vgl. Tabelle 1). Die Versuche wurden hier abgebrochen, da der Vorrat an titerstarkem Antiserum erschöpft war. Auf fortlaufende Vergleichsreaktionen mit frischem Plasma mußte wegen der außerordentlichen Knappheit an Antiserum, die zeitweise zum Geizen mit jedem Tropfen zwang, verzichtet werden.

2. Serum. Hier erfolgte jedesmal sofort eine so dichte Ausflockung, daß eine relativ breite wolkige Trübungszone mit unregelmäßigen Begrenzungslinien entstand; bei Verdünnung mit dem gleichen Volumen NaCl-Lösung entstand ein scharfer Ring. Bei der Reaktion nach 19 Wochen trat unterhalb der Berührungsgrenze ein unscharfer 2. Ring auf, in einer Verdünnung des Serums im Verhältnis 1:2 zeigte sich ein schwacher 2. Ring oberhalb der Grenzschicht.

„Doppelringe“ an der Schichtgrenze treten FORNET und MÜLLER zufolge zuweilen bei bestimmten Antiseren auf, ohne daß sich erklären ließe, warum ein Antiserum in dieser besonderen Weise reagiert (vgl. auch CREMA). Immerhin fand sich diese Eigenschaft häufiger bei Hitzepräzipitinern als bei Nativseren. Die Autoren stellten im übrigen fest, daß Doppelringe nur von ein und demselben Serum, dann aber regelmäßig, hervorgerufen werden, während andere homologe Antiseren mit den gleichen Eiweißlösungen nur einfache Ringe ergaben, daß ferner die Fähigkeit, Doppelringe zu bilden, den Antiseren nur im Stadium der Bildung der Präzipitine im Tierorganismus eigen ist, und daß sich bei Überschreiten einer gewissen Verdünnung der homologen Eiweißlösung sowie bei ihrem Erhitzen über 80° kein Doppelring, sondern nur noch ein einfacher Ring bildet. Sie halten es für möglich, daß das Antiserum mindestens zwei verschiedene Präzipitine enthalte, die mit den ihnen entsprechenden Präzipitinogenen zwei gesonderte Präzipitate bilden. Das eine der beiden Präzipitine finde sich obligat in jedem Antiserum; das eine der Präzipitinogene verliere offenbar durch stärkere Verdünnung der Eiweißlösung oder Erhitzen seine Reagibilität.

FRIEDBERGER und IKEDA zufolge soll sich jeder Präzipitationsring (eigentlich ja eine Scheibe) schon nach wenigen Minuten in *zwei*, durch eine klare Zwischenzone getrennte Ringe scheiden, von denen der obere hauchartig-feinflockig, der untere

kompakt-grobflockig sei. Der untere Ring sinke dann, zuweilen unter Zurücklassen eines „Restringes“, allmählich nach unten, der obere wandere langsam immer mehr nach oben, nach 24 Stunden sei der ganze obere Teil des Flüssigkeits-säulchens diffus getrübt. Die klare Zwischenschicht bleibe noch lange bestehen.

KRAUS identifizierte die 2 Ringe mit den beiden FRIEDBERGERSchen „Typen“ des Präzipitates: FRIEDBERGER hatte nämlich gefunden, daß etwa die Hälfte der Antiseren nicht nur das homologe bzw. das Eiweiß verwandter Tierarten präzipitiere, sondern auch auf heterologe Blutarten übergreife, das isogenetische unterscheide sich aber von dem heterogenetischen Präzipitat durch seine lockere, gröbere Flockung. Ein isogenetisches Antigen reagiere sowohl mit dem Iso- wie mit dem Heteropräzipitin (ein heterogenetisches Antigen nur mit dem Hetero-präzipitin) — auf diese Weise könnte man es erklären, daß sich mit dem Antigen der Vorbehandlung Doppelringe bilden. KRAUS zufolge ist diese Tatsache der Doppelringbildung nur mit dem homologen Antigen eine Erleichterung der forensischen Eiweißbestimmung.

REINER und KOPP haben indes nachgewiesen, daß die Ursache der Doppelringbildung eine rein physikalische ist; nämlich der Verdünnungsabfall des Antigens bzw. die Verdichtungszunahme des Antikörpers in der Schichtung (bzw. umgekehrt in der entgegengesetzten Richtung), wobei es an einer Stelle zur kolloidalen Auflösung des Präzipitates durch Antigenüberschuß, an einer benachbarten aber durch Diffusion des Antigens wieder zur Ausfällung kommt — analog dem „Zonenphänomen“ bei der Titration des Antikörpergehaltes mittels fallender Antigenverdünnungen. Die Autoren erzeugten mit besonderer Technik sogar 5—6 Ringe, DOERR und BERGER erhielten durch Überschichtung von 2% Sodiumcarbonatlösung mit 1 $\frac{1}{oo}$ Thorsulfat Doppelringe!

Damit dürften die älteren Erklärungsversuche dieses Phänomens als nicht zutreffend gekennzeichnet sein. Gegen die Deutung FORNETS und MÜLLERS spricht auch die Tatsache, daß in unserem betreffenden Versuch das gleiche (Nativ-) Antiserum benutzt wurde wie in den vorangehenden Versuchen.

Die Eiweißreaktion zeigte beim Serum im übrigen durchweg eine stärkere Ausfällung als beim Plasma, dies war offenbar auch die Ursache für den kompakteren Ausfall der Präzipitinreaktion, die noch nach 19 Wochen unverändert kräftig war.

3. Blutkuchen. Nach 1 Woche wurde ein etwa linsengroßes Stück des Cruor in 2 ccm NaCl-Lösung verbracht und mit der (rot verfärbten), bei Zimmertemperatur bewahrten Flüssigkeit nach 24 Stunden die Reaktion angestellt. Sowohl die reine, wie die auf die Hälfte verdünnte Extraktionsflüssigkeit ergaben nach einigen Minuten Wartens schmalc, aber scharfe Ringe. Im Laufe der ersten 3 Wochen verflüssigte sich die Cruormasse immer mehr, so daß die Testflüssigkeit von da an direkt durch Verdünnen eines dicken Tropfens mit Kochsalzlösung bereitet wurde. Von der 5. Woche an wurde die Reaktion wegen der tiefdunkel-roten Färbung der Lösung, die das Ablesen sehr erschwerte, in der Weise ausgeführt, daß der Tropfen verflüssigter Blutkuchen zunächst in 4,5 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt wurde, die sodann weiter auf das Doppelte verdünnt wurde. Nach 6 Wochen war die Ringbildung

noch deutlich, obwohl (bei Verwendung verschiedener Antiseren) weniger intensiv und langsamer eintretend als noch nach 5 Wochen. Nach 8 Wochen war sie recht schwach, nach 10 Wochen wiederum deutlich, nach 14 Wochen (trotz kräftiger Eiweißreaktion) nur fraglich, nach 19 Wochen (bei nur angedeuteter Eiweißreaktion) negativ.

Tabelle I. Ergebnis der Versuche an faulendem Blut.

Nach Wochen	Plasma		Serum		Blutkuchen		Blutkörperchen	
	Eiweiß- reaktion	Prä- zipitin- reaktion	Eiweiß- reaktion	Prä- zipitin- reaktion	Eiweiß- reaktion	Prä- zipitin- reaktion	Eiweiß- reaktion	Prä- zipitin- reaktion
1	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
2		(+)		+	+	+	+	(+)?
3	+++	+		++	+++	+	+++	(+)
4		(+)?		+		(+)		-
5		+		+++		+		(+)
6		+		++		(+)		+
8		(+)		++		(+?)		-
10	+	+	+++	++	++	+	-*	-*
14	+	(+)	+++	++	++	(+)?	-*	-*
19	+	+	++	++	(+?)	-		

* = Reaktion mit der Ausgangsverdünnung; (+?) = sehr schwacher Ring bzw. Eiweißreaktion; (+)? = Ring wegen Trübung der Medien nicht deutlich wahrnehmbar.

4. *Blutkörperchenrückstand*. Die zu prüfende Lösung wurde jeweils in der gleichen Weise hergestellt wie die Cruorlösung. Die Präzipitation war hier von Anfang an durchweg schwächer als im Falle des Blutkuchens und trat stets erst nach einer Wartezeit von mindestens 15 Min. auf. Eine wahrnehmbare weitere Abschwächung der Trübung ließ sich (außer einem negativen Ausfall nach 4 Wochen) bis zur 6. Woche nicht feststellen, nach 8 Wochen war die Reaktion mit dem gleichen Antiserum, das mit dem faulenden Serum eine kräftige und mit dem Blutcruor noch eine sehr schwache, zögernd eintretende Trübung gab, negativ, mit einem anderen Antiserum war sie nur sehr schwach positiv. Nach 10 Wochen war sowohl die Präzipitin- wie die Eiweißreaktion in der üblichen Verdünnung negativ, in der Ausgangsverdünnung fiel die erstgenannte jedoch noch fraglich positiv, die Sulfosalicylprobe positiv aus. Nach 14 Wochen waren Präzipitin- und Eiweißprobe sowohl in der End- wie auch in der (sehr trüben) Ausgangsverdünnung negativ geworden.

Daß Blutkuchen und Blutkörperchenrückstand überhaupt eine positive Präzipitinreaktion mit den verwendeten Serum-Antiseren gaben, ist auf Grund der einleitenden Darstellung und nach eigenen Kontrollversuchen mit Hämoglobinlösungen und den Kochsalzextrakten serumfrei gewaschener Blutkörperchen, die das Ausbleiben der Präzi-

pitation mit Serum-Antiserum bestätigten, vermutlich auf Rechnung des ihnen noch anhaftenden und nicht entfernabaren Serums zu setzen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß faulendes Plasma und Serum in beinahe 5 Monaten kein Nachlassen ihrer Präzipitierbarkeit aufwiesen. Die Präzipitabilität stand offenbar in Beziehung zu dem Eiweißgehalt, der, wie zu erwarten, ebenfalls keine sichtliche Veränderung erfuhr (MYA, VIGLEZIO und LUZZATTO hatten nach monatelangem Faulen von Blut ungefähr die Hälfte des ursprünglichen Globulingeshaltes aus dem Serum zurückgewonnen).

Gewisse feinere Schwankungen in der Bewertung der Intensität der Präzipitationen, die aus Tabelle 1 hervorgehen, müssen vielleicht subjektiven Ablesungsunterschieden zugeschrieben werden; die Trübung der Medien erschwerte die Ablesung zuweilen erheblich.

II. Die Präzipitinreaktion an erhitztem Blut.

Wegen der Koagulation unverdünnter Blutflüssigkeiten beim Erhitzen konnten die Versuche nur an den Auszügen von Koagulaten angestellt werden. Experimente mit nur erwärmttem, nicht geronnenem Serum, wie JONES sie beschreibt, kamen nicht in Frage, da sich Serum beim Erwärmen sogleich so trübt, daß die Präzipitation in Form der Ringbildung nicht wahrgenommen werden kann. (In einem eigenen Versuch, bei dem auf die Hälfte mit NaCl-Lösung verdünntes Serum 5 Min. bei 72° erhitzt wurde, konnte kein Unterschied in der Schärfe des Ringes im Vergleich zu nicht erhitztem Serum festgestellt werden.)

Wurde etwas Vollblut oder Serum im Wasserbad bis zur Gerinnung erhitzt und ein etwa bohnengroßes Stückchen der geronnenen Masse 72 Stunden in etwa dem 3fachen Volumen Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur ausgezogen, so fiel — wie orientierende Vorversuche zeigten — die Präzipitinreaktion für Vollblut sehr schwach positiv, für Serum zwar deutlich, aber wesentlich schwächer positiv als in der Kontrolle mit frischem Serum aus. Vollblut, Zitratblut, Blutküchen und Serum, die $\frac{1}{2}$ Stunde im Wasserbad nahe dem Siedepunkt erhitzt worden waren, ergaben (nach Trocknen der Gerinnsel auf Filterpapier und 72 stündiger Extraktion eines Teilchens in Kochsalzlösung) negative Reaktionen. Die Sulfosalicylsäurereaktion war hier ebenfalls negativ (die Präzipitin- und die Eiweißreaktion mit ungekochtem Blutkuchen positiv). Nach längerem Stehen bildete sich in jedem Röhrchen *oberhalb* der Berührungsschicht der beiden Medien ein schwach angedeuteter, unscharfer Ring, der im Laufe der nächsten Stunden noch weiter nach oben rückte; das Auftreten eines solchen „Pseudoringes“, der mit dem sich innerhalb der Grenzschicht bildenden und danach zu Boden sinkenden, echten Trübungsring nicht verwechselt werden darf, wurde bei Ausbleiben der Präzipitation öfters wahrgenommen (s. auch

S. 180 u. 182); ob diese Erscheinung etwas mit dem kolloidphysikalischen Phänomen des oben besprochenen „Doppelringes“ zu tun hat, läßt sich nicht sagen. Wir beobachteten das Auftreten eines solchen Pseudoringes auch einmal in der 1., 2. und 3. Waschflüssigkeit des abzentrifugierten Blutkörperchenrückstandes, ferner bei titerschwachen Antiseren, sowie hier und da auch bei Bestimmungen der Blutart in der täglichen Praxis, ebenfalls vornehmlich bei Antiseren mit niedrigem Titer.

Da das negative Resultat der vorstehenden Versuche anscheinend auf die mangelhafte Fähigkeit der NaCl-Lösung, das hitzeagulierte Eiweiß zu lösen, beruhte, wurde von jetzt an die Extraktion grundsätzlich mit Natronlauge vorgenommen. (W. A. SCHMIDT hatte lange gekochtes und vollständig koaguliertes Serum eiweiß, dessen Kochsalzauszüge auch mit „Hitzepräzipitinen“ nicht mehr reagierten, durch vorsichtiges abermaliges Erwärmen mit verdünnter Natronlauge wieder in Lösung und damit zum Präzipitieren — mit Hitzepräzipitin — gebracht.) Der Nachteil von Versuchen mit erhitztem Blut besteht ja, wie schon erwähnt, darin, daß infolge der Gerinnung des Eiweißes niemals mit der veränderten Blutsubstanz selbst, sondern mit Extrakten des Koagulates gearbeitet werden muß, und wenn das Lösungsmittel nicht imstande ist, das unlöslich gewordene Eiweiß zu lösen, muß die Präzipitation versagen. — Im einzelnen entwickelten sich die Versuche nunmehr in folgender Weise:

Die Röhrchen mit den Blutflüssigkeiten wurden eine bestimmte Zeit in kochendes Wasser gesetzt (die Temperatur im Innern der Röhrchen dürfte auf etwa 1—2° niedriger als die des Wassers geschätzt werden), nach dem Abkühlen wurde die geronnene Masse mit einem Glasstab aufgelockert und jeweils etwa das doppelte Volumen $n_{1,0}$ Normal-Natronlauge zugegeben. Nach 1 Stunde (später nach längerer Zeit) wurde dann die freie Flüssigkeit aus dem Röhrchen entnommen; wo die Natronlauge ganz in das gequollene Gerinnsel eingedrungen war, wurde dieses auf einem Uhrglas ausgebreitet, und der Flüssigkeitsrest mit einer Kapillare aufgesogen. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde, wenn notwendig, mit $n_{1,0}$ Normal-Salzsäure unter Farbvergleichung mit Universal-Indicatorpapier neutralisiert (p_H von 7—8); in der Regel genügten hierfür 1—2 Tropfen HCl (das Optimum der Präzipitinreaktion liegt bei schwach alkalisch). Ein beim Neutralisieren etwa entstehender Niederschlag wurde abzentrifugiert. Auf diese Weise hergestellte Extraktionsflüssigkeiten von bis zur Gerinnung erhitztem Vollblut, Plasma und Serum ergaben — im Gegensatz zu dem Resultat des 1. Vorversuches — bereits eine scharfe Ringbildung (bei kräftiger Eiweißfällung mit Sulfosalicylsäure). Beim Zusammenbringen eines leeren NaOH-HCl-Gemisches mit Antiserum trat keine Präzipitation ein.

Es wurden nunmehr *Serumproben* eine ansteigende Minutenzahl in kochendem Wasser belassen und mit den Laugenextrakten die Präzipitinreaktion angestellt (das Serum — welches auch seine ursprüngliche Farbe gewesen sein möchte — verfärbte sich beim Einbringen ins kochende Wasser sofort weiß-gelblich). Es ergab sich ein positiver Ausfall der Reaktion *bei 1 bis zu 11 Min. Erhitzungsdauer*, die Sulfo-salicylprobe war ebenfalls durchweg positiv. In einigen Fällen blieb zunächst eine Präzipitation aus, offensichtlich infolge zu geringer Eiweißextraktion durch die Natronlauge, bei Wiederholung der Versuche ließen sich aber immer scharfe Trübungsringe erzielen. Ab und zu war die Extraktionsflüssigkeit im ganzen so trübe (darüber hat auch R. ROSENBERG geklagt), daß die ringförmige Trübungsschicht nicht unterschieden werden konnte, Wiederholungen führten indes auch hier regelmäßig zum Erfolg.

In einem weiteren Serienversuch wurde sodann ein doppelter Satz Röhrchen mit frischem *Vollblut*, durch Zentrifugieren gewonnenem *Blutkuchen* und *Serum* je 15, 30, 45 und 60 Min. in kochendem Wasser erhitzt, und nach Abkühlen und Auflockern der geronnenen Masse zu der einen Hälfte das Doppelte Volumen Kochsalzlösung, zu der anderen Normalnatronlauge gegeben.

a) *Ergebnis der Extraktion mit Natronlauge.* Die Lauge war vom Inhalt der 15-, 30- und 45-Minuten-*Vollblut-Röhrchen* nach 24stündiger Extraktion so weitgehend aufgenommen worden, daß aus dem 15-Minuten-Röhrchen trotz langen scharfen Zentrifugierens überhaupt keine, aus den beiden anderen Röhrchen nur eine geringe Menge dunkelbrauner Flüssigkeit zurückgewonnen werden konnte. Die Präzipitation des 30-Minuten-Auszuges war infolge seiner Trübung nur fraglich, im 45-Minuten-Extrakt bildete sich eine grobflockige, tiefbraune Niederschlagszone, während der (hellgelb verfärbte) 60-Minuten-Auszug einen scharfen weißen Trübungsring gab. Die Eiweißreaktion war in allen 3 Fällen stark positiv (im Falle des 30-Minuten-Auszuges war der ausfallende Niederschlag ebenfalls von brauner Farbe). Möglicherweise ist die ungewöhnlich grobe Ringbildung des 45-Minuten-Auszuges darauf zurückzuführen, daß durch die verhältnismäßig lange Extraktion besonders viel Eiweiß in Lösung gegangen war (darauf weist auch die Grobheit des Eiweißniederschlages), allerdings wird dadurch nicht die braune Farbe der Ausflockung erklärt.

Auch aus den 15 und 45 Min. erhitzten *Blutkuchen-Röhrchen* war (nach 48stündiger Extraktion) nur ein geringer, grob-braunflockiger Flüssigkeitsrest zu gewinnen, der mit 1 Tropfen physiologischer NaCl-Lösung aufgehellt werden mußte. Im übrigen bildeten sich hier in allen 4 Proben scharfe Trübungsringe (bei stark positiver Eiweißfällung).

In der *Serumreihe* war der Inhalt des 15-Minuten-Röhrchens so stark kolliquiert, daß nur eine winzige Spur Flüssigkeit zu isolieren war, die in 1 Tropfen Kochsalzlösung aufgenommen wurde. Die Präzipitation fiel auch mit diesen 4 Auszügen positiv aus (die Eiweißreaktion war hier deutlich schwächer).

Eine Kontrolle der Laugenextrakte der Blutkuchen- und Serumreihe mit Antirindenserum hatte ein negatives Resultat, wobei am 30-, 45- und 60-Minuten-Extrakt wiederum das oben bereits erwähnte Phänomen eines schwachen „*Pseudoringes*“ oberhalb der Berührungsschicht zu sehen war, der sich allerdings nur im 30-Minuten-Extrakt auch ein zweites Mal produzierten ließ.

b) *Ergebnis der Extraktion mit Kochsalzlösung.* Nach 72stündiger Extraktion im Eisschrank gaben sämtliche 12 Auszüge einen feinen, aber scharfen Trübungsring, ihre Eiweißreaktion war durchweg schwach positiv (nur mit den Extrakten des 15 Min. gekochten Vollblutes und des 30-Minuten-Blutkuchens stärker positiv, und mit dem des 45 Min. gekochten Blutkuchens negativ). Dieses Resultat steht im Gegensatz zu dem Ausfall der eingangs beschriebenen Vorversuche, bei denen eine viel weniger intensive Erhitzung bei gleichartiger Extraktion negative Präzipitin-, allerdings auch negative Eiweißreaktionen zur Folge gehabt hatte. (Diese Diskrepanz kann hier nur als solche vermerkt werden, eine Wiederholung jenes unsystematischen Vorversuches zur Nachprüfung des Befundes war nicht möglich, da die Temperatur des Wassers hier während der Erhitzungsdauer nicht konstant gewesen war.)

Auf Grund dieses Ergebnisses darf angenommen werden, daß auch Kochsalzlösung imstande ist, das Antigen aus intensiv hitzedenaturiertem Bluteiweiß zu extrahieren, sofern sie nur lange genug mit dem geronnenen Blut bzw. seinen Komponenten zusammengelassen wird. Zu dem gleichen Schluß kamen WALCHER II und SCHECH sowie SMITH und GLAISTER bezüglich der Extrakte aus erhitzten Blutflecken auf Stoff. Diese Ansicht findet eine Bestätigung in dem Ausfall eines anderen Nebenversuches, bei dem Röhrchen mit Serum und Plasma eine Viertelstunde nach der Hitzekoagulation in Wasser nahe dem Siedepunkt belassen worden waren, und die Extraktionsflüssigkeit (NaOH) nach 1stündigem Ausziehen keine Präzipitation und keine Eiweißreaktion ergeben hatte, nach darauffolgender 1monatiger Extraktion mit Kochsalzlösung aber ein deutlicher Präzipitationsring und eine (schwach) positive Eiweißreaktion zu verzeichnen war. Eine monatelange Extraktion bei hitzekoaguliertem Serum rät auch WELLS an.

Da die bisherigen Versuche gezeigt hatten, daß eine Erhitzungsdauer bis zu 60 Min. die Präzipitierbarkeit des Blutes nicht beein-

Tabelle 2. Ergebnis der Versuche an erhitzten Blutbestandteilen.

Minuten der Er- hitzungs- dauer	Vollblut		Serum		Blutkuchen					
	Eiweiß- reaktion	Präzipitin- reaktion	Eiweiß- reaktion	Präzipitin- reaktion	Eiweiß- reaktion	Präzipitin- reaktion				
1			++	++						
2		+	+	+						
3		+	+	+						
4		+	+	+						
5		+	+	+						
6		+	+	+						
7		(+)	(+)	(+ ?)						
8		+	(+ ?)							
9		+	+	+						
10		+	+? trübe							
11		+	+							
	NaCl	NaOH	NaCl	NaOH	NaCl	NaOH	NaCl	NaOH	NaCl	NaOH
15	+		+	(+)	+	+	(+)	+++	+	+
30	(+)	+++	+	(+)?	(+)	++	+	+++	+	+
45	(+)	+++	+	?	(+)	++	+	+++	+	+
60	(+)	+++	+	+	(+)	+	+	+++	+	+
120	(+)	(+)	+	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+
180	(+)	++	?	(+)	(+)	+	(+)	++	?	?
240				(+)	—	?	?			

trächtigt, wurde Vollblut, Serum und Blutkuchen nunmehr *2, 3 und 4 Stunden* in der angegebenen Weise gekocht. Über die Resultate unterrichtet Tabelle 2. Es ist hierzu zu bemerken:

Im *2 Stunden-Versuch* wurde die Natronlauge nach dem Erkalten der Gerinnsel in diese eingerührt; es stellte sich aber heraus, daß sie hierbei von den Vollblut- und Blutkuchenkoagulaten so intensiv adsorbiert wurde, daß sich nach der Extraktion nur ein Flüssigkeitsrestchen abnehmen ließ, und zur Gewinnung von Testflüssigkeit aus der Blutkuchenmasse ein Stückchen derselben in Kochsalzlösung aufgeschüttelt werden mußte (die Lösung verfärbte sich hierbei gelblich und schäumte stark). Die Extraktionsdauer für die Laugenreihe betrug 24 Stunden, für die Kochsalzreihe 72 Stunden. Die *Laugenextrakte* des Vollblutes und der Blutkuchenmasse konnten erst durch langes Zentrifugieren geklärt werden. Die Ringbildung war zunächst fraglich, erst nach 2 Stunden zeigten die *Vollblut-* und *Blutkuchen-Proben* deutliche Ringe (bei schwacher Eiweißreaktion), im *Serum* war der Ring etwas schwächer (trotz kräftigerem Eiweißniederschlag). — In den der Präzipitierung unterworfenen *Kochsalzextrakten* benötigten die Ringe bei *Vollblut* und *Blutkuchen* $2\frac{1}{2}$ Stunden bis zu ihrer deutlichen Ausbildung. Die Eiweißfällung war nur schwach positiv; das *Serum* bildete (bei

stärkerer Eiweißfällung) nach 30 Min. einen schwachen, nach 60 Min. einen deutlichen und nach 24 Stunden einen recht kräftigen Ring.

Im nächsten Versuch (*3stündiges Kochen*) wurden die Koagulate nach dem Erkalten in Kölbchen mit der Auszugsflüssigkeit übergossen und unter mehrfachem Schütteln 72 Stunden extrahiert. Die Lauge wurde zunächst im gleichen Volumen wie die Gerinnel zugesetzt, erwies sich aber vom Vollblut- und Blutkuchengerinnel auch hier nach kurzer Zeit wieder so stark aufgesogen, daß ein weiter Schuß Lauge zugegeben werden mußte. Bei der Präzipitinreaktion trat bei *Vollblut* und *Blutkuchenmasse* sowohl mit Antimensch-, wie mit Antischaf- und Antipferd-Serum schon nach einigen Minuten an der Berührungsgrenze der beiden Medien ein, sich im Laufe der Zeit kaum wesentlich verstärkender, ganz schmaler Ring auf, der indes vermutlich mit dem untersten Rand der zwar klaren, aber bräunlich verfärbten Extrakte identisch war und sich als Abgrenzung gegen die schwach gelblichen Antiseren optisch täuschend als Ring darstellte. Das gleiche ist zu beobachten, wenn man eine trübe über eine klare Lösung schichtet (am deutlichsten ausgeprägt war der „Ring“ übrigens in den Blutkuchen-Antimensch- und Antipferd-Röhrchen). Gegen einen echten Präzipitationsring sprachen auch das rasche Auftreten der scheinbaren Trübung, ihr Gleichbleiben und ihre Feststellbarkeit bei den artfremden Antiseren, sowie vor allem die Tatsache, daß sich nach etwa 5—6 Stunden im *Vollblut*-Antimenschtest ein zwar schwacher, aber deutlicher, offenbar echter Präzipitatring entwickelt hatte, während in den Antipferd- und Antischafserum-Kontrollen jetzt überhaupt keine begrenzte Trübung mehr wahrzunehmen war. Die Eiweißreaktion gab einen kräftigen Niederschlag. Beim Serum war nach einigen Stunden ein scharfer Ring vorhanden, dessen allmähliche Bildung sich gut hatte verfolgen lassen. Er unterschied sich deutlich von den erwähnten Scheinringen. Pferd- und Schaf-Antiserum blieben hier ganz ohne Effekt. Die Eiweißreaktion war etwas schwächer als bei den anderen beiden Auszügen. — Die *Kochsalzextrakte* waren hier so opaleszent, daß eine sichere Entscheidung über den Ausfall des Präzipitationsversuches nicht getroffen werden konnte; ihre Eiweißreaktion war schwach positiv.

Nach *4stündigem Kochen* (72stündige Extraktion) bildeten sich im *Kochsalzauszug* des Serums mit Antimensch-, Antipferd- und Antischaf-Serum schon innerhalb der ersten 10 Min. feine deutliche Pseudoringe oberhalb der Grenze der Medien (bei negativer Eiweißreaktion), die noch 4 Stunden später scharf gezeichnet und im Laufe dieser Zeit mehr und mehr nach oben gerückt waren — im Gegensatz zu einem echten Präzipitationsring, der allmählich „fallschirmartig“ nach unten sinkt. Es wäre daran zu denken, ob nicht lange erhitztes Bluteiweiß

die Eigenschaft erlangt, mit heterologen Antiseren Trübungen zu bilden — für das *Präzipitin* hatten FORMET und MÜLLER und FURTH wahrgenommen, daß das durch Immunisierung mit erhitztem Eiweiß gewonnene Antiserum (Hitzepräzipitin) statt (oder neben) der Art-spezifität offenbar eine „Zustandsspezifität“ gewonnen hatte derart, daß es auch (erhitzte) heterologe Eiweißlösungen (wiewohl nur stärkerer Konzentration, etwa bis 1:100 und sehr langsam) präzipitierte. Im *Laugenextrakt* war (bei schwach positiver Eiweißfällung) mit Antimensch-Serum nach 15 Min. ein leicht wolkiger Ring ausgebildet, nach 30 Min. hatte dieser Ring sich nach oben in den Extrakt hin verlagert, an der Berührungsschicht blieb nur ein ganz schwacher Ring zurück. Nach 1½ Stunden hatte der obere Ring sich verdoppelt, der Grenzring war unverändert. Bei einer Wiederholung der Überschichtung bildete sich in 15 Min. wiederum ein deutlicher, ziemlich scharfer Ring an der Mediengrenze, der danach unter allmählicher Auflösung ebenfalls langsam nach oben wanderte. Nach 3 Stunden befand sich ein scharfer Ring unmittelbar unterhalb des Flüssigkeitsspiegels. Es ist zu bemerken, daß das bei diesem Versuch verwendete Mensch-Antiserum nur einen Titer von 1:100 besaß. Daher kann aus dem Befund keine Folgerung gezogen werden. Mit Antipferd- und Antischaf-Serum trat hier keine Trübung auf. —

Die gewonnenen Resultate erlauben die *abschließende Feststellung*, daß die Präzipitierbarkeit erhitzter Blutflüssigkeiten durch *Nativ-Antiseren* offenbar weit länger erhalten bleibt, als bisher angenommen wurde. Möglicherweise hätte aber auch W. A. SCHMIDT bei seinen über 90° erhitzten Seren noch positive Reaktionen erzielt, wenn er die Ringmethode angewandt hätte, denn er sagt selbst: „Das Nativ-Präzipitin ist zwar noch fähig, das höher erhitzte Serum zu binden und spezifische Trübungen hervorzurufen, aber es kommt nur noch in geringem Maße zur Präzipitation — lies Ausflockung — des Reaktionsproduktes; die obenstehende Flüssigkeit bleibt wegen der unvollständigen Abscheidung derselben trübe“. Die Ringprobe ist dem Verfahren der Messung der Höhe des sich bildenden Präzipitationsniederschlages und der Beobachtung der Klärung der überstehenden Flüssigkeit an Empfindlichkeit und Einfachheit der Ablesung zweifellos überlegen.

Bestätigt werden konnte die von SCHMIDT und von WALCHER II sowie SMITH und GLAISTER beschriebene *Verzögerung* und *Intensitätsabschwächung* der Präzipitation höher erhitzter Blutbestandteile, die Verzögerung (der Flockenbildung) ist nach SCHMIDT „eine charakteristische Eigenschaft des durch Hitze veränderten, aber noch reaktionsfähigen Eiweißes“.

Man kann sagen, daß die präzipitable Substanz — im Gegensatz zum Präzipitin, das schon durch 1/2 stündiges Erhitzen auf 70° inaktiviert

wird — in der Tat „eine geradezu hervorragende Widerstandskraft gegen Hitze besitzt“, ja daß „ihre Vernichtung allein durch Erhitzen vielleicht überhaupt nicht möglich“ ist (SCHMIDT). Eine „Grenze der Thermostabilität“ der präzipitablen Substanz konnte jedenfalls in unseren Versuchen nicht gefunden werden.

Für die praktischen Zwecke des Gerichtsarztes läßt sich aus den Ergebnissen ableiten, daß man eine Präzipitabilität auch hoch und lange erhitzten Blutes *mittels gewöhnlichen Antiserums* erwarten kann, wofern nur Vorsorge getroffen wird, daß, wie es immer Vorbedingung einer positiven Präzipitinreaktion ist, genügend Bluteiweiß, d. h. aber hier: *geronnenes* Eiweiß in die Auszugsflüssigkeit übergeht. Natronlauge ist hierfür geeigneter als Kochsalzlösung, aber auch diese ist imstande, auf die Dauer genügend Präzipitinogen aus dem Koagulat auszuziehen.

Die Extraktionsdauer bemesse man also recht lang, der Reaktion selbst gewäre man ausreichend Zeit (unter Umständen viele Stunden); eine Präzipitation braucht um so mehr Zeit, je schwächer die Antigenkonzentration ist — sei es, daß von Anfang an zu wenig Antigen vorhanden ist, sei es, daß es durch Faulen oder Erhitzen denaturiert wurde, sei es, daß das Eiweiß als Antigen stark geronnen und daher nur schwer löslich ist. Die Bedingung, daß der Präzipitatring sich innerhalb kurzer Zeit nach dem Zusammenbringen des Antiserums mit dem Extrakt bilde, hat hier keine Geltung.

Zusammenfassung.

1. Faulendes Menschenblutplasma und Serum zeigten innerhalb von 5 Monaten kein Nachlassen ihrer Präzipitierbarkeit mit Serum-Antiserum
2. Langes Erhitzen von Vollblut und Serum (in geringem Maße auch von Blutkuchen) bei 100° hebt die Präzipitabilität mittels gewöhnlichen Antiserums nicht auf.
3. Bei durch Fäulnis oder Erhitzen denaturiertem Blut und Blutbestandteilen ist zur Herstellung der Auszüge eine sehr lange Ausdehnung der Extraktion anzuraten. Die Reaktion selbst soll erst nach längerem Warten bewertet werden.
4. Zum Ausziehen des Bluteiweißes aus Hitzekoagulaten ist Natronlauge an sich geeigneter als Kochsalzlösung, bei sehr langer Extraktion kann indes auch Kochsalzlösung mit Erfolg verwendet werden.

Literatur.

BREINL, F. u. F. HAUROWITZ: HOPPE-SEYLER'S Z. 192, 45 (1930). — BIONDI, C.: Vschr. gerichtl. Med., Suppl. 23, 1 (1902). — CARRARA: Arte med. 1901. — CREMA, C.: Arch. Antrop. crim. 48, 447 (1928). — DOERR, R. u. E. BERGER: Klin.

- Wschr. **1927**, 1562. — DOLD, H.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. XIII/2. 1933. — EISENBERG, P.: Zbl. Bakter. usw. **31**, 773 (1902). — FERRAI: Boll. Acad. med. Genova **16**, VII (1901). — FORNET, W. u. M. MÜLLER: Z. Hyg. **66**, 215 (1910). — FRIEDBERGER, E. u. T. IKEDA: Klin. Wschr. **1925**, 2149. — FRIEDBERGER, E. u. E. MEISSNER: Z. Immunit.forsch. **36**, 233 (1923). — FUJIWARA, K.: Z. gerichtl. Med. **1**, 562 (1922); **11**, 253 (1928). — FURTH, J.: J. Immunol. (Am.) **10**, 777 (1925). — GRAHAM-SMITH: J. Hyg. (Brit.) **3**, 356 (1903). — HAUSER, G.: Münch. med. Wschr. **1904**, 289. — HEKTOEN, L. and K. SCHULHOF: J. infect. Dis. (Am.) **33**, 224 (1923). — HEKTOEN, L. and W. WELKER: J. infect. Dis. (Am.) **53**, 309 (1933); **55**, 271 (1934). — JONES, F.: J. exper. Med. **46**, 303 (1927). — KLEIN, A.: Wien. klin. Wschr. **1903**, 117, 156. — Zbl. Bakter. usw. **39** (1905). — KRAUS, R.: Handbuch der pathologischen Mikroorganismen, Bd. II/2 S. 1141. 1929. — LEERS, O.: Zbl. Bakter. usw. **54** (1910). — LOEFFLER, F.: Dtsch. med. Wschr. **1904**, 1913. — LUZZATTO: Sperimentale **50**, 146 (1896). — MARX, A.: Vjschr. gerichtl. Med. **59**, 149 (1920). — MEZGER, O., u. a.: Z. gerichtl. Med. **21**, 18 (1933). — MIRTO: Arch. Farmacol. sper. **12** (1911). — MIZOKUTI, M.: Fukuoka Acta med. **33**, 85 (1940). — MODICA: Policlinico, sez. pr. **1901**, 1131. — MÜLLER, B.: Z. gerichtl. Med. **23**, 178 (1934). — MYA e VIGLEZIO: Arch. ital. Clin. med. **27**, 712 (1888). — NICOLETTI, F.: Z. gerichtl. Med. **17**, 59 (1931). — NUTALL, G.: Blood Immunity and Blood Relationship, Cambridge 1904. — OBERMAYER, F. u. E. PICK: Wien. klin. Wschr. **1903**, 659; **1906**, 327. — PFEIFFER, H.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. IV/12. 1938. — PICK, E. u. F. SILBERSTEIN: Handbuch der pathologischen Mikroorganismen, Bd. II, 1929. — REINER, L. u. H. KOPP: Klin. Wschr. **1927**, 1563. — ROSENBERG, R.: Zbl. Bakter. usw. **98**, 259 (1926); **107**, 448 (1928). — SCHECH, E.: Diss. München 1920. — SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie. Dresden 1933. — SCHMIDT, W. A.: Biochem. Z. **14**, 294 (1908). — Z. Immunit.-forsch. **13**, 166 (1912). — SHI-KONG, W.: J. orient. Med. (Mandsch.) **27**, 139 (1937); **28**, 10 (1938). — SMITH, S. and J. GLAISTER: Recent Advances in Forensic Medicine, 2. Aufl., Kap. 6. 1939. — SUZUKI, K.: Tohoku J. exper. Med. (jap.) **25**, 34 (1935). — UHLENHUTH, P. u. W. SEIFFERT: Handbuch der pathologischen Mikroorganismen, Bd. III. 1930. — UHLENHUTH, P. u. O. WEIDANZ: Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909. — DELLA VOLTA e DEL CARPIO: Boll. Soc. Biol. sper. **3** (1928). — WALCHER, K.: Z. gerichtl. Med. **9**, 728 (1927). — Gerichtlich-medizinische Blutuntersuchung. Berlin 1939. — WEIDANZ, O. u. K. BORCHMANN: Arb. ksl. Gesdh.amt, Berl. **28**, 477 (1908). — WELLS, H.: Die chemischen Anschauungen über Immunitätsvorgänge. Jena 1927. — WENT, S. u. a.: Z. gerichtl. Med. **3**!, 65 (1938). — WERKGARTNER, A.: Z. gerichtl. Med. **8**, 221 (1926). — YORIMITSU, K.: Tohoku J. exper. Med. (jap.) **22**, 1 (1933). — ZIEMKE, E.: Dtsch. med. Wschr. **1901**, 424.