Ueber Antiserumgewinnung "in Vitro"

Autor(en): **Schweizer, Ch. / Werder, J.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **19 (1928)**

Heft 4

PDF erstellt am: **24.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-984285

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Ueber Antiserumgewinnung «in Vitro».

Von Dr. CH. SCHWEIZER.

(Aus dem Laboratorium des Eidgenössischen Gesundheitsamtes, Vorstand: Dr. J. Werder.)

Bei ihren Arbeiten über serologische Differenzierung von Pflanzenarten wollen Mez und Ziegenspeck[1]) die Beobachtung gemacht haben, dass es möglich sei, in vitro künstliche Antisera durch Zusammenbringen normaler Sera mit Pflanzenauszügen als Antigen herzustellen.

Für die gewöhnlichen Verwandtschafts-Reaktionen zur Aufstellung des botanischen Stammbaumes wurden nur die Ablesungen nach 12 Stunden berücksichtigt. Bei den späteren Ablesungen fanden dann Mez und Ziegenspeck, dass sich die Niederschläge zunächst vergrösserten. Später wurden die bereits entstandenen Niederschläge wieder gelöst, erschienen aber im weiteren Verlaufe wieder. Diese Erscheinung führten sie auf den Abbau des Antigens durch im Serum vorhandene Fermente zurück, durch welchen Abbauprozess spezifische Immunkörper entstehen sollen. Zu einer sichtbaren Reaktion soll es aber erst kommen, wenn das Antigen nicht mehr als Schutzkolloid wirken kann.

Mez und Ziegenspeck wollten ihre Vermutung an folgendem Versuch prüfen: Sie versetzten das völlig blanke und nicht hämolytische Serum eines Kaninchens mit der gleichen Menge eines isotonischen Kochsalzauszuges 1:100 von feinst gepulverter Vaucheria. Die Dauer der Extraktion hatte $^1/_4$ Stunde betragen, worauf ganz blank filtriert wurde. Zur Verhinderung unerwünschter Umsetzungen durch Bakterien setzten sie Karbolsäure zu. Bereits nach 12 Stunden machte sich ein Niederschlag geltend, der völlig einer Präzipitation glich. Schon nach 24 Stunden hatte sich dieser Niederschlag aber wieder vollkommen gelöst. Das Serum hatte nun jenen opalen Schimmer bekommen, wie man ihn bei zu früher Blutentnahme nach Antigen-Einspritzung beobachtet. Nach 2 Tagen hatte sich von neuem ein Niederschlag gebildet, welcher aber viel geringer war als der zuerst aufgetretene. Ein Kontrollglas Extrakt und ein auf gleiche Konzentration gebrachtes Serum zeigten innerhalb der Versuchszeit keine Trübung. So glaubten die Verfasser eine «Präzipitation» durch Digerieren von Serum mit Antigen erhalten zu haben, wodurch sie zu weiteren Versuchen ermutigt wurden.

Nach 14-tägigem Stehen eines Ansatzes (1:200, 1:300, 1:400 und 1:500) wurden die noch vorhandenen Niederschläge durch Filtration beseitigt und das klare Serum mit isotonischer Kochsalzlösung auf das zehnfache verdünnt (die Versuche von 1:200 und 1:400, sowie diejenigen von 1:300 und 1:500 wurden vereinigt), sowie 0,5% Phenol dazu-

[1]) Botan. Archiv, **12**, 197 (1925).

gegeben. Mit den so hergestellten künstlichen, in vitro erzeugten Antiseren wurden darauf Konglutinations-Versuche vorgenommen. Z. B. wurde ein Extrakt aus Cucurbita-Samen, die mit Alkohol-Weinsäure (Alkaloidextraktion) und Aether (Fett- und Lipoidextraktion) ausgezogen (und gleichzeitig sterilisiert) worden waren, im Verhältnis 1:200 angesetzt und folgende Versuchsreihe aufgestellt:

Immunserum .	0,3	0,15	0,1	0,05	0	0,3
Extrakt . . .	1	1	1	1	1	0

Hierbei sollen unzweideutige Resultate erhalten worden sein, welche Mez[2]) veranlassten, die so erhaltenen Sera auch noch auf Spezifität zu prüfen. Den Beweis, dass die «Natursera» und die «Kunstsera» die gleichen artspezifischen Stoffe enthalten, will Mez auf folgenden zwei verschiedenen Wegen erbracht haben:

1. Dutzende von parallel erzeugten Natur- und Kunstseren sollen völlig gleiche spezifische Reaktionen ergeben haben;

2. Bei hunderten von mit Kunstseren allein angestellten Reaktionen soll sich gezeigt haben, dass die mit ihrer Hilfe gewonnenen Angaben über die Verwandschaften der zu ihrer Erzeugung verwendeten Pflanzen absolut zu den Ergebnissen der Naturserumreaktionen passten. Mez ist nämlich der Ansicht, dass wer ein wohlgefügtes Mosaikbild vor sich hat, beim Einsetzen eines neuen noch fehlenden Steines ganz genau merkt, ob dieser zu den bereits vorhandenen passt oder nicht.

Nach Mez können sich Natur- und Kunstsera beliebig vertreten, woraus sich die Identität der in den beiden vorhandenen spezifischen Stoffe ergeben würde.

Die Kunstsera sollen den Vorteil haben, dass sie weit besser differenzieren, namentlich diejenigen mit schwachem Titer, als die natürlichen. Ferner würde man keine vorrätigen Sera mehr brauchen, da sich ja jederzeit die gewünschten Immunsera ohne Versuchstiere herstellen lassen würden. Die in der Praxis wohl bekannte und oft hinderliche Erscheinung, dass sich die vorrätig gehaltenen Sera getrübt haben und in ihrer Wirkung unzuverlässig geworden sind, wäre damit ausgeschaltet.

Mez und Ziegenspeck[3]) zeigen, wie man starke oder schwache Immunsera in vitro erzeugen können soll und wie die Reaktionen mit denselben angestellt werden sollen.

Ist ein **niedriger Titer** erwünscht, wie dies bei den Versuchen dieser Verfasser der Fall war, bei denen es hauptsächlich darauf ankam, die Einzelheiten in die bereits in grossen Zügen festgelegten botanischen Stammbaum-Zweige einzuzeichnen, so sollen in sterilen Gläsern erster Qualität angesetzt werden:

---

[2]) Leopoldina, **2**, 144 (1926).

[3]) Botan. Arch., **12**, 197 (1925).

1. 2 cm³ Antigenextrakt 1:200 + 0,8—1,6 cm³ absolut klares, nicht hämolytisches Rinderserum;

2. 2 cm³ Antigenextrakt 1:200 + 0,8—1,6 cm³ isotonische Kochsalzlösung;

3. 2 cm³ isotonische Kochsalzlösung + 0,8—1,6 cm³ des Rinder-Serums.

Die Versuche sollen so eingerichtet werden, dass in jedem Glase 0,5% Phenol vorhanden ist. Nun beobachtet man die im Brutschrank stehenden Gemische. Tritt die Bildung von «künstlichem» Immunserum ein, so muss sich in dem Ansatz eine Trübung meist schon am 2. Tage einstellen, während die Kontrollen noch klar bleiben. Im Verlaufe der acht Tage, welche die Erzeugung des «Kunstserums» braucht, kann sich in den Kontrollen eine geringe Trübung einstellen, aber sie erreicht meist keine grossen Ausmasse. Derartige Kontrolltrübungen deuten auf einen sehr grossen Gehalt des Rinderserums an Alexinen (Abwehrfermenten); sie weisen auf die Gefahr hin, dass der Titer des Kunstserums sehr hoch wird oder gar dass auch, neben den spezifischen gewünschten Immunstoffen, Präzipitine aus dem Rinderserum erzeugt werden. Ein solches Serum sollte auf Haltbarkeit nach dem Versetzen mit Rinderserum geprüft werden.

Bei dem normalen Ablauf der Herstellung der Kunstsera soll sich der im Anfang entstandene flockige Niederschlag geballt oder sich mehr oder weniger vollständig gelöst haben. Darauf verdünnt man das Serum auf die 10fache Menge mit karbolisierter isotonischer Kochsalzlösung. Durch Zugabe von 2—8 cm³ Rinderserum sollen die verbrauchten Alexine (das «Komplement») ersetzt werden. Durch Variation dieser Zugabe würde man es in der Hand haben, ein alexin-reiches oder -armes, ein präzipitin-reiches oder -armes Serum herzustellen. Für jeden Spezialfall sollte man ausprobieren, welche Art des Serums am besten wirkt.

Da nun die Methode von Mez und Ziegenspeck von grosser Bedeutung für die Lebensmittelserologie hätte werden können, suchten wir in analoger Weise ein Präzipitin von niedrigem Titer für den Pferdefleischnachweis herzustellen. Zu diesem Zwecke wurde 1 g Pferdefleisch zerkleinert und mit 100 cm³ isotonischer Kochsalzlösung während $^1/_2$ Stunde ausgezogen. Dann wurden folgende Reaktionen angesetzt:

	I	II	III	IV	V
Je 1 cm³ Pferdefleischextrakt	1:100	1:200	1:1 000	1:10 000	1:20 000
Rinderserum (cm³) . . .	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

und zu jedem Röhrchen noch je 0,2 cm³ 5%iges Phenol hinzugefügt.

Beim Zusetzen des Phenols entstand in allen Röhrchen an der Oberfläche eine Ausfällung. Nach dem Mischen mittels einer Kapillare waren die ganzen Röhrchen sehr schwach getrübt, was das Beobachten des Auftretens einer Präzipitattrübung erschwert. Eine so starke Desinfektionsmittel-Konzentration soll aber hier unbedingt notwendig sein.

Nach 14 Tagen wurden beobachtet in:

Röhrchen I: Diffuse Trübung, sehr schwacher Bodensatz;
Röhrchen II: Diffuse Trübung, deutlicher Bodensatz;
Röhrchen III: Diffuse Trübung, schwacher Bodensatz;
Röhrchen IV: Schwächere Trübung, deutlicher Bodensatz;
Röhrchen V: Diffuse Trübung, deutlicher Bodensatz.

Röhrchen II wurde filtriert und folgende Reaktion angesetzt:

1 cm³ Pferdefleischextrakt 1:100 + 0,1 cm³ Filtrat des Röhrchens II. Es ergab sich eine deutliche Trübung.

Nun wurde das Filtrat des Röhrchens II nach Mez mit isotonischer Kochsalzlösung auf das 10-fache verdünnt und 8 cm³ Rinderserum (Alexine) zugesetzt. Dann wurde angesetzt:

1 cm³ Pferdefleischextrakt 1:100 + 0,1 cm³ Verdünnung des Filtrates von Röhrchen II.

Auch jetzt wurde wieder eine deutliche Trübung erhalten.

Das gleiche wurde wiederholt mit Röhrchen V. 1 cm³ Pferdefleischextrakt 1:100 + 0,1 cm³ Filtrat von Röhrchen V ergaben wieder eine deutliche Trübung. Mit dem auf das 10-fache verdünnten und diesmal nur mit 2 cm³ Rinderserum versetzten Filtrat war dagegen das Präzipitat in diesem Falle bedeutend schwächer (schwache Trübung).

Das verdünnte und mit Alexin versetzte Filtrat wurde nun auf 0,5% Phenolgehalt gebracht, wodurch eine diffuse Trübung entstand, die später einen Bodensatz bildete.

Sodann wurde noch die Spezifität wie üblich bestimmt (je 1 cm³ Antigenlösung + 0,1 cm³ verdünntes Filtrat). Es zeigten sich nur undeutliche Trübungen, die auch in den Kontrollen (andere Fleischarten und isotonische Kochsalzlösung) entstanden. Auch bei Verwendung von 1 cm³ verdünnten Filtrates an Stelle von 0,1 cm³ konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Dasselbe war auch mit dem unverdünnten Filtrat der Fall.

Wir wiederholten nun noch den gleichen Versuch mit Pferdenormalserum als Antigen und stellten folgende Reaktionen an:

	I	II	III	IV	V
Je 1 cm³ Pferdenormalserum	1:10	1:100	1:1 000	1:10 000	1:20 000
Rinderserum cm³	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

+ je 0,2 cm³ 5%iges Phenol.

Natürlich entstanden auch hier wieder beim Zusetzen des Phenols die gleichen Trübungen wie bei Verwendung von Pferdefleischextrakt.

Nach 4 Tagen hatte sich im Röhrchen I eine Trübung gebildet, die sich im weiteren Verlauf zu körnchenartigen Flöckchen kondensierte. Nach 14 Tagen konnte auch noch ein schwacher Bodensatz festgestellt werden, während in der darüberstehenden Flüssigkeit immer noch feine Körnchen schwammen. Das gleiche Bild zeigte nach 14 Tagen auch

Röhrchen II, während in den übrigen Gläsern über dem schwachen Bodensatz nur eine diffuse Trübung der darüberstehenden Flüssigkeit festgestellt werden konnte.

Röhrchen I wurde filtriert und folgende Reaktion angestellt:

1 cm³	Pferdenormalserum	. .	1:10	+0,1 cm³	Filtrat	des	Röhrchens	I
1 »	»	. .	1:100	+0,1 »	»	»	»	I
1 »	»	. .	1:1000	+0,1 »	»	»	»	I

In allen drei Röhrchen konnte nur eine undeutliche Trübung beobachtet werden.

Nun wurde das Filtrat von Röhrchen I nach Mez mit isotonischer Kochsalzlösung auf das 10-fache verdünnt und 8 cm³ Rinderserum (Alexine) zugefügt. Dann wurde wieder angesetzt:

1 cm³	Pferdenormalserum	1:10	+0,1 cm³	Verd.	des	Filtrates	von	Röhr. I
1 »	»	1:100	+0,1 »	»	»	»	»	» I
1 »	»	1:1000	+0,1 »	»	»	»	»	» I

Diesmal entstand eine etwas deutlichere Trübung in allen drei Röhrchen.

Die Spezifitätprüfung mit dem verdünnten und mit Alexin sowie Phenol versetzten Filtrat ergab aber auch hier keine deutlichen Unterschiede. Das gleiche war der Fall mit dem unverdünnten Filtrat.

Wir haben nun noch die Herstellung eines Serums von **hohem Titer** versucht. Will man ein hochwertiges Antiserum erzeugen, so soll man nach Mez und Ziegenspeck[4]) das Serum eines Kaninchens nehmen, das man durch Injektion eines beliebigen fremden Eiweisses zur Alexinbildung angeregt hat. Z. B. soll sich Milch zu diesem Zwecke sehr gut eignen. Nach etwa 12 Stunden scheint das Blut auf diese Weise einen sehr hohen Alexingehalt erreicht zu haben. Dann soll man dem Tier die gewünschte Blutmenge aus der Ohrvene entnehmen und weiter wie bei der Präzipitingewinnung mit niederem Titer verfahren. (Hier trübt sich die Kontrolle eher.) Auf diese Weise soll man durch Zusatz stärkerer Extrakte die Bildung grosser Mengen von Immunkörpern erzielen können.

Mit dem alexinreichen Kaninchenserum stellten wir nun unter Einhaltung der gleichen Konzentrationen wie bei den Versuchen zur Gewinnung eines schwachen Antiserums Versuche sowohl mit Pferdefleischextrakt als auch mit Pferdenormalserum als Antigen an. Dabei fiel es uns auf, dass die Phenoltrübungen schwächer ausfielen, als mit Rinderserum. Wiederum konnten allerlei Trübungen beobachtet werden, ein spezifisch präzipitierendes Antiserum wurde aber nicht erhalten.

Es wurde nun noch ein Versuch mit einem konzentrierteren Pferdefleischextrakt angestellt, der so hergestellt war wie für die Präzipitation nach Uhlenhuth. In sterilen Reagensgläsern wurden folgende Mischungen gemacht:

[4]) Botan. Arch., **12**, 198 (1925).

2 cm³ Antigenextrakt, .	unverdünnt	1 : 10	1 : 100	1 : 1 000	1 : 10 000	1 : 100 000	NaCl*)
Alexinhalt. Kaninchenserum (cm³)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	»

Dann wurde zu jedem Röhrchen 0,4 cm³ 5%iges Phenol hinzugesetzt, wobei wieder eine wolkige Trübung entstand. Diesmal beseitigten wir die Phenolfällung durch Filtration und füllten dann die Flüssigkeit in Präzipitationsgläschen ab, die wir während 14 Tagen beobachteten. Es bildete sich namentlich im ersten Röhrchen ein sehr starker Niederschlag. Nach Abfiltrieren dieses Niederschlages konnte aber mit der Flüssigkeit der verschiedenen Röhrchen in keinem Falle ein spezifisches Präzipitat erhalten werden; bei Zusatz von 0,1 cm³ zu 1 cm³ Rind-, Schweine-, Schaf- oder Pferdefleischauszug entstand überall eine ungefähr gleich starke schwache Trübung.

Zusammenfassung.

Einige orientierende Versuche über die Gewinnung von Antiserum «in vitro» nach der Methode von Mez und Ziegenspeck haben keine Anhaltspunkte gegeben, dass dieselbe für die Herstellung von Pferdefleischantiserum einen Vorteil bieten könnte. Wir konnten in keinem Falle eine genügend deutliche spezifische Präzipitation erzielen. Mez[5]) hat übrigens selbst darauf hingewiesen, dass seine Reaktionen nicht immer in die Augen springende Veränderungen der reagierenden Flüssigkeiten, sondern oft nur schwache und unbedeutend erscheinende Eiweissausflokkungen darstellen. Er gibt selbst an, dass es oft überaus schwer ist, zwischen zu wertender Reaktion und nichts beweisenden Trübungen (wie sie insbesondere in oft sehr unangenehm täuschender Weise durch Gerbstoffe hervorgebracht werden) zu unterscheiden. Wir hatten aber dennoch gehofft, wenigstens mit der Methode zur Herstellung sogenannter hochwertiger Antisera ein besseres Resultat zu erzielen, was uns aber nicht gelang. In einer soeben erschienenen Arbeit hat auch Eisler[6]) bei Nachprüfung dieser Angaben beobachtet, dass sowohl mit einfacher Präzipitation als mit der Konglutinationsmethode (Zusatz von normalem Rinderserum zum Extrakt-Serumgemisch, wodurch die Reaktion verstärkt werden soll) festgestellt werden kann, dass derart hergestellte Kunstsera ganz unspezifisch reagieren und dass die beobachteten Trübungen und Flockungen als unspezifische Kolloidreaktionen anzusehen sind. Die manchmal vorgetäuschte spezifische Wirkung soll durch Nichtberücksichtigung der quantitativen Verhältnisse (Gehalt der Extrakte an wirksamen Stoffen) zustande gekommen sein. Erwähnt sei endlich noch, dass Gilg und Schürhoff[7]) kürzlich zu dem Schluss gelangt sind, dass die Serodiagnostik auch für die botanische Verwandtschaftsforschung völlig unbrauchbar sei.

*) = Isotonische Kochsalzlösung.

[5]) Leopoldina, **2**, 150 (1926).

[6]) Ztschr. f. Immunitätsforsch., **53**, 136 (1927).

[7]) Ber. dtsche bot. Ges., **45**, 315 (1927).