

К вопросу о получении и сохранении преципитирующих сывороток.

Т. С. Бородатовой.

Важнейший вопрос судебно-медицинской гэматологии, именно, вопрос об отличии крови человека от крови животных, казалось, получил точное свое разрешение еще 25 лет тому назад, когда Uhlenhuth, в 1901 г., разработал методику постановки биологической или преципитивной пробы.

Ровно четверть века прошло с тех пор, но и до сего времени еще не вполне изучен ряд сложных и невыясненных условий в постановке этой пробы, от которой зависит, как говорит Таранухин ¹⁾, нравственное право давать определенное, а не предположительное заключение о природе кровавых пятен.

Целый ряд работ судебно-медицинских авторов посвящен вопросам о способах иммунизации животных, о способах сохранения иммунных сывороток, о постановке пробы Uhlenhuth'a и т. д.

Первым требованием по отношению к преципитирующей сыворотке, по словам покойного проф. К. В. Бенинга ²⁾, является ее сильная активность, т. е. высокий титр. Сыворотки со слабым титром для судебно-медицинской практики непригодны, потому что дают неясную реакцию и часто оказываются неспецифичными, т. е. дают реакцию и с кровью других животных.

Сам Uhlenhuth ³⁾ требует, чтобы при судебно-медицинском исследовании кровавых пятен применялась сыворотка с титром не ниже 1:10000.

Для получения высоко-активных сывороток авторами предложено много различных способов иммунизации животных, и уже одно это обстоятельство, как говорит Караганов ⁴⁾, свидетельствует о том, что получение преципитирующих сывороток не так просто, как кажется на первый взгляд. Одно из первых затруднений, с которым приходится сталкиваться при получении специфических сывороток, состоит в том, что иммунизация находится в зависимости от индивидуальных особенностей каждого животного. Так, напр., при иммунизации группы кроликов по совершенно одинаковому методу оказывается, что только часть их дает специфическую сыворотку достаточной силы, другая же часть дает слабые сыворотки; наконец, попадаются и такие кролики, которые совершенно неспособны давать активной сыворотки после первой иммунизации, а дают таковую только после повторных серий иммунизации. Было замечено, что при введении антигена животному после продолжительного

перерыва не только восстанавливается иммунитет, но и сыворотка приобретает более высокий титр.

Такое явление наблюдал и сам Uhlenhuth, но он считал его непостоянным и случайным. Райский ⁵⁾ первый доказал, что, благодаря повторным сериям иммунизации, у животных в короткое время достигается не только высокий титр преципитирующей сыворотки, но и весьма длительный иммунитет.

Караганов в своей диссертационной работе более широко разработал методику повторной иммунизации. Первую серию иммунизации этот автор проводил по классическому способу Uhlenhuth'a, т. е. вводил антиген 5—6 раз через 5—6 дней, причем каждый раз брал по 1 куб. сант. на кило веса кролика. Через 3 месяца после первой иммунизации Караганов производил вторую иммунизацию по тому же способу, затем вновь давал кролику отдых на 3—4 месяца и вновь иммунизировал его. В результате этих опытов оказалось, что такая подготовка кроликов оказывается наиболее выгодной.

Заведующим Судебно-медицинским кабинетом Казанского Университета, пр.-доц. А. Д. Гусевым было предложено мне воспользоваться выводами Караганова для получения преципитирующей сыворотки для нужд кабинета.

Считаю нужным указать, что получение преципитирующих сывороток в нашем кабинете было организовано только в последние годы, когда было оборудовано примитивное помещение для опытных животных, и приобретены некоторые приборы. Это не могло не отразиться на ходе работы, так как, благодаря материальным затруднениям кабинета, до сих пор еще в нем не имеется достаточного оборудования. Вследствие этого мне пока удалось проработать сравнительно небольшой материал, и полученные результаты я сообщаю, как предварительные. В настоящее время условия работы у нас мало-по-малу улучшаются, и результаты дальнейшей моей работы будут сообщены впоследствии.

Пока я привожу свои наблюдения над девятью иммунизированными кроликами. В качестве антигена я применяла свежую сыворотку плацентарной крови, тщательно центрифугированную после отстаивания на холоду в стерильной посуде. После центрифугирования я вначале фильтровала сыворотку через Berkefeld'овский фильтр, но в дальнейшем это пришлось оставить вследствие порчи аппарата и ограничиться только одним центрифугированием.

Центрифугирование сыворотки продолжалось до тех пор, пока она не становилась соломенно-желтого цвета, совершенно прозрачной, затем такая сыворотка вводилась с помощью шприца в ушную вену животным. Введение сыворотки последние переносили хорошо, и пока я потеряла только одного кролика, и то при явлениях анафилаксии.

Иммунизация производилась мною по классическому методу, т. е. сыворотка вводилась 5—6 раз через промежутки в 5—6 дней. В первых двух опытах мною применялось введение сывороток внутривенно, но затем я перешла исключительно к внутривенному введению, как более удобному и требующему меньших количеств антигена. После первой иммунизации в большинстве случаев получалась сыворотка, имевшая титр не выше 1 : 7000—1 : 8000, а у одного кролика (опыт № 8) сыворотка осталась неактивной.

Так как для ответственных судебно-медицинских исследований требуются сыворотки высокого титра, то в дальнейшем я применила, основываясь на выводах Караганова, повторные серии иммунизации с промежутками от 1 до 3 месяцев, вводя антиген совершенно так же, как и при первичной иммунизации. В виду того, что мне не всегда удавалось вовремя получить плацентарную кровь, промежутки между вспрывиваниями антигена иногда приходилось удлинять до 8—9 дней, причем явления анафилаксии получались редко.

С другой стороны, в последних своих опытах я укорачивала промежутки между двумя введениями антигена и вводила его не 5—6 раз, а 3 раза, причем получала совершенно одинаковые результаты.

Из находившихся под опытом кроликов первые три были иммунизированы однократно, три (опыты №№ 4, 6 и 9) подверглись вторичной иммунизации, два (опыты №№ 5 и 8) иммунизировались по три раза, и один (опыт № 7) вынужденно был обескровлен после первой иммунизации в виду наступившего резкого истощения. Одновременно с испытанием повторной иммунизации я делала и попытки консервирования иммунных сывороток, причем способы консервирования будут мною указаны при описании соответствующих опытов.

Результаты иммунизации получились следующие:

Опыт № 1. Белый кролик-самец. Иммунизирован сывороткой плацентарной крови, полученной из Городского Родильного приюта. Антиген введен внутривенно 15/III 1924 в количестве 6 куб. сант., 19/III—в количестве 8 куб. сант., 24/III—10 куб. сант., 29/III—12 куб. сант., 6/IV—8 куб. сант. В последний раз введено только 8 куб. сант. антигена в виду недостатка сыворотки. 12/IV произведено испытание титра полученной сыворотки. Оказалось, что в разведении человеческой крови 1:1000 тотчас же получается белое кольцо, а в разведении 1:8000—через 5 мин. Сыворотка специфична. Кролик обескровлен, получено 30 куб. сант. крови, из которой добыто 16 куб. сант. сыворотки. Последняя консервирована добавлением равной части смеси 1 ч. 95% спирта и 3 ч. 0,85% раствора Na chlorati. Такая консервированная сыворотка хранилась за окном в течение 3 мес., пока не была вся израсходована. За все это время титр сыворотки оставался постоянным.

Опыт № 2. Белый кролик-самец весом 1530,0. Иммунизация такой же сывороткой, что и в опыте № 1. Антиген введен внутривенно 26/IV 1924 г. в количестве 5 куб. сант., 1/VI—7 куб. сант., 9/VI—9 куб. сант., 16/VI—10 куб. сант., 25/VI—7 куб. сант., 2/VII—9 куб. сант. Через 3 мин. после последнего введения антигена—резкое учащение дыхания. Синюха и смерть после клонических судорог.

Опыт № 3. Черный кролик-самец. Тот же антиген, что и в первых двух опытах, был введен внутривенно 25/X 1924 в количестве 1 куб. сант., 29/X—1½ куб. сант., 4/XI—2 куб. сант., 8/XI—2½ куб. сант., 13/XI—3 куб. сант., 20/XI—определение титра сыворотки. Реакция с раствором крови 1:1000—тотчас же, с раствором 1:7000—через 2 мин. После обескровливания кролика получено 10 куб. сант. сыворотки. Активная сыворотка консервирована тем же способом, что и в опыте № 1, и сохранялась в течение 5 мес. за окном, причем несколько раз замерзала. Титр ее все время оставался прежним.

Опыт № 4. Черный кролик, -самка. Тот же антиген, что и в первых опытах, введен внутривенно 18/XI 1924 в количестве 1 куб. сант., 23/XI—1½ куб. сант., 29/XI—2 куб. сант., 5/XII—2½ куб. сант., 10/XII—3 куб. сант., 15/XII—испытание сыворотки. Титр—1:1000 через 1 мин. и 1:3000—через 4 мин. Через 2 мес.—вторая серия введения того же антигена; последний введен внутривенно 8/II 1925 в качестве 1 куб. сант., 15/II—1½ куб. сант., 23/II—2 куб. сант., 2/III—2 куб. сант., 9/III—2½ куб. сант., 18/III—испытание титра активной сыворотки; оказалось, что титр этот значительно повысился, именно, тотчас же получалась реакция с раствором крови 1:1000, а через 1 минуту—даже с раствором крови 1:15000 реакция была тоже положительной. Кролик обескровлен вскрытием сонной артерии, сыворотки получено 12 куб. сант. Консервирование сыворотки по

тому же способу, что и раньше. До 20/VI титр прежний, потом флакон с сывороткой случайно разбит.

Опыт № 5. Кролик-самец, черный. Тот же антиген, что и раньше (сыворотка пропускалась через фильтр Berkefeld'a), введен внутривенно 15/XII 1924 в количестве 1 куб. сант., 22/XII—1½ куб. сант., 28/XII—5 куб. сант. внутривенно, 3/I 1925 внутривенно в колич. 2½ куб. сант. и 10/I—также 2½ куб. сант. 16/I—испытание титра: с раствором крови человека 1:1000 реакция тотчас же, с раствором 1:18000—через 2 мин. 17/I—испытание специфичности сыворотки: ни с кровью коровы, ни с кровью лошади реакции нет. Через 6 мес. начата повторная иммунизация. Предварительное испытание показало, что сыворотка кролика совершенно неактивна. Тот же антиген был введен внутривенно 1/VII 1925 в количестве 1,3 куб. сант., 14/VII—1,5 куб. сант. (несмотря на большой промежуток между 1-м и 2-м вспыскиваниями анафилактики не наблюдалось), 20/VII—2 куб. сант., 25/VII—2 куб. сант., 30/VII—3 куб. сант. 5/VIII произведено испытание титра сыворотки: резкая реакция с раствором человеческой крови 1:1000 тотчас же после добывания активной сыворотки, с раствором крови 1:25000—через 2 мин. Кролик не был обескровлен, а сыворотка получалась по мере надобности кровопусканием из ушной вены. Через 4 мес. третья серия иммунизации тем же антигеном, который введен внутривенно 4/XII 1925 в количестве 1½ куб. сант., 7/XII—2 куб. сант., 11/XII—2½ куб. сант., 14/XII—1½ куб. сант. 20/XII испытание титра: тот же титр, что и после второй серии иммунизации. Кролик обескровлен вскрытием арт. carotis. Активная сыворотка консервирована тем же способом, что и раньше, хранилась за окном в течение 6 мес., оставаясь прозрачной. Каждый месяц производилось испытание титра. На шестом месяце титр сыворотки упал до 1:20000.

Опыт № 6. Кролик-самец, черный. Тот же антиген. Фильтрация антигена через фильтр Berkefeld'a. За 20 мин. перед каждым введением антигена кролику впрыскивалось 0,1 куб. сант. 1% sol. pilocarpini hydrochlorici (что, по наблюдениям Salomonsen'a и Madsen'a⁶⁾, будто-бы влияет на иммунизацию в смысле получения более активной сыворотки). После введения пилокарпина наблюдалось сильное слюнотечение. Антиген введен внутривенно 30/XII 1924 в количестве 1½ куб. сант., 4/I 1925—1½ куб. сант., 13/I—1½ куб. сант., 20/I—1½ куб. сант. и 26/I—6 куб. сант. внутривенно. 3/II испытание титра сыворотки: пилокарпин никакого влияния не оказал, и титр был—1:1000 тотчас же белое кольцо и 1:7000 через 4 мин. 29/II новая проверка титра: сыворотка оказалась совершенно неактивной. Через 8 мес. вторая иммунизация того же кролика, без применения пилокарпина. Антиген введен внутривенно 1/X 1925 г. в количестве 1 куб. сант., 3/X—1,5 куб. сант., 7/X—2 куб. сант., 10/X—2 куб. сант. 15/X испытание сыворотки: титр активной сыворотки—1:1000 тотчас же, 1:2000—через 5 минут. Кролик обескровлен, получено около 17 куб. сант. активной сыворотки. Сделана проба консервирования последней по Begey⁷⁾ (в флакон с сывороткой положена медная пластинка). Уже через 10 дней (25/X) сыворотка помутнела, дала сильный осадок и сделалась негодной для постановки преципитивной пробы.

Опыт № 7. Кролик-самец, белый. Антиген тот же, что и в первых опытах, введен внутривенно 23/VIII 1925 в количестве 0,8 куб. сант., 29/VIII—1,25 куб. сант., 3/IX—1,5 куб. сант., 10/IX—2 куб. сант., 17/IX—2 куб. сант., 25/IX—2 куб. сант. Тотчас же почти после последнего введения антигена—сильные клонические судороги, резко учащенное дыхание в промежутках между судорогами, остановка дыхания во время судорог. Кролик остался жив, но, ввиду наступившего резкого истощения, был обескровлен 2/X. Сыворотки было получено 10 куб. сант. Определение титра дало следующие результаты: с раствором человеческой крови 1:1000 тотчас же получилось белое кольцо, с раствором же 1:10000—через 4 мин. Большая часть полученной иммунной сыворотки израсходована в свежем виде, и только 4 куб. сант. ее консервировано с помощью той же смеси спирта с физиологическим раствором. Консервированная сыворотка хранилась за окном около 5 мес.

Опыт № 8. Кролик-самка, черная. Тот же антиген, что и раньше, введен внутривенно 26/IX 1925 в количестве 1 куб. сант., 29/IX—1,2 куб. сант., 3/X—2 куб. сант., 6/X—2,5 куб. сант., 10/X—2 куб. сант. 15/X—испытание сыворотки. Последняя оказалась неактивной. Через 1½ месяца—новая иммунизация тем же антигеном, который введен внутривенно 4/XII 1925 в количестве 1 куб. сант., 7/XII—1,2 куб. сант., 12/XII—2 куб. сант. 17/XII определение титра сыворотки.

Реакция с разведением человеческой крови 1:1000—тотчас же и с разведением 1:15000—через 8 мин. (резкое белое кольцо). Кролик не обескровливался, а по мере надобности у него бралась кровь из ушной вены, в количестве не более 5 куб. сант. зараз. Через 1½ мес. сыворотка потеряла активность. Через 6 мес. после второй иммунизации—третья серия внутривенного введения того же антигена в количестве: 20/VI 1926—1 куб. сант., 25/VI—1,5 куб. сант., 30/VI—2 куб. сант., 5/VII—2,5 куб. сант. 10/VII определение титра сыворотки дало следующие результаты: с разведением крови 1:1000 тотчас же белое кольцо, с разведением 1:15000—через 3—4 мин. Произведено обескровливание кролика вскрытием арт. carotis. Во время обескровливания наступила остановка деятельности сердца, и крови удалось собрать около 20 куб. сант. Полученная из крови сыворотка консервирована тем же способом, что и раньше, и до сих пор сохраняет свой титр.

Опыт № 9. Кролик-самец, черный. Тот же антиген, что и раньше, введен внутривенно 2/XI 1925 в количестве 1,5 куб. сант., 5/XI—2 куб. сант., 9/XI—2 куб. сант. 15/XI испытание сыворотки. Реакция с раствором крови 1:1000—тотчас же, с раствором же 1:5000—через 5 мин. Через 2 мес. вторая серия введения того же антигена, который введен внутривенно 14/I 1926 в количестве 1 куб. сант., 18/I—1,5 куб. сант., 23/I—2 куб. сант., 28/I 2,5 куб. сант. Испытание сыворотки, произведенное 1/II, показало титр 1:1000 (реакция тотчас же) и 1:25000 (через 4—5 мин.).

Таким образом из 9 иммунизированных кроликов только два (№№ 5 и 7) дали преципитирующую сыворотку достаточной силы уже после первой иммунизации, все же остальные дали только слабые сыворотки, непригодные для судебно-медицинских целей. Один из кроликов, именно в опыте № 8, дал после первой иммунизации совершенно неактивную сыворотку. Вторичная иммунизация за исключением одного случая (опыт № 6) давала очень хорошие результаты, именно, активность сыворотки значительно увеличивалась, и титр ее становился вполне достаточным для судебно-медицинских целей. В 2 случаях (опыты №№ 5 и 8) кролики подвергались троекратной иммунизации, причем в опыте № 5 после третьей иммунизации получился тот же титр сыворотки, что и после второй серии введения антигена, а в опыте № 8 третья иммунизация дала более активную сыворотку (максимальный титр сыворотки после второй иммунизации был 1:15000 через 8 мин., а после третьей иммунизации—1:15000 через 3—4 мин.).

Явления анафилаксии наблюдались нами 2 раза, именно, в опыте № 2 и в опыте № 7, где вместо обычных 5 введений антигена было сделано по 6 впрыскиваний его. При обычно принятой иммунизации пятикратным введением антигена явлений анафилаксии совершенно не наблюдалось. Что касается метода иммунизации, то наилучшим оказался способ внутривенного введения антигена, как требующий наименьшего количества человеческой сыворотки. Это обстоятельство крайне существенно, так как при наших местных условиях получить свежую человеческую сыворотку нелегко. Самая техника внутривенного введения довольно проста и при надлежащей подготовке необходимых инструментов и антигена совершенно безопасна для опытных животных.

Поставленными опытами вполне наметился дальнейший путь работы нашей лаборатории, и впредь иммунизация животных будет производиться исключительно внутривенным способом и повторными сериями введения антигена.

Что касается предложения Salomonsen'a и Madsen'a—для повышения силы преципитирующих сывороток делать впрыскивания пилокарпина прежде, чем вводить антиген, то единственный опыт, поставленный мною (№ 6), показал, что при этом никаких преимуществ не получается.

Вторая серия иммунизации, как показал Райский^{*)}, может быть сильно сокращена,—по его наблюдениям достаточно даже однократного введения антигена для получения очень хороших результатов. Это обстоятельство чрезвычайно важно в смысле экономии антигена, и дальнейшие наши опыты будут поставлены именно в этом направлении.

Что касается вопроса о сохранении иммунных сывороток, то здесь, как известно, имеются три пути: 1) запаивание стерильно полученных сывороток в ампуллы, 2) высушивание их на бумаге или стекле и 3) консервирование добавлением дезинфицирующих веществ. Первый способ является в настоящее время наиболее распространенным, но по чисто техническим соображениям он не мог быть применен в нашей лаборатории. Второй способ имеет ряд существенных недостатков и почти совершенно неприменим. Наконец, третий способ сравнительно мало проверен, но он наиболее подходит к условиям нашей лаборатории, почему нам и пришлось остановиться на нем.

Так как прибавление таких консервирующих веществ, как формалин, карболовая кислота и т. д., резко влияет на сыворотки, то нами были избраны два способа, именно, проверены предложение Вегера^{*)} и способ проф. Григорьева. Способ Вегера был применен в опыте № 6 и дал совершенно нежелательные результаты. Способ проф. Григорьева^{*)} применялся в опытах №№ 1, 3, 4, 5, 7 и 8 и оказался вполне пригодным для сохранения преципитирующих сывороток,—последние сохранялись в течение долгого времени, причем титр их падал немного, во всяком случае не больше, чем при общепринятом способе запаивания их в ампуллы. Замерзание такой сыворотки, даже и повторное, не оказывало заметного влияния, что вполне согласуется с наблюдениями Караганова над замерзанием сывороток, запаянных в стеклянные трубочки.

Способ проф. Григорьева был изменен в нашей лаборатории только в той части его, которая касается постановки самой пробы Uhlenhuth'a. Именно, проф. Григорьев при постановке пробы активную сыворотку, консервированную по его способу, предварительно испаряет при комнатной температуре, сухой остаток растворяет в физиологическом растворе и уже этот раствор применяет для реакции Uhlenhuth'a. В этом виде способ проф. Григорьева слишком сложен, почему нами была сделана попытка непосредственного применения консервированной по Григорьеву сыворотки, причем и растворение исследуемых пятен производилось не физиологическим раствором NaCl, а тем же раствором Григорьева, которым консервировалась и сыворотка. Результаты оказались вполне благоприятными,—реакция Uhlenhuth'a всегда получалась только с раствором крови человека и ни разу не была получена с раствором крови животных или с раствором поваренной соли.

Таким образом и в этом виде проба вполне сохраняет свою специфичность, делалась в то же время гораздо более простой, чем предложил проф. Григорьев.

Вот, в кратких словах, те выводы, которые можно сделать из небольшого числа поставленных нами опытов. Все эти наблюдения, безусловно,—только предварительные: работа нашей лаборатории по этому вопросу еще только налаживается, и дальнейшие результаты будут сообщены впоследствии.

Л И Т Е Р А Т У Р А.

- 1) Таранухин. Вестн. Общ. Гиг., 1914, февраль.—2) Бенниг. Ibid.—3) Uhlenhuth. Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens u. s. w. Jena, 1909.—4) Караганов. Дисс. Изв. Томского Ун-та, 1913.—5) Цит. по Караганову.—6) Цит. по Dieudonné: Иммулитет, предохранит. прививки и сывороточное лечение, СПб., 1913.—7) Beger. Zentr. f. Bakt., Bd. 89, 1922.—8) Райский. Учен. Зап. Саратовского Ун-та, т. V, вып. I, 1926.—9) Григорьев. Реф. в Вестн. Общ. Гигиены, март, 1912.
-