

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. L. Kotter

D-4

Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß
in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten
Hämagglutination

Christine Herrmann

I

Die Differenzierung von tierischem Gewebe nach der Tierart mit Hilfe serologischer Reaktionen bereitet auch bei verarbeitetem Fleisch keine Schwierigkeiten, solange das Material nicht über 70° C erhitzt worden ist. Gerade die Differenzierung von höher erhitzten Fleischwaren hat nun aber heute überragende Bedeutung, wobei Verfälschungen mit "Fremdeiweißen" (Hühnereiweiß, Milcheiweiß, Pflanzenproteine usw.) im Vordergrund stehen.

Bisher wurden für serologische Proteindifferenzierungen auch wegen ihrer methodischen Einfachheit bevorzugt Präzipitationsreaktionen verwendet. Die da-für ebenfalls geeignete indirekte Hämagglutination ist zwar etwas komplizierter, hat sich jedoch als spezifischer und auch in der Empfindlichkeit der Präzipitation als überlegen erwiesen.

II

Methodisch verfahren wir bei der indirekten Hämagglutinationsreaktion für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Anlehnung an die Untersuchungen von BOYDEN (1, 2) folgendermaßen:

Frisches Hammelblut wird dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zentrifugiert und ca. 12 Stunden bei 4 bis 6° C gehalten. Für die Tanninbehandlung werden 5 ml der

gewaschenen Hammelerythrozyten mit 17,5 ml physiologischer Kochsalzlösung und unter leichtem Schütteln mit 2,5 ml einer 0,1 %igen Tanninlösung versetzt. Man läßt die Erythrozytenaufschwemmung 15 min bei Zimmertemperatur stehen, zentrifugiert ab und wäscht das Zentrifugat so oft mit physiologischer Kochsalzlösung, bis der Überstand klar bleibt. Anschließend wird das Erythrozytensediment im Meßzylinder mit physiologischer Kochsalzlösung auf 25 ml aufgefüllt.

Zur Sensibilisierung der mit Tannin behandelten Hammelerythrozyten wird für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß eine 0,5 bzw. 1,5 %ige Lösung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in physiologischer Kochsalzlösung verwendet. 5 ml dieser Eiweißlösung werden mit 10 Vol.-% (0,5 ml) gewaschenen, nicht mit Tannin behandelten Erythrozyten versetzt, nach 15 min abzentrifugiert und der klare Überstand weiter verwendet.

Zu dieser Milcheiweißlösung werden 5 ml tanninbehandelte Hammelerythrozyten zugefügt, 2 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert, anschließend abzentrifugiert und das Sediment dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 20 ml aufgefüllt.

Für einen optimalen Reaktionsausfall ist die Konzentration des Antigens im Sensibilisierungsgemisch von großer Bedeutung.

Zur Ermittlung der wirksamsten Antigenkonzentrationen wurden zur Sensibilisierung nicht erhitzte sowie 15 min auf 70° C erhitzte Milcheiweißlösungen verschiedener Konzentrationen benutzt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt.

Nach Tabelle 1 erwies sich zur Sensibilisierung eine 0,5 %ige Milcheiweißlösung (das sind ca. 25 mg lösliche Substanz pro ml tanninbehandelter Hammelerythrozyten) als geeigneteste Konzentration; für erhitztes Antigen nach Tabelle 2 eine 1,5 %ige Milcheiweißlösung.

Von hocherhitztem Untersuchungsmaterial (über 90° C) werden 100 g mit dem Wolf (feine Scheibe) zerkleinert und lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird im Verhältnis 1 : 2, bezogen auf das Feuchtgewicht des Untersuchungsgutes, mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt, 48 Stunden bei 4 bis 6° C extrahiert, abzentrifugiert und der Überstand - durch Gaze filtriert - für den Test verwendet.

Vor Ansatz der Hämagglutinationsreaktion wird das durch Immunisierung mit aufgeschlossenem Milcheiweiß an Kaninchen gewonnene Antiserum jeweils 30 min bei 56° C im Wasserbad gehalten und zum Entfernen heterologer Hämagglutinine dreimal mit 10 Vol.-% gewaschenen Hammelerythrozyten zentrifugiert.

1 ml Antiserum wird mit 0,5 ml Untersuchungsextrakt versetzt, 1 Stunde bei 37° C im Brutschrank gehalten, abzentrifugiert und davon anschließend 0,5 ml geometrisch verdünnt. Zu diesen Ansätzen werden je 0,1 ml der mit Antigen beladenen Hammelerythrozyten zugesetzt.

Für jede Untersuchung wird eine Serunkontrolle durchgeführt und in analogen Ansätzen positive und negative Kontrollen geprüft.

Je nachdem, in welchem Ausmaß das Untersuchungsgut aufgeschlossenes Milcheiweiß enthält, muß es zu einer Hemmung der Hämagglutination gegenüber den Kontrollen kommen.

III

Die folgenden Tabellen 3, 4 und 5 zeigen die Untersuchungsergebnisse - und zwar Mittelwerte aus je 40 Ansätzen - von nativen, auf 70 bzw. 115° C erhitzten Milcheiweißlösungen in verschiedener Konzentration mit einem Antiserumtiter von 32 768.

Bei Verwendung eines Antiserums mit einem Titer von 65 536 in jeweils 10 Ansätzen (Tabelle 6) ist es möglich, zwischen 0,1 und 0,2 %igen, 30 min auf 115° C erhitzten Milcheiweißlösungen zu differenzieren.

Die Abbildung 1 vermittelt eine zusammenfassende Übersicht der Untersuchungsergebnisse des Milcheiweißnachweises in auf 115° C erhitztem Brühwurstmaterial bei Verwendung unterschiedlicher Antiseren (Titer 65 536, 32 768, 16 384, 8 192).

Wie aus der Abbildung entnommen werden kann, ist eine eindeutige Differenzierung mit Antiserentitern ab 16 384 zwischen Milcheiweißkonzentrationen von 1,5; 1,7; 2,0; 2,2; 2,5; 2,7 und 3,0 % möglich.

Inzwischen wurde auch eine mögliche Beeinflussung der serologischen Reaktion durch Fett und Gewürze im Untersuchungsmaterial geprüft. Der Vergleich zwischen entfettetem und nicht entfettetem Material ließ keine Unterschiede in den Reaktionen erkennen. In Modellwürsten, die mit verschiedenen im Handel befindlichen Gewürzmischungen hergestellt wurden, ergab sich gegenüber ungewürzten, nur gesalzenen Modellwürsten in der Regel eine Verzögerung der positiven Reaktion auf Milcheiweiß - also der Hämagglutinationshemmung - um zwei Verdünnungsstufen; dadurch wird die eindeutige Differenzierung verschiedener Milcheiweißkonzentrationen bei niedrigeren Antiserentitern (16 384) erschwert.

Nach 24stündiger Dialyse bei Zimmertemperatur des gewürzten Untersuchungsmaterials gegen häufig zu wechselndes Aqua dest. wurden keine Unterschiede gegenüber den Reaktionsergebnissen der ungewürzten Proben beobachtet.

Die quantitative Aussage mittels serologischer Reaktionen bei der Eiweißdifferenzierung in Fleischerzeugnissen steht und fällt mit der Spezifität und Aktivität der Antiseren. Eine beachtliche Steigerung der Antikörperbildung gegen erhitztes, aufgeschlossenes Milcheiweiß konnte mit Hilfe bestimmter Metalladjuvantien erreicht werden, so daß heute Antiserentiter von 16 384 bis 65 536 und mehr, gegenüber früheren von höchstens 8 192, verwendet werden können (3, 4).

Durch die Anwendung der indirekten Hämagglutination dürfte also die biologische Eiweißdifferenzierung in der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung erheblich an Bedeutung gewinnen.

Tabelle 1

Verdünnung

Ansatz

natives*
Antigen
in %

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072	262144	
0,5% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅
0,5% n.K.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1,0% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅
1,0% n.K.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1,5% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅
1,5% n.K.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
2,5% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
2,5% n.K.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
5,0% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
5,0% n.K.	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
10,0% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
10,0% n.K.	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Zeichenerklärung: ... % p.K. = positive Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit phys. Kochsalzlösung.

... % n.K. = negative Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit 2 %iger Milcheiweißlösung.

* Gervita S, Firma Gervais, Rosenheim

+++ = stark positiv

++ = positiv

+ = schwach positiv

Tabelle 2

Ansatz

Verdünnung

15 min auf
70° C er-
hitztes
Antigen
in %

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072	262144	
0,5% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
0,5% n.K.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1,0% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1,0% n.K.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1,5% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅
1,5% n.K.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
2,5% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
2,5% n.K.	+	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
5% p.K.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
5% n.K.	+++	+++	+++	+++	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Zeichenerklärung: siehe Tabelle 1

Tabelle 3

Ansatz	Verdünnung																	
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072	
p-Kontr.	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅
n-Kontr.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 0,2%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅
nME 0,5%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 0,7%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 1,0%ig	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 1,5%ig	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 2,0%ig	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 2,2%ig	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 2,5%ig	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 2,7%ig	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
nME 3,0%ig	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Zeichenerklärung: p-Kontrolle = positive Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit phys. Kochsalzlösung (Serumtiter)

n-Kontrolle = negative Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit 2%iger Milcheiweißlösung

nME ... = .. = %ige native Milcheiweißlösung

T a b e l l e 4

Ansatz	Verdünnung																	
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072	
p-Kontr.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅
n-Kontr.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 0,2%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	
eME 0,5%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 1,0%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 1,5%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 1,7%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 2,0%ig	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 2,2%ig	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 2,5%ig	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 2,7%ig	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
eME 3,0%ig	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	

Zeichenerklärung: p-Kontrolle = positive Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit phys. Kochsalzlösung (Serumtiter)

n-Kontrolle = negative Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit 2%iger Milcheiweißlösung

eME ...%ig = 30 min auf 70° C erhitzte ...%ige Milcheiweißlösung

Tabelle 5

Ansatz	Verdünnung																
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072
p-Kontr.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅
n-Kontr.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 0,2%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅
TME 0,5%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅
TME 1,0%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 1,5%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 1,7%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 2,0%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 2,2%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 2,5%ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 2,7%ig	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
TME 3,0%ig	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Zeichenerklärung: p-Kontrolle = positive Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit phys. Kochsalzlösung (Serumtiter)

n-Kontrolle = negative Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit 2%iger Milcheiweißlösung

TME ...%ig = 30 min auf 115° C erhitzte ... %ige Milcheiweißlösung

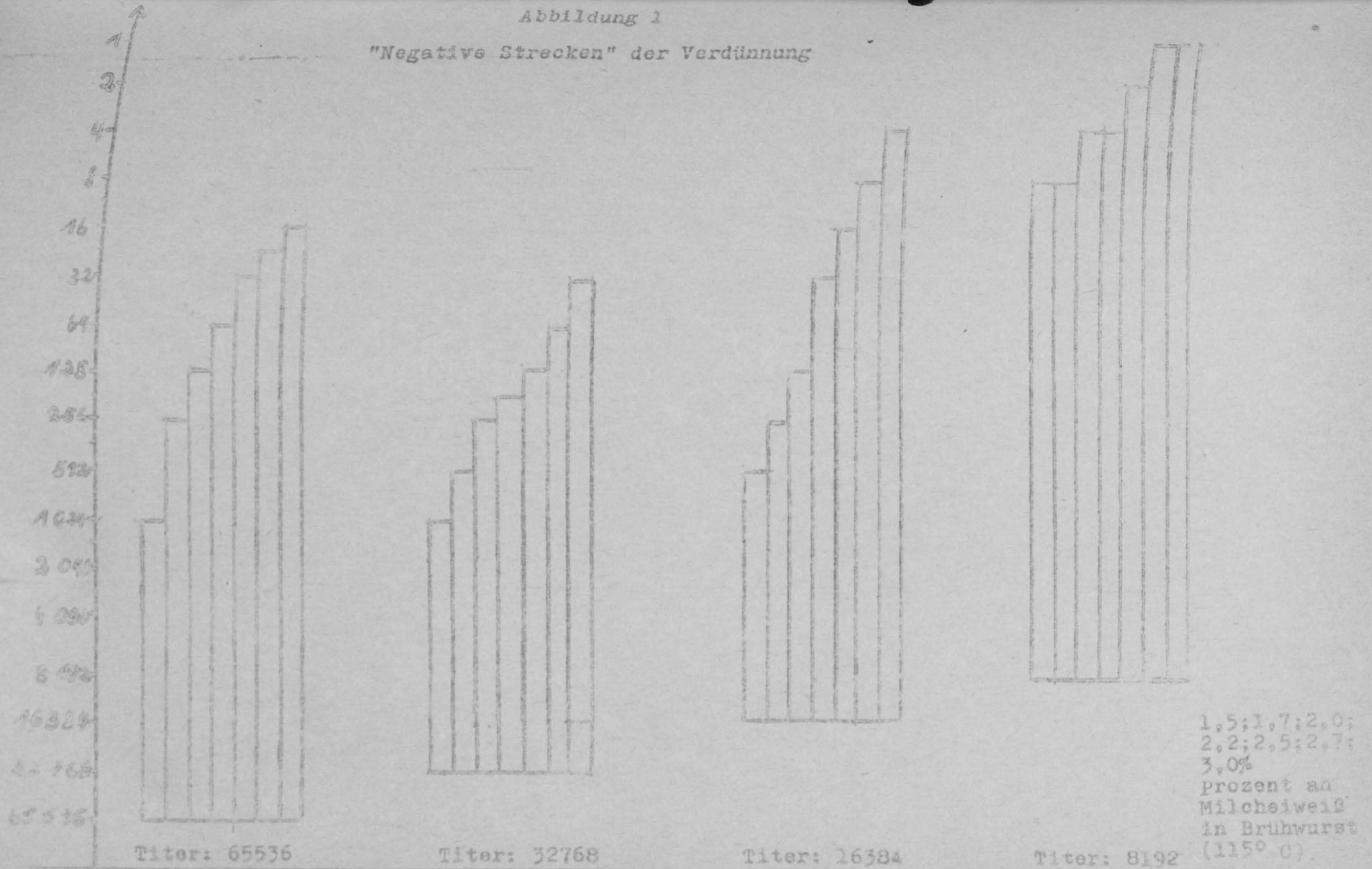
Tabelle 6 (Fortsetzung)

Ansatz	Verdünnung																		
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072	262144	
TME 0,2 %ig	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	

Zeichenerklärung: p-Kontrolle = positive Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit phys. Kochsalzlösung (Serumtiter)
 n-Kontrolle = negative Kontrolle des Anti-Milcheiweißserums mit 2 %iger Milcheiweißlösung.
 TME ... %ig = 30 min auf 115° C erhitzte Milcheiweißlösung.

Abbildung 1

"Negative Strecken" der Verdünnung



Zusammenfassung

Mittels der indirekten Hämagglutination kann Milcheiweiß auch in hochehitzten Fleischerzeugnissen (115°C) notwendigenfalls sogar quantitativ differenziert werden. Die erforderlichen Antiseren gegen erhitztes Milcheiweiß wurden durch Immunisierung mittels Metallverbindungen gewonnen. Zur Gewinnung von serologisch noch reaktionsfähigen Eiweißkomponenten sind Dialyse und Lyophilisierung des hochehitzten Materials notwendig.

Unter Anwendung der im einzelnen beschriebenen Methode konnte Milcheiweiß auch in bis auf 115°C erhitztem Material in Konzentrationen ab 0,1 % quantitativ erfaßt werden.

Summary

Milkprotein can even be detected by indirect hemagglutination test in highly heated food of animal origin. The method gives quantitative results. The antisera which are necessary for the detection of heated protein were produced by immunization using metal compounds. Production of serologically reactive protein compounds can only be achieved by dialysing and lyophilising of the highly heated material. By this method, which is exactly described, we were able to detect proteins from cow's milk in concentrations of 0,1 per cent.

Riassunto

Per mezzo dell'emoagglutinazione indiretta è possibile determinare nei prodotti carnei sottoposti a trattamento termico sino anche a 115°C , la presenza di caseinato di sodio. Per la reazione sierologica, il materiale da esaminarsi deve essere preventivamente liofilizzato e dializzato. L'antisiero specifico è ottenuto da conigli immunizzati mediante inoculazione di materiale antigene (soluzioni di caseinato di sodio) più adiuvanti dell'immunità sul tipo di metalli (idrossido di alluminio, cloruro di ferro). con l'emoagglutinazione indiretta si possono svelare nei prodotti carnei cui sia stato aggiunto

del caseinato di sodio, quantita di detta sostanza, partendo da un minimo di concentrazione pari allo 0,1 %.

Résumé

Grâce à l'agglutination sanguine indirecte, il est également possible, si nécessaire, de différencier même quantitativement l'albumine du lait dans les produits de boucherie et de charcuterie portés à haute température (115° C environ). Les antisérum nécessaires contre l'albumine chauffée du lait ont été obtenus par immunisation au moyen de combinaisons métalliques.

Pour obtenir des composants albuminoïdes qui, du point de vue sérologique, puissent encore être sujets à des réactions, la dialyse et lyophilisation de la matière portée à haute température sont nécessaires.

En appliquant la méthode décrite en détail, il a été possible, même dans de la matière chauffée à 115° C, de déterminer quantitativement l'albumine du lait à partir d'une concentration de 0,1 %.

Literatur

1. Boyden, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exper. Med.* 13 (1951), 107;
2. Boyden, S. V., und E. Sorkin: A study of antigens active in the tannic acid hemagglutination test present in filtrates of culture of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 75 (1955), 15;
3. Kotter, L., Ch. Herrmann, Ch. Ring und G. Corsico: Untersuchungen zur Steigerung der Antikörperbildung gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen. Im Druck;
4. Ring, Ch.: Vermehrte Bildung von Antikörpern gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen. Diss. med. vet., München 1964.