

(Aus dem Gerichtsmedizinischen Institut der Universität Kopenhagen.
Direktor: Professor Dr. med. *Knud Sand.*)

Die gerichtsmedizinische Fleckenuntersuchung durch Typenbestimmung.

II. Über den Nachweis des Receptors M in Blutflecken.

Von

Frederik Therkelsen,

Prosektor am Institut.

Die Entdeckung der M- und N-Receptoren in den Blutkörperchen ist erst wenige Jahre alt, daher ist es auch begreiflich, daß die Untersuchungen über den Nachweis dieser Receptoren in den Körperflüssigkeiten und Flecken von solchen sich noch im Entwicklungsstadium befinden.

In einer früheren Publikation aus dem hiesigen Institut über Fleckenuntersuchungen von *L. Christensen* wurden lediglich Untersuchungen nach dem A-B-O-System berichtet. In einer jüngst von *Therkelsen* veröffentlichten Mitteilung war von der Frage nach dem schwer nachweisbaren A₂-Receptor in A₂B-Blutflecken die Rede. — In einer Abhandlung von *J. Clausen* wird über Versuche berichtet, M und N durch Absorption von Anti-Sera mit Extrakten und Fleckensubstanz von Blutflecken nachzuweisen, die jedoch keine sicheren und konstanten Resultate lieferten.

Lauer hat einige Untersuchungen über den Nachweis von M und N in Trockenblut und Blutflecken mitgeteilt, die eine besondere Apparatur erfordern. Er gibt an, mit Pulver aus Trockenblut gute Resultate erzielt zu haben, während aus Blutflecken hergestelltes Blutpulver nicht immer deutliche Reaktionen gab.

Die Schwierigkeit beim Nachweis der Receptoren M und N in Blutflecken liegt besonders in der Neigung zu unspezifischer Bindung von Anti-M und Anti-N an das Blut (ohne Rücksicht auf dessen Typus) wie auch an die Aufsaugungsunterlage. Man kann demnach selbst in Fällen, wo das Blut den dem Antistoff entsprechenden Receptor nicht enthält, eine so erhebliche Agglutininbindung erhalten, daß der Unterschied zwischen ihr und der spezifischen Agglutininbindung, die mit einer den Receptor enthaltenden, ebenso großen Blutmenge erzielt wird, nicht groß genug ist.

Bei N-Flecken kommt noch der Umstand hinzu, daß die Affinität zwischen Anti-N und dem N-Receptor viel geringer ist als zwischen den Receptoren A, B und M gegenüber ihren Antistoffen.

Am hiesigen Institut habe ich in letzter Zeit mit einer *Methode* gearbeitet, die bezweckt, die Wirkungen der unspezifischen Absorption abzuschwächen, so daß die spezifische Wirkung deutlicher zutage tritt. Die Methode scheint in bezug auf den Receptor M gute und gleichartige

Resultate zu gewährleisten, während es beim Nachweis des N-Receptors nicht geglückt ist, befriedigende Ergebnisse zu erlangen.

Die Methode beruht im Prinzip darauf, daß man durch stufenweisen Zusatz von Anti-M-Serum zu ebenso großen Mengen Fleckensubstanz von den verschiedenen Typen (M, N und MN) und Ausprobieren der Reaktion des absorbierten Serums gegenüber N-haltigen Blutkörperchen vor jedem neuen Zusatz von Serum zu dem Punkte gelangt, wo die unspezifische Bindung so hochgradig neutralisiert ist, daß man bei nachheriger Titrierung imstande ist, je nachdem die Fleckensubstanz M enthalten hat oder nicht, einen deutlichen Unterschied im Titer der von Fleckensubstanz befreiten Sera nachzuweisen.

Mit der Methode wird demnach bezweckt, das ganze Agglutinin-niveau vor der endgültigen Austitrierung über die unspezifische Bindung emporzuheben, so daß ein M-Serum, das mit einer den M-Receptor nicht enthaltenden Fleckensubstanz absorbiert wird, zum Vergleich verwendbaren (genügend hohen) Titer aufweisen kann, ohne daß so viel Serum zugesetzt worden ist, daß ein etwaiger M-Receptor-Gehalt nicht imstande ist, sich zu erkennen zu geben.

Technik.

1. Gleich großen Mengen zerkleinerter Fleckensubstanz (im gegenwärtigen Falle 50 mg), die möglichst ebensoviel Blut enthält, wird 0,15 ccm Anti-M-Serum in der Verdünnung 1:2 zugesetzt. Es wird Fleckensubstanz (siehe Schema 1) von Blut der Typen M, MN und N untersucht (in diesem Versuch Blut von 5 verschiedenen Personen). Zur Kontrolle werden 35 mg des Stoffes ohne Fleck (35 mg Stoff entsprechen etwa der in 50 mg Fleckensubstanz enthaltenen Stoffmenge) ebenfalls 0,15 ccm Anti-M-Serum zugesetzt. Die Flecke werden experimentell auf mehrmals gewaschenem Leinen hergestellt.

Nach sorgfältiger Mischung von Fleckensubstanz und Serum in allen 5 Gläsern werden diese etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das 6. Glas

Schema 1.

Absorptionszeit Stunden	Serum verdünnt 1:2 ccm	Fleckensubstanz 50 mg					Kontrolle	
		A ₁ M	A ₂ M	A ₁ BMN	A ₂ BMN	BN	Stoff 35 mg	Serum
$1\frac{1}{2}$	0,15	—	—	—	—	+++	++	+++
$1\frac{1}{2}$	0,10	—	—	((+))	((+))	+++	++	+++
$1\frac{1}{2}$	0,10	—	—	((+))	((+))	+++	++	+++
Titrierung								
Steigende Verdünnungen		—	—	(+)	+	++	++	+++
		—	—	—	—	++	+	+++
		—	—	—	—	+	+	++
		—	—	—	—	+	+	++
		—	—	—	—	+	(+)	+
		—	—	—	—	+	—	+
		—	—	—	—	(+)	—	+

mit dem „Kontrollstoff“ wird ebenso behandelt. — Sodann wird 1 Tröpfchen aus jedem Glas abpipettiert und auf einem Objektträger mit einem ebenso großen Tröpfchen einer O-MN-Blutkörperchenaufschwemmung vermischt. Dabei stellt sich heraus, daß aus den Gläsern mit N-Fleckensubstanz und „Kontrollstoff“ Agglutination erfolgt, aus den anderen aber nicht. Danach wird allen 6 Gläsern wieder Serum zugesetzt (0,1 ccm in der Verdünnung 1:2), 1½ Stunden stehen gelassen und auf die gewöhnliche Weise geprüft. Damit wird so lange fortgefahren, bis von der Flüssigkeit mit M-N-Fleckensubstanz deutliche Agglutination erfolgt. — Sobald die Agglutination stattgefunden hat, werden die Flüssigkeiten (in Zwergreagensgläsern) in all den Gläsern wie gewöhnlich austitriert (wobei die Flüssigkeit im 1. Titrierungsglas unverdünnt ist, im 2. in 2 facher Verdünnung usw.). Es wird auch eine Austitrierung des Anti-M-Serums allein ausgeführt. Bei der Titrierung gewahrt man, daß der Titer für mit N absorbiertes Serum 6—7 Stufen höher wird als für mit M-Fleckensubstanz absorbiertes und 4 Stufen höher als für mit MN-Fleckensubstanz absorbiertes Serum. — Die unspezifische Absorption für den Stoff allein zeigt sich dadurch, daß der Titer für Serum + Stoff 2 Stufen niedriger ist als für Serum allein (und für Serum + N-Fleckensubstanz).

2. Die Bedeutung dieses Verfahrens, mittels dessen man deutliche Ausdrücke für die spezifische Absorption zu erhalten scheint, wird durch Schema 2 veranschaulicht, das einen Versuch wiedergibt, wo man für jeden Zusatz von Serum nach vorstehender Beschreibung eine Titrierung ausführt, um die Stärke der Serum-Fleckensubstanz-Gemische nach jeder einzelnen Absorption zu prüfen. Nach dem ersten Zusatz stellt sich heraus, daß die Absorption für mit M- und MN-Fleckensubstanz absorbiertes Serum vollständig ist. Mit N-Fleckensubstanz absorbiertes Serum zeigt einen anscheinend 4—5stufigen Titer, die Agglutination ist aber so schwach und undeutlich, daß sich aus diesem Ergebnis keine Rückschlüsse ableiten lassen. Nach den folgenden Serumzusätzen findet man hingegen, daß das mit N-Fleckensubstanz absorbierte Serum im Verhältnis zu dem mit M- oder MN-Fleckensubstanz absorbierten Serum einen sehr kräftigen Titer hat. — Bei allmählicher Vermehrung des Serumzusatzes ergibt sich, daß der Unterschied immer geringer wird, und nachdem im ganzen 0,65 ccm Serum (verdünnt 1:2) zugesetzt worden ist, ist nur noch eine Titerensenkung von 2—3 Stufen für das mit MN- bzw. mit M-Fleckensubstanz absorbierte Serum zu verzeichnen.

3. Schema 3 gibt die Absorptionsversuche mit verschiedenen Mengen (25 bis 50 bis 75 mg) Fleckensubstanz wieder. Es erhellt daraus, daß sogar mit nicht mehr als 25 mg Fleckensubstanz (= etwa 0,025 ccm Blut) deutliche Titerunterschiede erzielt werden.

Sowohl in Versuch 1 wie 2 hat der Stoff ohne Fleck mehr Anti-M absorbiert als der Stoff + N-Fleck. Woran das liegt, ist nicht klar, möglicherweise beruht es darauf, daß das Blut die Fasern des Stoffes dergestalt umschließt, daß ihre Absorption herabgesetzt wird.

Die Versuche scheinen demnach darzutun, daß es möglich ist, kräftige und deutliche Reaktionen zum Nachweise des Receptors M sogar in verhältnismäßig kleinen Blutfleckenmengen zu erzielen.

Dem Umstande, daß M nicht nachweisbar ist, ist sogar bei großen Fleckenmengen nicht ohne weiteres Bedeutung beizumessen, da es nicht ausgeschlossen ist, daß ein ursprünglich vorhandener Receptor auf unbekannte Art und Weise beschädigt worden ist. Es sei jedoch erwähnt, daß durch Absorption mit 14 Monate alten M-haltigen Flecken ebenso gute Ergebnisse erzielt worden sind wie mit frischen.

Schema 2.

Zimmertemperatur		Fleckensubstanz:											
Absorp- tionszeit Stunden	Serum M ₁₃ verdünnt 1:2 ccm	I			II			III			IV		
		M	MN	N	M	MN	N	M	MN	N	M	MN	N
1 $\frac{1}{2}$	0,15	0	0	0	—	—	++	—	—	++	—	—	++
1 $\frac{1}{2}$	0,10	Titrierung			—	—	++	—	—	++	—	—	++
1 $\frac{1}{2}$	0,10	0	0	0	Titrierung			—	(+)	+++	—	(+)	+++
1 $\frac{1}{2}$	0,10	—	—	+	—	—	+++	Titrierung			—	+	+++
18	↓	—	—	(+)	—	—	+++	—	+	+++	Titrierung		
1 $\frac{1}{2}$	0,20	—	—	(+)	—	—	++	—	(+)	+++	—	+	+++
		—	—	((+))	—	—	+	—	—	++	—	+	+++
		—	—	((+))	—	—	+	—	—	+	—	(+)	++
		—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	+
					—	—	—	—	—	(+)	—	—	+
								—	—	—	—	—	(+)
											—	—	—

Schema 3.

Serum			Fleckensubstanz								
Absorp- tionszeit Stunden	Serum- menge ccm	Serum ver- dünnt	25 mg			50 mg			75 mg		
			M	MN	N	M	MN	N	M	MN	N
1	0,2	1:4	—	((+))	++	—	—	++	—	—	++
2	0,05	1:1	—	((+))	++	—	—	++	—	—	++
1	0,05	1:1	—	(+)	+++	—	—	+++	—	—	+++
1	0,05	1:1	—	+	+++	—	(+)	+++	—	(+)	+++
18
			Titrierung								
			(+)	(+)	++	—	—	++	—	+	++
			—	(+)	++	—	—	++	—	—	++
			—	—	+	—	—	+	—	—	+
			—	—	+	—	—	+	—	—	+
			—	—	+	—	—	(+)	—	—	(+)
			—	—	(+)	—	—	—	—	—	—

Nicht alle Sera liefern gleich gute Resultate, insbesondere scheinen solche mit niederem Titer nicht so deutliche Tittersenkungen zu geben wie Sera mit hohem Titer.

Der sicherste Nachweis des M-Receptors ist von großer gerichtsmedizinischer Bedeutung, einerseits dadurch, daß man instande ist, unmittelbar zu untersuchen, ob ein Blutfleck den Receptor M enthält und andererseits, weil der Nachweis von M in einem Blutfleck, der sich

Schema 2.

50 mg						Kontrolle									
V			VI			Serum M _{4a}			Stoff ohne Fleck: 35 mg						
M	MN	N	M	MN	N	1	2	3	I	II	III	IV	V	VI	
—	—	++	—	—	++	0	++	++	0	+	+	+	+	+	
—	—	++	—	—	++	Titr.	+++	+++	Titr.	++	++	++	++	++	
—	(+)	+++	—	(+)	+++	+++	+++	+++	0	Titr.	+++	+++	+++	+++	
—	(+)	+++	—	+	+++	++	+++	+++	+	+++	Titr.	+++	+++	+++	
—	(+)	+++	—	(+)	+++	++	+++	+++	+	+	+++	Titr.	+++	+++	
Titrierung			+	+	+++	++	Titr.	+++	+	+	+++	+++	Titr.	+++	
—	+	+++	Titrierung			+	+++	Titr.	+	+	++	+++	+++	Titr.	
—	+	+++	+	++	+++	+	++	+++	(+)	(+)	+	++	+++	+++	
—	(+)	+++	+	++	+++	—	++	+++	—	(+)	+	+	++	+++	
—	—	++	+	+	++		++	++		—	(+)	+	+	++	
—	—	+	(+)	+	++		+	+			—	(+)	+	+	
—	—	+	—	(+)	+		+	+					+	+	
—	—	(+)	—	—	+		(+)	+					—	+	
			—	—	(+)			(+)						—	

bei der anderweitigen Untersuchung ohne die Receptoren A oder B (oder Agglutinine) erwiesen hat, dazu verhilft, die Diagnose O zu stellen, was bei fehlendem Nachweis der A- und B-Receptoren allein sonst nicht möglich wäre.

Zusammenfassung.

Es wird ein Verfahren zum Nachweis des Receptors M in Blutflecken mitgeteilt. Mit der Methode wird bezweckt, durch allmählichen Zusatz von Anti-M-Serum zur Fleckensubstanz eine so starke „Sättigung“ der unspezifischen Absorption zu erzielen, daß die spezifische Absorption deutlich in Erscheinung tritt.

Es wird betont, daß der Nachweis des M-Receptors von direkter Bedeutung ist und für die Diagnose Typus O auch indirekte Bedeutung hat.

Literaturverzeichnis.

Christensen, L., Ugeskr. Laeg. 1932, Nr 8, 187. — Clausen, J., Z. Rassenphysiol. 6, 49 (1933). — Lauer, A., Dtsch. Z. gerichtl. Med. 22, 86 (1933).