

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.
Vorsteher: Prof. Dr. R. Doerr.)

Beitrag zur Blutgruppenbestimmung kleiner Mengen menschlichen Trockenblutes.

Von
Dr. C. Hallauer.

Die Gruppenzugehörigkeit von eingetrocknetem Blut bzw. eines Blutfleckes menschlicher Provenienz kann bekanntlich auf 2 Arten eruiert werden:

1. Durch den Nachweis der vorliegenden Isoagglutinine (*Versuchsanordnung von Landsteiner-Richter in der Modifikation von Lattes*). Die Probe ist zwar hinreichend empfindlich, sie muß aber in allen jenen Fällen versagen, in denen entweder a priori kein Antikörper zugegen war (Gruppe ABo), oder aber — häufiger — wenn durch Alter oder sonstige Veränderung der Blutprobe der Antikörper inaktiviert bzw. zerstört ist; nur der eindeutig positive Versuchsausfall ist daher zu verwerten.

2. Durch den Nachweis der vorliegenden isoagglutinablen Substanz im Agglutininbindungsversuch.

Da die agglutinablen Substanz gegenüber Altern und Umweltseinflüssen weit widerstandsfähiger (als die entsprechenden Antikörper) ist, hat das Verfahren eine größere Anwendungsbreite, dagegen den Nachteil, daß Trockenblut, im Vergleich zu Frischblut, ein verminderter Agglutininbindungsvermögen zeigt, so daß relativ große Mengen Blut (vgl. unten) zu einem eindeutigen Versuchsausfall erforderlich sind. Es wurde daher wiederholt versucht, durch alkoholische (Alkohol absolut. oder 96%) (*Witebsky*¹, *Lattes*, *Schneider* und *v. Beöthy*² oder durch wässrige Extraktion (*Akune*³) von Trockenerythrocyten die gruppenspezifische Substanz in eine reaktionsfähigere Form zu bringen. Alle diese Verfahren vermochten sich jedoch nicht in die Praxis einzuführen, teils, weil sie in technischer Hinsicht zu umständlich (Komplementablenkung, Verwendung von Immunsera), teils, weil sie zu wenig empfindlich oder ausschließlich nur für die Blutgruppe A günstige Resultate ergaben.

Ich vermochte nun kürzlich⁴ nachzuweisen, daß sich aus Blutkörperchen in einfachster Weise wasserlösliche Gruppenstoffe von Haptencharakter gewinnen lassen. Im folgenden soll daher die Frage entschieden werden, ob sich mit Hilfe dieser Extraktionstechnik auch kleinste Mengen von Trockenblut gruppenspezifisch differenzieren lassen, und ob hierdurch die Agglutininbindungsprobe leistungsfähiger gestaltet werden kann.

1. Technik.

Die zur Extraktion wasserlöslicher Gruppenstoffe aus Erythrocyten befolgte Technik beruht auf dem einfachen Prinzip, daß die (agglutininbindenden) Gruppenstoffe A und B weder durch alkoholische, noch — in nennenswerter Menge — durch wässrige Extraktion, dagegen wohl in Gemisch von Alkohol und Wasser isoliert werden können, und besteht in folgenden Vorgängen:

1. Erschöpfende Extraktion mit Alkohol-Wasser-Gemischen.
2. Einengen der Extrakte unter gleichzeitiger Entfernung des Alkohols.
3. Prüfung des wässrigen Rückstandes im Agglutininbindungsversuch.

In zahlreichen Vorversuchen bemühte ich mich zunächst, das ursprüngliche Verfahren praktischen Zwecken anzupassen, d. h. nach Möglichkeit zu vereinfachen und abzukürzen; mit der nachfolgenden Methode wurden schließlich die besten Ergebnisse erzielt:

1. Eintragen der Blutprobe (bzw. des ausgeschnittenen Blutfleckes) in ein 5—10 ccm Aq. dest. enthaltendes Destillationskölbchen (50 ccm) bzw. in weite Reagensgläser. Mehrmaliges kräftiges Durchschütteln. Zugabe des gleichen Volums 96 proz. Alkohols. Nochmaliges Durchschütteln.
2. $\frac{1}{2}$ —1 stündiges Sieden der Probe (eventuell unter Zugabe von etwas Alkohol nach der ersten $\frac{1}{2}$ Stunde) oder 8stündige Extraktion der Proben (in Reagensgläser) bei 56° im Wasserbad.
3. Filtrieren (oder zentrifugieren) der Proben. Entfernung des Alkohols aus den Filtraten durch Destillation im Vakuum bei 45° (bzw. durch Destillation bei Siedetemperatur oder Verdampfen in der Abdampfschale). Gleichzeitiges Einengen des Filtrates auf etwa 2 ccm. Besalzen der wässrigen Rückstände (0,85%).
4. Prüfung der Extrakte auf gruppenspezifische Agglutininbindung: in kleinen Agglutinationsröhren werden je 0,1 ccm einer eben noch deutlich agglutinierenden Serumverdünnung β bzw. α mit je 0,5 ccm Extrakt vermischt, und zur Absättigung 4 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Hierauf werden je 0,2 ccm einer 3 proz. Aufschwemmung der entsprechenden Testblutkörperchen zugegeben, die Proben durchgeschüttelt und 2 Minuten lang auf der Wasserzentrifuge ausgeschleudert. Durch Aufschütteln wird makroskopisch auf eingetretene bzw. ausgebliebene Agglutination geprüft.

2. Leistungsfähigkeit der Methode.

Die Frage, ob im Bindungsvermögen zwischen nichtextrahiertem und (nach obiger Technik) extrahiertem Trockenblut quantitative Unterschiede bestehen, sollte dadurch entschieden werden, daß in beiden Fällen die *kleinste* Menge an Trockenblut, die im Agglutininbindungsversuch noch einwandfrei nachzuweisen war, ermittelt wurde. Zu diesem Zweck standen fein pulverisierte, 4—6 Monate alte Proben von Trockenblut — je 2 Proben der Gruppe A β (A1 und A2), ebenso viele der Gruppe B α (B1 und B2), und 1 Probe der Gruppe ABo — zur Verfügung. Abgewogene Mengen von je 100 mg, 10 mg, 1 mg und $\frac{1}{10}$ mg dieser Proben wurden in je 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, bzw. in je 5 ccm Aq. dest. + 5 ccm Alkohol extrahiert und im Absättigungsversuch gegenüber einer durch Titration bestimmten Agglutininverdünnung von β bzw. α geprüft:

Isosera	Suspension		Extrakt		Isosera	Suspension		Extrakt			
	$\beta 1:5$		$\beta 1:5$			$\beta 1:5$		$\beta 1:5$			
	$\alpha 1:5$	$\beta 1:5$	$\alpha 1:5$	$\beta 1:5$		$\beta 1:5$	$\alpha 1:5$	$\beta 1:5$	$\alpha 1:5$		
A 1	100 mg	++	—	++	—	A 2	100 mg	++	—	++	—
	10 "	.	(+)	.	—		10 "	.	(+)	.	—
	1 "	.	+	.	—		1 "	.	++	.	(+)
	$\frac{1}{10}$ "	.	++	.	+		$\frac{1}{10}$ "	.	++	.	++
B 1	100 mg	—	++	—	++	B 2	100 mg	—	++	—	++
	10 "	+	.	—	.		10 "	(+)	.	—	.
	1 "	++	.	(+)	.		1 "	+	.	—	.
	$\frac{1}{10}$ "	++	.	+	.		$\frac{1}{10}$ "	++	.	+	.
AB	100 mg	—	—	—	—	Kontrollen: Isosera + NaCl-Lösung:					
	10 "	(+)	+	—	(+)	$\beta 1:5$					
	1 "	(+)	++	(+)	(+)	$\alpha 1:5$					
	$\frac{1}{10}$ "	+	++	(+)	+	++					

Der Versuchsausfall zeigt: 1. daß es gelingt aus relativ kleinen Blutmengen (10—1 mg) gruppenspezifisch wirksame Extrakte zu gewinnen.

2. Daß den Extrakten eine größere Bindungsfähigkeit zukommt als den entsprechenden Blutsuspensionen, so daß mittels der Extraktionsmethode kleinere Blutmengen noch eindeutig gruppenspezifisch differenziert werden können.

Die Extraktionsmethode erweist sich dagegen für den Nachweis von M- und N-Faktor als ungeeignet; in Extrakten, die von M + N — bzw. M — N + (der Gruppe O $\alpha\beta$ zugehörigen*) Trockenerythrocyten her-

* Mit den anfänglich zum Nachweis von M und N aus Erythrocyten der Gruppe A β bzw. B α gewonnenen Extrakten wurde der M- und N-Test gelegentlich derart abgeschwächt, daß spezifische M- bzw. N-Reaktionen vorgetäuscht wurden.

gestellt wurden, waren keine M- bzw. N-Eigenschaften nachzuweisen. Es ist daher fraglich, ob das stoffliche Substrat der Rezeptoren M und N wasserlöslich ist, ein Zweifel, der noch dadurch verstärkt wird, daß die Faktoren M und N weder im Serum, noch in Sekreten (Speichel, Sperma), Exkreten (Harn) und Gewebeflüssigkeiten vorkommen bzw. nachzuweisen sind (Clausen⁵).

3. Praktische Anwendung der Extraktionsmethode.

Leider hatte ich bisher nur in 2 Fällen Gelegenheit, die praktische Brauchbarkeit des Extraktionsverfahrens zu erproben.

In einem forensischen Fall (Raubmord an einem Taxichauffeur) wurden uns die folgenden Corpora delicti zur Blutgruppenbestimmung eingesandt: eine Probe von einem Wagenfenster abgekratzten Blutes (etwa 50 mg) und mehrere kleinere Blutspuren an der Wagenpolsterung. Da sämtliche Proben stark mit Staub und Schmutz verunreinigt waren, wurden sie zunächst mit absolutem Alkohol „vorgereinigt“ und erst dann in der beschriebenen Weise extrahiert. Mit den Extrakten aller Blutproben wurde einwandfrei die Gruppe B α (Blutgruppe des Chauffeurs) bestimmt.

Der 2. Fall betraf ein mit Blutflecken versehenes Stück Leinen, das während 11 Jahren in einer zugekorkten Glasflasche verwahrt worden war. Der aus drei kleineren Blutflecken (Durchmesser der Flecke etwa 1 cm) hergestellte Extrakt neutralisierte in spezifischer Weise Isoserum β , folglich lag die Blutgruppe B α vor. Die Richtigkeit der Bestimmung konnte in diesem Fall nachträglich noch festgestellt werden.

Ohne daß sich auf Grund dieser wenigen Fälle auf eine unbedingte Überlegenheit der Extraktionsmethode gegenüber den bereits bei der Blutfleckdiagnose bewährten Untersuchungsverfahren schließen möchte, glaube ich doch, daß das Verfahren verdient, an einem größeren Material nachgeprüft zu werden; als besonders hierzu geeignet, erachte ich jene Fälle, bei denen auf Grund des vorliegenden Untersuchungsmaterials eine Extraktion angezeigt erscheint, oder aber, wenn die zu untersuchende Blutprobe so spärlich ist, daß — erfahrungsgemäß — keine Aussicht besteht, mit den üblichen Verfahren eindeutig die Blutgruppe zu bestimmen.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein einfaches Verfahren beschrieben, wodurch die Extraktion von Gruppenstoffen A und B aus kleinen Mengen menschlichen Trockenblutes ermöglicht wird.

2. Mit den Extrakten lassen sich gewöhnlich kleinere Blutmengen im Agglutininbindungsversuch gruppenspezifisch differenzieren als mit den üblichen Absorptionsverfahren.

3. Die Anwendung des Extraktionsverfahrens bei der Blutfleckdiagnose ist deshalb wünschenswert.

Literaturverzeichnis.

- ¹ Witebsky, Münch. med. Wschr. **1927**, 1581. — ² Lattes, Schneider u. v. Beöthy, Wien. klin. Wschr. **1928**, 1038. — ³ Akune, Z. Immun.forsch. **73**, 75 1931/32. — ⁴ Hallauer, Z. Immun.forsch. **1934** (im Druck). — ⁵ Clausen, Z. Rassenphysiol. **6**, 49 (1933). — ⁶ Lattes, L'Individualité du sang. Paris 1929. — ⁷ Schiff, Die Technik der Blutgruppenuntersuchung. Berlin 1932.
-