

(Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Innsbruck.
Vorstand: Professor Dr. Karl Meixner.)

Zur Technik der Untersuchung auf die Bluteigenschaften M und N.

Von
Dr. Herbert Elbel.

In allen Mitteilungen, die sich mit Untersuchungen über die Bluteigenschaften M und N beschäftigen, wird übereinstimmend angegeben, daß die Herstellung der spezifischen Antisera (Abgüsse) aus den Seren der immunisierten Kaninchen gewisse Schwierigkeiten, vor allem für den Ungeübten, bietet. Das Bestreben, ein jederzeit wiederholbares, günstigstes Verfahren zur Entfernung der unspezifischen Agglutinine aus den „Rohseren“ auszuarbeiten, hat zu einer Reihe von Veröffentlichungen geführt. Die empfohlenen Verfahren sind voneinander recht verschieden.

In unserem Institut führen wir Untersuchungen über die Bluteigenschaften M und N schon seit einiger Zeit durch; wir haben uns auch planmäßig mit der Frage der Absättigung befaßt. Dabei haben wir vor allem eine Erfahrung gemacht: so wenig es uns am Anfang gelungen ist, mit irgendeinem Verfahren zu einem stets gleichwertigen und sicheren Ergebnis zu gelangen, ebenso leicht sind wir jetzt nach Sammlung der notwendigen Erfahrung imstande, uns Abgüsse auf jedem beliebigen Wege herzustellen, ob das Serum nun in der Verdünnung 1:10 oder 1:100 verwendet, ob es mit $\frac{1}{5}$ oder $\frac{1}{1}$ Volumen Blutkörperchen, ob es einmal oder mehrmals, ob es kürzer oder länger abgesättigt wird. Serologische Untersuchungen, wie die auf M und N, überschreiten eben schon die Grenze derjenigen Aufgaben, die für den gänzlich Ungeübten durchführbar sind (ganz abgesehen von der Verantwortung, die sich für den Untersucher aus den allfälligen rechtlichen Folgen ergibt), eine Meinung, welche ja schon auf der 21. Tagung der Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin deutlichen Ausdruck gefunden hat¹.

Die Herstellung von sterilen Abgüsse ist, wie auch Landsteiner mitteilt, mit größten Schwierigkeiten verbunden. Wir verzichten bei Abgüsse, die wir zur Vornahme von Reihenuntersuchungen herstellen, überhaupt auf Keimfreiheit. Handelt es sich um Untersuchungen besonderer Art, so ist man leicht imstande, aus den jederzeit vorrätigen, keimfrei eingeschmolzenen Kaninchenserien Abgüsse unter den üblichen Regeln der Asepsis herzustellen, die im übrigen durchaus nicht länger haltbar bleiben, als unsterile Abgüsse, nämlich auch nur rund 1 Monat.

¹ Dtsch. Z. gerichtl. Med. 20, 323 (1933).

Bei den meisten bisher mitgeteilten Absättigungsverfahren wird der angegebene Zweck durch höchstens zweimaligen Zusatz von Blutkörperchen zu erreichen gesucht, jedenfalls nicht nur aus Gründen des sparsamen Verbrauches und der Zeitersparnis, sowie um stärkere unspezifische Bindung zu verhindern, sondern auch deshalb, weil die Sera sonst unvermeidlich hämolytisch werden. Die Schwierigkeit, diejenige Menge von Blutkörperchen zu finden, die bei gegebener Verdünnung des Rohserums gerade genügt, um das ganze unspezifische Agglutinin zu entfernen, erklärt sich daraus, daß sowohl der Gehalt des Rohserums an artspezifischen Agglutininen, als auch die Bindungskraft der verwendeten Blutkörperchen von Fall zu Fall in weitestem Ausmaß schwankt. Es ist daher nach unserer Erfahrung nicht möglich, für ein Rohserum die notwendige Menge der Blutkörperchen, die Zahl und die Dauer der Absättigungen ein für allemal zu bestimmen, wenn man nicht immer denselben Blutspender zur Verfügung hat¹. Die Beschaffung der notwendigen Blutkörperchen macht besonders dann Schwierigkeiten, wenn man zur Behandlung von theoretischen Fragen dauernd eine große Anzahl von Abgüssen vorrätig haben muß. Wir haben daher schon seit längerer Zeit — wie auch andere Autoren — mit Wassermannbluten gearbeitet. Hierbei werden die Abgüsse aber immer mehr oder minder stark hämolytisch und sehr oft allzuschnell bewachsen.

Nun hat *Lattes*² mitgeteilt, daß er mit Erfolg Absättigungen mit gekochten Blutkörperchen durchgeführt hat. Herr Professor *Lattes* war auch so liebenswürdig, Herrn Professor *Meixner* nähere persönliche Mitteilungen über seine Untersuchungen zu machen. Danach geht man bei der Herstellung der gekochten Blutkörperchenaufschwemmungen folgendermaßen vor: das kräftig ausgeschleuderte Blutkörperchensediment wird dreimal gewaschen, dann eine 2—3 proz. Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und diese tropfenweise in ein Gefäß überführt, in welchem ein wenig Kochsalzlösung siedet. Eine solche gekochte Blutkörperchenaufschwemmung hat, wie *Lattes* mitteilt und wie auch wir feststellen konnten, ein geringeres Bindungsvermögen als frische Blutkörperchen. *Lattes* führt dies auf die Tatsache zurück, daß die gekochten Blutkörperchen, wie sich unter dem Mikroskop zeigt, zu großen Flocken vereinigt sind, die Oberfläche also vermindert ist. Verreibt man (nach *Lattes*) die gekochten Blutkörperchen solange, bis die Haufen aufgelöst sind und die Blutkörperchen fast überall vereinzelt erscheinen, so kann man diesem Übelstand weitgehend abhelfen. In unseren Versuchen blieb das Bindungsvermögen auch so zubereiteter Blutkörperchen noch merklich hinter dem frischer zurück:

¹ Vgl. dazu *Schiff*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **21**, 430 (1933).

² Boll. della Sezione Italiana della Soc. internaz. di Microbiologia **1932**, H. 12.

Aus der rechten und aus der linken Armvene werden je 7 ccm Blut entnommen (Elbel, B + —) und sofort in Citratlösung aufgefangen. Die beiden Aufschwemmungen werden 3 mal gewaschen und dann die eine in der beschriebenen Weise gekocht. Im ganzen Versuch wurde darauf geachtet, daß keine Blutkörperchen verlorengingen. Schließlich wurden beide Blutkörperchensedimente in kalibrierten Röhrchen auf 5 ccm aufgefüllt (die 7 ccm gaben 2,8 frisches und ebensoviel gekochtes Sediment). Diese Aufschwemmungen wurden zur Absättigung verwendet. Das 1:15 verdünnte Rohserum (N_{15}) hatte gegen + — den Titer 128, gegen — + den Titer 256. Nach 1 stündiger Absättigung mit dem halben Volumen frischer Blutkörperchen betrug der Titer gegen + — 0, gegen — + 8. Verwendeten wir aber zur Absättigung die gekochten Blutkörperchen, so war der Titer nach 1 Stunde 8 bzw. 64, nach Zugabe eines weiteren halben Volumens Blutkörperchen und nach einer weiteren Stunde 2 bzw. 8, erst nach einer dritten in gleicher Weise durchgeführten Absättigung betrug der Titer 0 und 8.

Es ist also die Bindungskraft der gekochten Blutkörperchen erheblich geringer als die der frischen. Auch längeres Einwirkenlassen der gekochten Blutkörperchen auf das Rohserum ändert daran nicht viel.

Dieser geringe Nachteil wird mehr als aufgehoben durch den Vorteil, auf diese Weise bestimmte Blutkörperchen beliebig lange Zeit in brauchbarem Zustande aufbewahren zu können. Ganz besonders erleichtert wird die Herstellung von Abgüssen dadurch, daß man auch aus Wassermannbluten gewonnene Blutkörperchen kochen und keimfrei aufbewahren kann. Man hat dann — die gekochten Blutkörperchen kann man sich in solchen Mengen einschmelzen, wie man sie dann für die einzelnen Absättigungen braucht — für eine große Anzahl von Abgüssen dieselben Blutkörperchen zur Verfügung und erspart viel Arbeit und Material. Die Bindungskraft solcher Aufschwemmungen nach Lattes ist stets die gleiche.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich daraus, daß die mit gekochten Blutkörperchen hergestellten Abgüsse praktisch farblos sind, auch dann, wenn man zur Herstellung Wassermannblute verwendet. Auch mehrmaliger Blutkörperchenzusatz ändert nichts daran, sie sind immer heller, als Sera, die man auch nur einmal mit frischen Blutkörperchen absättigt hat.

Durch das Kochen der Wassermannblute wird man noch unabhängiger von Blutspendern. Wassermannblute stehen wohl fast überall in solcher Menge zur Verfügung, daß es gleichgültig ist, ob man zu einer Absättigung mehr oder weniger Blutkörperchen braucht, die geringere Bindungskraft der gekochten Blutkörperchen also nicht mehr ins Gewicht fällt. Auch die Notwendigkeit der zweimaligen Zerkleinerung der Blutkörperchen wird durch die leichte Beschaffungsmöglichkeit voll aufgewogen.

Die passenden (M oder N) Blute werden nach Entfernung des Serums mit einem Porzellanstössel durch ein gewöhnliches feines Drahtsieb durchgetrieben und in einer Schale in ein wenig Kochsalzlösung auf-

gefangen. Nach dreimaligem Waschen stellt man sich eine nicht zu dichte Aufschwemmung her, die dann tropfenweise in ein Becherglas gegossen wird, welches leicht siedende Kochsalzlösung enthält. Nach dem Abkühlen kann man die Aufschwemmung beliebig versorgen, sie ist, wie schon *Lattes* angibt, lange Zeit haltbar, auch dann, wenn man auf Art und Ort der Aufbewahrung nicht besonders Bedacht nimmt. Die gekochten Blutkörperchen sinken in der Aufschwemmung (die wir uns etwa 20 prozentig herstellen) rasch zu Boden. Die überstehende Kochsalzlösung ist etwas gelblich gefärbt und wird entfernt. Sie enthält, wie wir uns durch einen Versuch überzeugt haben, keine in Betracht kommende Menge Agglutinogen. Vor der Verwendung werden die Blutkörperchen noch einmal im Mörser verrieben, noch einmal gewaschen und die Konzentration der Blutkörperchen wird auf etwa 50% gebracht, da sich eine dichtere Aufschwemmung von gekochten Blutkörperchen mit einer feineren Pipette nicht aufsaugen läßt.

Bisweilen erreicht man auch nach mehrmaliger Absättigung mit gekochten Blutkörperchen keine volle Spezifität. Dann genügt eine ganz kurze Absättigung mit wenigen Tropfen frischer Blutkörperchen, die man leicht aus dem Ohrläppchen gewinnen kann. Trotz der geringen Menge der zu einer solchen Nachabsorption verwendeten frischen Blutkörperchen kann es vorkommen, daß sich der Abguß nunmehr rötlich färbt. Auch wenn von vornherein mit nicht gekochten Blutkörperchen abgesättigt wird, geht meist erst bei wiederholtem Zusetzen Blutfarbstoff in Lösung und zwar in steigendem Maße, je öfter man Blutkörperchen hinzufügt. Zumeist aber ist mit einer entsprechenden Menge gekochter Blutkörperchen durch einmaliges Zusetzen vollkommene Spezifität zu erzielen. Bei einem orientierenden Versuch empfiehlt es sich, der Verdünnung des Rohserums (1:15 oder 1:20) etwa die eineinhalb-fache Menge gekochter 50 proz. Blutkörperchenaufschwemmung zuzusetzen.

Zusammenfassung: Das von *Lattes* empfohlene Verfahren der Herstellung von Anti-M und Anti-N-Abgüsse durch Bindung der unspezifischen Agglutinine aus den Rohseren mit gekochten Blutkörperchen bietet außer den von *Lattes* selbst genannten noch verschiedene andere Vorteile:

1. Die mit gekochten Blutkörperchen hergestellten Abgüsse sind beinahe farblos.
2. Sie werden nicht so schnell bewachsen, wie z. B. mit frischen Wassermannbluten hergestellte (ein Verfahren, das bei größerem Bedarf an Abgüsse bisher angewendet werden mußte).
3. Aus diesen beiden Gründen kann man zur Absättigung ohne Nachteil auch gekochte Wassermannblute verwenden, so daß man von den Blutspendern unabhängig wird.