

(Aus dem Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin der Universität Halle a. d. S.
Direktor: Prof. Dr. Schrader.)

Das Absorptionsverfahren an frischen Gerinnselein kleinsten Ausmaßes.

Von
Dr. med. habil. **Albert Ponsold**,
Dozent.

Einleitung.

Zu Blutgruppenzugehörigkeitsbestimmungen von Kindern (Säuglingen) lassen sich in der Regel nur geringe Blutmengen beschaffen. Diese reichen allenfalls zur Herstellung einer Blutkörperchenaufschwemmung zwecks Vornahme der Agglutinationsproben aus. Auch das bei der Gerinnung abgeschiedene Serum ist unter Umständen der Menge nach ausreichend zur Feststellung der Serumeigenschaften. Aber eine Absorption nach dem üblichen Verfahren läßt sich beim Vorliegen derart geringer Blutmengen nicht durchführen, denn aus dem Gerinnsel müßte zunächst eine Blutkörperchenaufschwemmung und alsdann aus dieser Aufschwemmung ein Sediment (Zentrifugat) hergestellt werden, um den Zusatz von Absorptionsblutkörperchen zum Absorptionsserum möglich zu machen. Und selbst wenn es gelingen sollte, aus der Gerinnselaufschwemmung ein Sediment von Blutkörperchen zu gewinnen, so würde dieses Sediment dann von so kleinem Ausmaße sein (da eben ein großer Teil von Blutkörperchen im Gerinnsel zurückbleibt), daß das in einem entsprechenden Verhältnis zuzusetzende Serum in einer für die quantitative Auswertung zu geringen Menge vorliegen würde.

Wir haben uns daher zur Aufgabe gestellt, ein Verfahren auszuarbeiten, mit Hilfe dessen auch unter solchen Umständen die Absorption vorgenommen werden kann. Das Prinzip unserer Methode besteht darin, daß wir das Anlegen einer Aufschwemmung und die Herstellung eines Sedimentes aus der Aufschwemmung umgeben, und zwar dadurch, daß wir die Blutkörperchen des Gerinnsels direkt im Absorptionsserum aufschwemmen.

I. Unsere Methode.

A. Das Absorbieren.

1. Die Abtrennung des Gerinnsels vom Serum. Das zu entnehmende Blut wird in U-Capillarröhrchen, und zwar in dünnwandige, 10 cm lange, $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ mm weite Capillarröhrchen aufgefangen. Diese Röhrchen laufen an beiden Enden zugespitzt aus, so daß nach der Blutentnahme ein Zuschmelzen bzw. ein Verschließen der

Röhrchen (Siegelack, Plastelin) nicht erforderlich ist. Die Capillarattraktion innerhalb des zugespitzten Endes verhindert ein Ausfließen von Blut.

Die Trennung von Serum und Gerinnsel wird durch Zentrifugieren vorgenommen. Hierbei kann es unter Umständen vorkommen, daß das Gerinnsel mit einem schmalen Streifen am zugespitzten Ende durch Antrocknen an der Öffnung des U-Röhrchens haften bleibt, so daß (nach dem Zentrifugieren) die Serumschicht von einem schmalen Gerinnselstreifen durchzogen wird. Ist das der Fall, so ist das zugespitzte Ende mit dem Gerinnselstück abzufeilen und der haftende Gerinnselstreifen von der U-Röhrchenöffnung abzutrennen. Hierauf ist das Zentrifugieren erneut vorzunehmen, wobei sich dann der Gerinnselstreifen zur Hauptmasse des Gerinnsels zurückzieht und die Scheidung von Blutkörperchen und Serum eine ausreichende ist. Das Serum wird nun von den Blutkörperchen abgetrennt. Hierzu wird mit einer gewöhnlichen Ampullenfeile das U-Röhrchen an seinen beiden Schenkeln angefeilt (nicht durchgefeilt!), und zwar an der Grenze zwischen Blutkörperchen und Serum, d. h. noch im Bereiche des Serums. Nach dem Anfeilen (Anritzen) werden die U-Röhrchenschenkel an diesen Stellen durchgebrochen. Die beiden serumenthaltenden Teile des U-Röhrchens werden zur späteren Bestimmung der Agglutinine vorläufig beiseitegelegt.

Das im übrigen Teil des U-Röhrchens, also im gekrümmten Teil, enthaltene Blutgerinnsel (mit geringen Beimengungen von Serum) wird nun, wiederum durch Anfeilen, zerlegt, und zwar je nach Bedarf, in 2 oder 3 Teile, z. B. zur Faktorenbestimmung in 2 Teile und, wenn auch die Untergruppen bestimmt werden sollen, in 3 Teile. Zur Durchtrennung des Gerinnsels beim Durchbrechen des U-Röhrchens im Anschluß an das Anfeilen ist eine *scherende* (!) Bewegung mit den Bruchflächen des Capillarröhrchens durchzuführen, wobei das Gerinnel zwischen den Bruchflächen zerquetscht wird. Unterläßt man eine Durchtrennung des Gerinnsels, so wird dieses aus dem einen Teil des Röhrchens (durch das Zusammenhängen mit dem Gerinnel im andern Teil des Röhrchens) herausgerissen. Das nun gewissermaßen in der Luft hängende Gerinnel bleibt irgendwo an der Außenwandung des Glasröhrchens haften, so daß jetzt ein Aufteilen des Gerinnsels erschwert ist.

2. Das Vorlegen der Blutkörperchen. a) Das Herausblasen des Gerinnsels. Das im U-Röhrchenteilstück befindliche Gerinnel wird herausgeblasen, und zwar auf einen Objektträger, z. B. Porzellanplatte mit Aushöhlungen in Näpfchenform. Zum Ausblasen wird das U-Röhrchenteilstück zwischen Daumen und Zeigefinger der rechten Hand genommen, und zwar derart, daß ein Ende des Stücks, und zwar das dem Untersuchenden zugekehrte, gerade um etwa 1 mm hervorragt. Nun werden Zeigefinger und Daumen zwischen die Lippen genommen, ohne daß dabei das Capillarröhrchen mit dem Munde berührt wird, denn die das Capillarröhrchen umschließenden Finger dienen gewissermaßen als Trichter zum Einblasen von Luft in das U-Röhrchenteilstück.

Es kann aber zum Ausblasen bzw. Ausstoßen des Gerinnsels auch ein anderes, ein gerades Capillarröhrchen gewissermaßen als Zwischenstück eingelegt und direkt in den Mund genommen werden. Mit dem Gerinnel wird zugleich auch das an der Oberfläche des Gerinnsels abgeschiedene Serum ausgeblasen. Bereits hierdurch wird ein Teil von den Blutkörperchen des Gerinnsels in dieses umgebende Serum aufgeschwemmt. Eine Beeinträchtigung des Absorptionsvorganges durch diese Serumbeimengung ist nicht zu befürchten. Eine Aufschwemmung der Blutkörperchen aus dem Gerinnel in physiologischer Kochsalzlösung, wie das sonst zur Vorbereitung der Blutkörperchen für das Absorptionsverfahren erforderlich ist, wird also absichtlich nicht vorgenommen.

Das Zusetzen des zu absorbierenden Testserums zu dem herausgeblasenen Gerinnel. Zu dem nun vorliegenden Gerinnel wird das (als Testserum) zu ab-

sorbierende Antiserum, also beispielsweise Anti-A- oder Anti-B-, Anti-M- oder Anti-N-Serum zugesetzt, und zwar in der gleichen Menge des vorliegenden Gerinnsels. Das Abmessen der gleichen Menge für das hinzuzusetzende Serum geschieht dadurch, daß das U-Röhrchenteilstück, aus dem das Gerinnsel herausgeblasen worden war, oder besser ein anderes Capillarröhrchen gleichen Ausmaßes mit dem Antiserum angefüllt und aus diesem das Serum zu dem Gerinnsel hinzugefügt wird.

Zur Vermeidung des Eintrocknens wird unmittelbar nach dem Zusetzen des Serums das Gerinnsel in dem Serum verrieben, und zwar nach Art des Zerreibens (Zerstoßens) eines Materials durch einen Stößel in einem Mörser. Als Stößel dient uns der Boden eines Reagensgläschens, beispielsweise eines *Schiffschen* Röhrchens (Mikroreagensgläschens) oder ein Glasstab. Durch dieses Verreiben werden zwar nicht alle Blutkörperchen aus dem Gerinnsel herausgelöst, wohl aber eine ausreichend große Anzahl, so daß kein Mißverhältnis zwischen der Menge des zu absorbierenden Serums und der Absorptionsblutkörperchenmenge zu befürchten ist, d. h. daß also nicht Blutkörperchen in zu geringer Menge bzw. Serum im Überschuß zugesetzt sein könnte.

b) *Das Herausschleudern des Gerinnsels.* Wenn das U-Röhrchenstück zu kurz ist, so daß das Herausblasen des Gerinnsels nicht gelingt, dann wird das U-Röhrchenstück mit dem in ihm enthaltenen Gerinnsel in ein schmales Mikroreagensgläschchen vom Typus der *Schiffschen* Röhrchen gebracht. Nun wird mit Hilfe eines anderen Capillarröhrchens, annähernd gleichen Ausmaßes wie das U-Röhrchen, das zu absorbierende Antiserum hinzugesetzt, und zwar annähernd in der Menge, in welcher Gerinnsel im U-Röhrchenstück enthalten ist. Das annähernde Abmessen dieser Serummenge geschieht dadurch, daß ein Capillarröhrchen (10 cm lang, $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ mm lichte Weite) entsprechend der Länge des U-Röhrchenstückes mit Antiserum angefüllt wird, also bis zu $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{3}$ seiner Länge (bei Verwendung von U-Röhrchen gleichen Kalibers). Das mit dem Antiserum angefüllte Capillarröhrchen wird nun ins Mikroreagensgläschchen eingeführt, und zwar derart, daß sein Ende auf dem Grund des Gläschens aufstößt, so daß das hinauszublasende Serum gleich an den Boden des Mikroreagensgläschens gelangt. Wird das Antiserum nicht auf den Grund, sondern oberhalb desselben ausgeblasen, so kann ein großer Teil des Antiserums an der Innenwandung des Gläschens haften bleiben, ohne dahin zu gelangen, wo sich das U-Röhrchenstück mit dem Gerinnsel befindet.

Das Zusetzen des zu absorbierenden Testserums zu dem herausgeschleuderten Gerinnsel. Wird das hinzuzusetzende Antiserum auf dem Boden (Grund) des Reagensgläschens ausgeblasen, so taucht das U-Röhrchenstück mit dem Gerinnsel in das vorgelegte Testserum ein. Nun wird durch Schnellenlassen eines Fingers gegen das festgehaltene Reagensröhrchen das Gerinnsel aus dem U-Röhrchenstück herausgeschleudert (herausgeschnellt), so daß es in das vorgelegte Antiserum zu liegen kommt. Durch weitere Vornahme schnellender Fingerbewegungen werden nun Blutkörperchen aus dem Gerinnsel in das umgebende Antiserum hineingeschleudert und damit in dem zu adsorbierenden Testserum aufgeschwemmt.

Beim Herausschleudern des Gerinnsels aus dem U-Röhrchenstück in das vorgelegte Serum ist nicht zu vermeiden, daß auch das U-Röhrchenstück heftig hin- und hergeschnellt wird. Hierdurch können Blutkörperchen zerstört werden, was eine, wenn auch geringgradige, hämolytische Verfärbung des Testserums zur Folge hat. Selbst wenn diese Verfärbung ein größeres Ausmaß annimmt, kann sie sich bei der nachfolgenden Auswertung des Serums in der Erkennbarkeit der dabei hinzuzusetzenden Testblutkörperchen bzw. ihrer Agglutinate kaum störend bemerkbar machen. Die Heftigkeit der schnellenden Fingerbewegungen ist aber nicht zu

umgehen, weil sonst das Gerinnsel nicht aus dem U-Röhrchenstück herausgeschleudert wird. Im täglichen Gebrauch bevorzugen wir das Herausschleudern (b) vor dem Herausblasen (a).

B. Das Auswerten.

1. Das Auffangen des Anti-Serum-Blutkörperchen-Gemisches nach vollzogener Absorption. Hat das das Gerinnsel umgebende Antiserum eine Rosafärbung angenommen, und ist ein weiterer Austritt von Blutkörperchen aus dem Gerinnsel nicht anzunehmen, so wird nun, d. h. nach etwa 3—5 Minuten, das Antiserum mit den Absorptionsblutkörperchen in ein Capillarröhrchen (10 cm lang, $1/2$ cm lichte Weite) aufgesaugt. Das Aufsaugen erfolgt mittels Capillarattraktion. Hierbei kann dasselbe Capillarröhrchen benutzt werden, das vorher zum Zusatz des Antiseraums verwandt worden war. Für gewöhnlich gelingt es, fast die ganze Menge des zugesetzten Antiseraums wieder aufzufangen, so daß nur das Gerinnsel auf dem Objekträger bzw. im Mikroreagensgläschen zurückbleibt. Das Capillarröhrchen wird hierbei etwa bis zu einem Drittel seiner Länge mit dem Absorptionsblutkörperchen-Serum-Gemisch angefüllt.

2. Das Abtrennen der Absorptionsblutkörperchen vom Absorptionsserum. Das Capillarröhrchen, in welchem das hinzugesetzte Antiserum nach vollzogener Absorption aufgefangen wurde, wird nun an einem seiner Enden, d. h. an dem, welches nicht benetzt worden ist, über der Gasflamme (Sparflamme!) zugeschmolzen. Das geschieht, um den Inhalt in diesem Capillarröhrchen zentrifugieren zu können. Hierdurch erfolgt eine Abtrennung des Antiseraums von den Absorptionsblutkörperchen. Es braucht nicht länger als 1 Minute lang bei 2500 bis 3000 Touren zentrifugiert zu werden. Hierbei ist darauf zu achten, daß das Capillarröhrchen möglichst in der Achse der Zentrifugenhülsen zu liegen kommt, da es bei Schräglage zerbrechen kann. Es sind daher schmale, konisch zulaufende Zentrifugenhülsen den breiten zylindrischen vorzuziehen.

Nach dem Zentrifugieren wird das Sediment der Absorptionskörperchen von dem nun auszuwertenden Antiserum abgetrennt. Das erfolgt, wie immer bei Capillarröhrchen, durch vorsichtiges Anfeilen (Anritzen) mittels einer sog. Ampullenfeile und nachfolgendem Durchbrechen des Capillarröhrchens an der angeritzten Stelle. Bei dem Versuch, das Röhrchen durchzufeilen, kann es zerbrechen.

3. Das Auswerten des Antiseraums. Zu dem auszuwertenden Testserum (Antiserum) werden nun entsprechende Testblutkörperchen hinzugesetzt. Das Zusetzen kann in demselben Capillarröhrchen erfolgen, in dem absorbiert und zentrifugiert worden ist, da es ja nur um den geringen Sedimentanteil, nämlich den abgefeilten, kürzer geworden ist; oder aber es kann das Testserum vor der Auswertung in ein

anderes (neues) Capillarröhrchen übertragen werden. Ersteres hat zwar den Vorteil der Sparsamkeit (1 Capillarröhrchen kostet $\frac{1}{2}$ Pfg.), aber den Nachteil, daß an der Innenwandung des gebrauchten Capillarröhrchens Reste von agglutinierten Blutkörperchen (vom Absorptionsvorgang her) haften, die ein Hin- und Herfließenlassen des Testserums mit den nunmehr zuzusetzenden Testblutkörperchen behindern. Das Hin- und Herfließenlassen ist aber erforderlich (und in einem neuen Capillarröhrchen leicht durchführbar), weil eine ausgiebige Durchmischung des auszuwertenden Antiserums mit den Testblutkörperchen zu erfolgen hat. Diese werden in einer 1—3—5 proz. Aufschwemmung, und zwar in der gleichen bis doppelten Menge des vorliegenden, auszuwertenden Antiserums zugesetzt.

Die Auswertung wird als eine qualitative vorgenommen. Ist eine Absorption nicht (oder nur in ganz geringem Maße bzw. in unspezifischer Art) erfolgt, so tritt beim Auswerten eine Agglutination ein. Unter dem ganz geringen Maße wird ein Absorptionsvorgang verstanden, der bei einer quantitativen Auswertung einen Abfall bis zu 2 Stufen haben würde. Bleibt eine Agglutination aus, so ist das ein Zeichen dafür, daß eine Absorption erfolgt ist, und zwar eine vollständige, die eine Titerreduktion bis zur Titerlosigkeit (Nullpunkt) bewirkt hat.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der qualitativen Auswertung ist aber das Einhalten des entsprechenden Mengenverhältnisses von zu absorbierendem Serum zu den vorliegenden Absorptionsblutkörperchen (Gerinnsel). Um eine Vollständigkeit der Absorption zu erreichen, darf die Antiserummenge bei der Bestimmung der klassischen Blutgruppen und bei der Bestimmung der Faktoren höchstens die doppelte Menge — gemessen an der Gerinnselmenge — betragen. Reihenuntersuchungen haben nämlich gezeigt, daß zur Absorption eines Serums der klassischen Blutgruppen im Durchschnitt von einem Blutkörperchensediment, bezogen auf das Volumen des Serums, ein Fünftel erforderlich ist, daß aber eine Schwankungsbreite von einem Zehntel bis fast zu einem Drittel vorliegen kann. Deswegen muß in jedem Falle ein Blutkörperchensediment dem Serum zugesetzt werden, das mindestens dem Volumen nach ein Drittel desselben ausmacht bzw. es darf Serum (bezogen auf die vorliegende Blutkörperchensedimentmenge) höchstens in der doppelten Menge zugesetzt werden. Da jedoch das Abmessen dieser Höchstmengen bei routinemäßiger Anwendung des Verfahrens kein genaues sein kann, wird zur Sicherung eine geringere als doppelte Menge von Serum zugesetzt, und zwar in der Regel die gleiche Menge, deren Abmessen sich am einfachsten gestaltet.

Sind die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der qualitativen Auswertung also gegeben, so steht diese Art von Auswertung im Vergleich mit der quantitativen Auswertung in der Exaktheit keineswegs

zurück. Die bietet vielmehr den Vorteil, daß ganz besonders kleine Serummengen ausgewertet werden können, also das Absorptionsverfahren auch beim Vorliegen ganz geringer Blutmengen, zu denen nur ganz geringe Antiserummengen hinzugesetzt werden dürfen, durchzuführen ist, und selbst dann, wenn die zur Verfügung stehende Blutkörperchenmenge dadurch, daß das Blut geronnen ist, eingeschränkt ist. Bei der quantitativen Auswertung hingegen kann unter ein gewisses Minimum des zuzusetzenden Testserums nicht herabgegangen werden, und dies ist der Grund, daß in der Praxis unter solchen Umständen auf die Durchführung des Absorptionsverfahrens überhaupt verzichtet wird. Solche Umstände aber, wo für die Anwendung der quantitativen Auswertung zu geringe Blutmengen vorliegen, sind in der gerichtsärztlichen Praxis keine seltenen.

II. Die praktische Anwendbarkeit dieses Absorptionsverfahrens mit qualitativer Auswertung.

Absorptionsverfahren mit quantitativer Auswertung werden bei Blutgruppenbestimmungen nicht häufig herangezogen, zumal das Absorptionsverfahren mit quantitativer Auswertung ein zeitraubendes Verfahren ist. Das Absorptionsverfahren an sich, ungeachtet dessen, ob qualitativ oder quantitativ ausgewertet wird, stellt jedoch eine Bestätigung bzw. Sicherung (der mittels der Agglutinationsprobe erzielten Resultate) dar, die wir nicht missen möchten und auf die wir auch nach den Richtlinien der R.J.M. für die Blutgruppenuntersuchungen in gerichtlichen Fällen nicht verzichten dürfen. Deswegen machen wir vom Absorptionsverfahren regelmäßig Gebrauch, und deswegen haben wir das Absorptionsverfahren mit der qualitativen Auswertung eingeführt, wenn das Absorptionsverfahren mit der quantitativen Auswertung aus bestimmten Gründen nicht durchführbar ist.

Im besonderen wenden wir dieses Absorptionsverfahren (an frischen Gerinnselein kleinsten Ausmaßes) als Ergänzung in der *Faktorenbestimmung* am Säuglingsblut an. Diese indirekte Faktorenbestimmung ist uns sowohl am Säuglingsblut als auch am Blut Erwachsener zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel in der Sicherung der Agglutinationsprobe bei der Faktorenbestimmung geworden. Außerdem wenden wir dieses Absorptionsverfahren an frischen Gerinnselein kleinsten Ausmaßes bei der Bestimmung der *Untergruppen* am Säuglingsblut an. Mittels dieser Methode sind bereits mehrere Hundert Bestimmungen (Inaugural-Dissertationen von *Kohmann, Hasemeyer, Bator, Baacke, Ulrich, Holz, Schmitz* u. a.) am hiesigen Institut durchgeführt worden.

Schließlich ist darauf hinzuweisen, daß das Absorptionsverfahren an frischen Gerinnselein kleinsten Ausmaßes auch zur Bestimmung der klassischen Blutgruppen am Säuglingsblut herangezogen werden kann,

wenn die Bestimmungen nicht auch am Serum durchführbar sind. Bei dieser Unvollständigkeit der Blutgruppenbestimmung ist vorgeschlagen worden (Püschel), eine Absorption mit den zu untersuchenden Blutkörperchen vorzunehmen, um dadurch eine Bestätigung für die durch die Agglutination gewonnenen Ergebnisse an den Blutkörperchen-eigenschaften zu erreichen, da ohne die Bestimmung der Serumeigen-schaften die Sicherheit der Blutgruppenzugehörigkeitsbestimmung nicht als hinreichend anzusehen ist.

Zusammenfassung.

1. Beim Vorliegen von Gerinnseln geringsten Ausmaßes ist das übliche Absorptionsverfahren (mit der quantitativen Auswertung) nicht durchführbar, weil nach Herstellung einer Aufschwemmung von Blutkörperchen aus einem kleinen Gerinnsel und nach Anlegung eines Sedimentes (Zentrifugates) aus dieser Aufschwemmung eine zu geringe Blutkörperchenmenge zur Absorption und dementsprechend eine zu geringe Serummenge zur Auswertung zur Verfügung steht.
2. Deswegen wird in dem von uns geübten Verfahren das Gerinnsel mit dem zu absorbierenden Serum *unmittelbar* zusammengebracht, so daß die Absorptionsblutkörperchen in dem Absorptionsserum selbst aufgeschwemmt werden.
3. Nach Abschluß der Absorption wird das Serum zur Auswertung in einem Capillarröhrchen aufgefangen und in diesem die Auswertung vorgenommen. Die Anwendung der Capillarmethode geschieht im Hin-blick auf das nur in ganz geringer Menge vorliegende Serum.
4. Die Auswertung wird als eine qualitative vorgenommen.

Literaturverzeichnis.

Ponsold, Münch. med. Wschr. **1933**, Nr 41, 1594 — Z. gerichtl. Med. **26**, 303—310 (1936); **28**, 248—255 (1937).
