

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Münster i. W.  
(Direktor: Prof. Dr. PONSOLD).

## Absorptionsnachweis der Untergruppen $A_1$ , $A_2$ , $A_3$ durch „Erschöpfung“ eines $\alpha$ -Testserums.

Von

ALBERT PONSOLD.

Mit 4 Textabbildungen.

### Einleitung.

Zur Absorption kann entweder eine ausreichende Blutkörperchenmenge verwandt werden, die zu einer „Erschöpfung“ des Testserums führt (PONSOLD), oder es kann eine zur „Erschöpfung“ nicht ausreichende Menge mit dem Testserum zusammengebracht werden, wie das bei der zur Zeit gebräuchlichsten Absorptionsmethode (FRIEDENREICH und WORSAAE) der Fall ist, so daß hernach im Abguß der Grad der „Erschöpfung“ des Testserums zu ermitteln ist.

Das Wesen unserer Methode, der Erschöpfungsmethode, liegt in der Ermittlung des „Gleichgewichts“ zwischen Serum und Blutkörperchen, d. h. jenes „Gleichgewichts“, bei dem die „Erschöpfung“ des Serums bzw. die Absättigung der Blutkörperchen gerade eintritt.

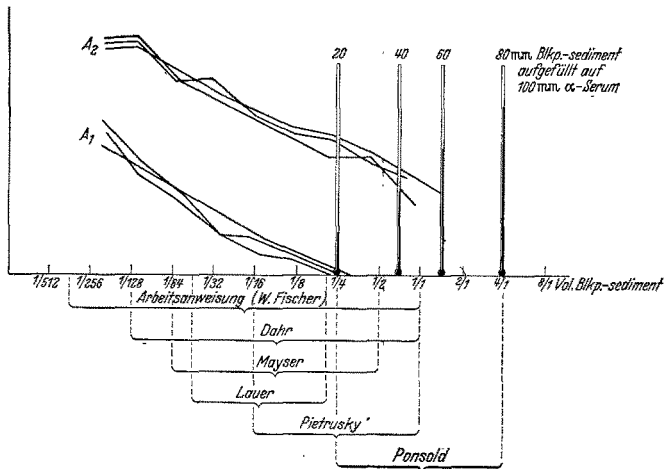
Die anzuwendenden Mengenverhältnisse sind im Gegensatz zu den üblichen (Abb. 1) auf ein Herantasten (Abb. 2) und Umkreisen dieses „Gleichgewichts“ zwischen Blutkörperchen und Serum eingestellt, also so, daß einerseits im Bereich der unvollständigen Absorption absorbiert wird, also unter oder bei  $\frac{1}{5}$  Vol., und andererseits im Bereiche der vollständigen Absorption, also bei  $\frac{1}{3}$  Vol. und darüber.

Da das Auftreten von Abgußagglutinaten bei der Absorption im Bereich der niedrigen (unvollständigen) Absorptionsstufen zweierlei bedeuten kann, nämlich entweder die unvollständige Bindung bei einer vorhandenen Blutkörpercheneigenschaft oder die ausgebliebene Bindung bei einer fehlenden Blutkörpercheneigenschaft, ist das *Schwergewicht* auf den Bereich der vollständigen Absorption, also die höheren, bisher nicht üblichen *Absorptionsstufen* ( $\frac{1}{1}$ — $\frac{4}{1}$  Vol.) zu legen, denn in diesem Bereiche fällt die Entscheidung über Vorhandensein oder Fehlen der nachzuweisenden Blutkörpercheneigenschaft.

### I. Technik.

Die Anwendung des Capillarröhrchens geschieht nicht aus methodischen, sondern lediglich aus technischen Gründen, und zwar wegen der leichten Gewinnung eines serumfreien Sediments, das nicht gewaschen

zu werden braucht, sowie wegen der Verwendbarkeit des C-Röhrchens sowohl als Meßpipette als auch als Zentrifugierröhrchen; schließlich



### a) Die Absorption.

Zur Gewinnung des *Sediments* werden mit dem zu untersuchenden Blut (ungeronnener Anteil) 8 Capillarröhrchen (C-Röhrchen) von 10 cm Länge und 1 mm Weite<sup>1</sup> bis zu  $\frac{9}{10}$  ihrer Länge angefüllt. Das letzte eine Zentimeter des C-Röhrchens muß unangefüllt und *unbenetzt* bleiben, damit die Öffnung an diesem Ende zugeschmolzen werden und das Blut somit im C-Röhrchen zentrifugiert werden kann. Das Zuschmelzen geschieht über der Sparflamme eines Bunsenbrenners. Das Blut wird im C-Röhrchen 15 Min. bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Hierbei bildet sich ein serumfreies Sediment<sup>2</sup>, das nicht gewaschen zu werden braucht.

Der Teil des C-Röhrchens, der das abgeschiedene Serum enthält, wird vom Sedimentteil abgefeilt. Um nun ein Übertragen des Sediments auf andere Capillarröhrchen zu ermöglichen, muß auch das zugeschmolzene Ende abgefeilt werden.

Hiernach wird in 4 neuen (unbenutzten) C-Röhrchen das Testserum in den Säulenlängen von 80, 60, 40 und 20 mm vorgelegt<sup>3</sup> und die entsprechende Sedimentmenge von 20, 40, 60 und 80 mm hinzugesetzt. Das Sediment läßt man zum Serum hinüberfließen, bis die Serumsäule das andere (freigelassene) Ende des C-Röhrchens erreicht.

Der Inhalt des angefüllten C-Röhrchens wird nun zur Durchmischung *auf einen Objektträger ausgeblasen*. Alsdann wird das Gemisch vom Objektträger in ein neues C-Röhrchen übertragen (zuzuschmelzendes Ende unbenetzt lassen!), die eine Öffnung zugeschmolzen und der Inhalt etwa eine halbe Stunde im Kühlschrank zur Absorption belassen. Hiernach wird das Blutkörperchen-Serumgemisch zentrifugiert (etwa 5 Minuten) und alsdann nach Abtrennen des Blutkörperchensediments der Abguß ausgewertet. Die Auswertung erfolgt sowohl qualitativ als auch quantitativ.

### b) Die Auswertung des Abgusses.

#### 1. Die qualitative Auswertung des Abgusses.

Hierbei ist darauf zu achten, daß die Test-Blutkörperchen in der gleichen Menge dem Abguß zugesetzt werden, in der dieser vorliegt, da in den einzelnen Absorptionsstufen verschiedene Mengen von Testserum verwandt werden.

Man entleert also den Abguß aus dem C-Röhrchen auf einen Objektträger und füllt den leergewordenen C-Röhrchenteil, in dem das Serum

<sup>1</sup> Zu beziehen durch Fa. Max Kühn, Stützerbach i. Th.

<sup>2</sup> Das Sediment im Zentrifugierröhrchen enthält etwa 10 % Serum.

<sup>3</sup> Das Abmessen der Säulenlänge erfolgt durch Auflegen des C-Röhrchens auf Millimeterpapier oder Heranhalten an ein Lineal. Hierbei wird das C-Röhrchen also als Meßpipette verwandt.

(Abguß) enthalten war, mit der Test-Blutkörperchenaufschwemmung an und setzt die auf diese Weise abgemessene Blutkörperchenmenge dem Abguß hinzu. Die Konzentration der Aufschwemmung der Testblutkörperchen soll eine 0,25%ige (bezogen auf Blutkörperchensediment) sein. Die Auswertung erfolgt zunächst mit  $A_1$ -Blutkörperchen, alsdann an einer zweiten Absorptionsreihe mit  $A_2$ -Blutkörperchen.

## 2. Die quantitative Auswertung des Abgusses (Agglutinationszeitbestimmung).

Bei der Auswertung des Abgusses wird das Auftreten der Agglutination zeitlich verfolgt, d. h. es wird die Zeit gemessen (Stoppuhr), die

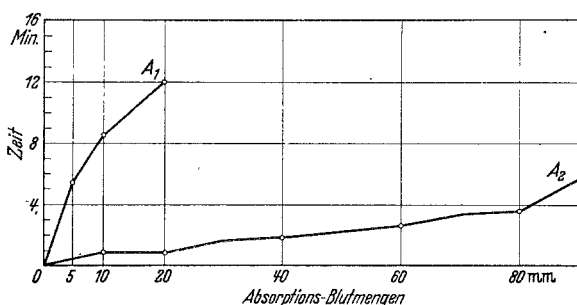


Abb. 3. Die beiden Zeitkurven als Kontrollproben bei Auswertung mit  $A_1$  Blkp.

zwischen dem Zusetzen von Blutkörperchen und dem Auftreten von Agglutinaten verstreicht. Beobachtet wird 15 Min. lang.

Das Messen der Agglutinationszeit ist ein quantitatives Kriterium, das der Titerbestimmung entspricht, aber einfacher ist als die Titerbestimmung. Je stärker der Titerabfall, desto später das Auftreten der Agglutinate im Abguß: der Intensitätsabnahme entspricht eine Zeitzunahme. Die Zeitbestimmung dient also der Intensitätsbestimmung des (im Abguß verbliebenen) Agglutininrestes.

Während Intensitätsgrade sonst mit Pluszeichen bezeichnet zu werden pflegen — eine subjektive Abschätzung hinsichtlich der Anzahl der Pluszeichen — wird hier die Intensität der Agglutinine durch die Agglutinationszeit bestimmt — ein objektives Kriterium.

Der Übersicht halber sind die Agglutinationszeiten (Ordinate) im Verhältnis zu den Sedimentmengen (Abszisse) in der Abb. 3 dargestellt. Hierbei ergeben sich zwei Zeitkurven, die einen gemeinsamen Ursprung haben, dann aber rechtwinklig divergierend auseinanderweichen.

Die eine Linie verläuft senkrecht. In ihr ist das Auftreten einer Agglutination bis zur „Erschöpfung“ des Serums — soweit also die Absorption eine unvollständige war, dargestellt — bzw. das Ausbleiben

einer Agglutination jenseits der „Erschöpfung“ (= in den höheren Absorptionsstufen) zu ersehen (=  $A_1$ -Blut).

Die andere Linie verläuft horizontal. In ihr kommt das Auftreten von Agglutinaten im Abguß beim Vorliegen einer Nichterschöpfbarkeit des Testserums zum Ausdruck, was das Vorliegen eines Nicht- $A_1$ -Blutes, also eines  $A_2$ - oder  $A_3$ -Blutes usw. bedeutet.

Diese beiden Linien stellen bei der Einzeluntersuchung die *Kontrollproben* mit einem bekannten  $A_1$ - und einem bekannten  $A_2$ -Blut dar.

Bei einem zu schwachen Testserum, d. h. bei einem solchen unter einem Titer von 1:16, kann ein zu untersuchendes starkes  $A_2$ -Blut eine völlige „Erschöpfung“ bewirken, so daß das Vorliegen eines  $A_1$ -Blutes vorgetäuscht wird. Allerdings ist die „Erschöpfung“ dann keine spezifische.

Bei einem zu starken Serum, d. h. einem solchen über 1:64, kann ein zu untersuchendes schwaches  $A_1$ -Blut, etwa ein  $A$ - $B$ -Blut, zur „Erschöpfung“ des Serums nicht ausreichen, so daß das Vorliegen eines  $A_2$ -Blutes vorgetäuscht wird. Es muß also auf die Stärke des Testserums geachtet werden.

## II. Die Beurteilung der Absorptionsergebnisse.

### a) Die Feststellung eines $A_1$ -Blutes.

Der Abguß wird zunächst mit  $A_1$ -Blutkörperchen ausgewertet. Tritt im Bereiche der Absorption mit unzureichenden Sedimentmengen, d. h. in den Sedimentmengen von weniger als 20 mm (= unvollständige Absorption), eine Agglutination ein und bleibt sie im Bereiche der Absorption mit zureichenden Sedimentmengen (= vollständige Absorption) aus, d. h. bei Sedimentmengen von mehr als 30 mm, so handelt es sich bei dem zu untersuchenden Blut um ein  $A_1$ -Blut.

Sedimentmenge . . . . .	20	40	60	80 mm
Ausgewertet mit $A_1$ -Blutkörperchen . . . . .	+	0	0	0
Vorliegen eines $A_1$ -Blutes.				

Was nun die Agglutinationszeit bei Auswertung des Abgusses anbetrifft, so treten bei 5 mm Sediment die Agglutinate in 5 Min., bei 10 mm Sediment in 8 Min., bei 20 mm Sediment in etwa 12 Min. auf. Diese deutliche Verlängerung der Agglutinationszeit bei nur geringer Zunahme der Sedimentmenge bedeutet die beträchtliche Zunahme der Bindung. Schon allein aus dieser Verlangsamung der Agglutinationszeit innerhalb dieses Mengenbereiches (5—20 mm) ist auf ein  $A_1$ -Blut zu schließen.

### b) Die Feststellung eines $A_2$ -Blutes.

Wird der Abguß mit  $A_1$ -Blutkörperchen ausgewertet und treten in allen Mengenverhältnissen, also auch bei 40, 60 und 80 mm Agglutinate auf, so liegt kein  $A_1$ -Blut vor, sondern ein  $A_2$ - bzw.  $A_3$ -Blut.

Zur weiteren Differenzierung und Sicherung kann nun eine zweite Abgußreihe mit  $A_2$ -Blutkörperchen ausgewertet werden. Tritt hierbei eine Agglutination nur in den Stufen mit unvollständiger Absorption (unzureichende Sedimentmengen) auf und bleibt sie in den höheren Stufen, d. h. ab 30 mm aufwärts, aus, so handelt es sich bei dem zu untersuchenden Blut um ein  $A_2$ -Blut (Abb. 4).

Für gewöhnlich reicht die Auswertung mit  $A_1$ -Blutkörperchen aus, wobei dann ein Ausbleiben der Agglutination in den höheren Stufen bedeutet, daß ein  $A_1$ -Blut vorgelegen hat, und wobei ein Auftreten von Agglutinationen auch in den höheren Stufen bedeutet, daß ein  $A_2$ -Blut (genau genommen: kein  $A_1$ -Blut!) vorgelegen hat.

Bei der Auswertung des Abgusses mit  $A_1$ -Blutkörperchen handelt es sich wohl-gemerkt um einen indirekten  $A_2$ -Nachweis. Für den direkten  $A_2$ -Nachweis ist (an die Auswertung mit  $A_1$ -Blutkörperchen) die Prüfung des Abgusses mit  $A_2$ -Blutkörperchen anzuschließen. In Aus-schließungsfällen ist das unerlässlich!

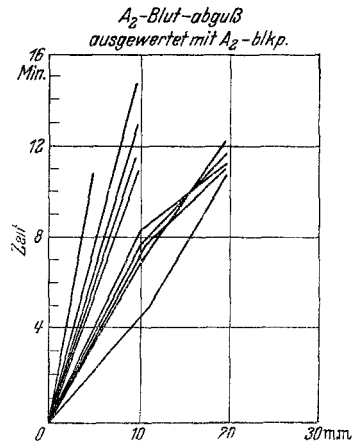


Abb. 4. Die Linien bedeuten das Auftreten von Agglutinaten im Abguß im Bereiche der unvollständigen Absorption, also bis an die Grenze der „Erschöpfung“ des Testserums. Die Linien stellen Zeitkurven dar. Sie entsprechen der Steilkurve in Abb. 3.

Sedimentmenge . . . . .	20	40	60	80 mm
Ausgewertet mit $A_1$ -Blutkörperchen . . . . .	+	+	+	+
Ausgewertet mit $A_2$ -Blutkörperchen . . . . .	+	0	0	0
Vorliegen eines $A_2$ -Blutes.				

### c) Die Feststellung eines $A_3$ -Blutes.

Wird der Abguß mit  $A_1$ -Blutkörperchen ausgewertet und tritt in allen Absorptionsstufen eine Agglutination ein, so handelt es sich bei dem zu untersuchenden Blut nicht um ein  $A_1$ -Blut. Tritt nun bei der Prüfung des Abgusses mit  $A_2$ -Blutkörperchen auch in allen Absorptionsstufen eine Agglutination auf, so handelt es sich auch nicht um ein  $A_2$ -Blut.

Nun ist zu prüfen, ob etwa ein  $A_3$ -Blut vorliegt. Hierzu ist der Abguß mit  $A_3$ -Testblutkörperchen auszuwerten. Da solche Blutkörperchen aber kaum stets zur Verfügung stehen dürften, ist mit den zu untersuchenden Blutkörperchen auszuwerten. Tritt hierbei nur in den untersten Stufen eine Agglutination ein und bleibt sie in den höheren Stufen aus, so liegt ein  $A_3$ -Blut vor.

Sedimentmenge . . . . .	20	40	60	80 mm
Ausgewertet mit A <sub>1</sub> -Blutkörperchen . . . . .	+	+	+	+
Ausgewertet mit A <sub>2</sub> -Blutkörperchen . . . . .	+	+	+	+
Ausgewertet mit A <sub>3</sub> -Blutkörperchen . . . . .	+	0	0	0

Vorliegen eines A<sub>3</sub>-Blutes.*Zusammenfassung.*

1. Zur Ermittlung der „Erschöpfbarkeit“ des *a*-Testserums wird die Absorption in einem Mengenverhältnis durchgeführt, in dem die vollständige Bindung der Agglutinine gerade *noch nicht* erreicht wird ( $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{5}$  Vol.), sowie in den nächstfolgenden höheren Absorptionsstufen (bis  $\frac{4}{1}$  Vol.), bei denen die Vollständigkeit der Bindung *mit Sicherheit* erreicht wird.

2. Bleibt dann in den höheren Absorptionsstufen die Agglutination aus (bei Auswertung mit A<sub>1</sub>-Blutkörperchen), so ist ein solches Blut ein A<sub>1</sub>-Blut.

3. Tritt aber eine Agglutination auch in den höheren Stufen ein, so ist ein solches Blut kein A<sub>1</sub>-Blut (= indirekter A<sub>2</sub>-Nachweis).

Soll nun festgestellt werden, ob es sich tatsächlich um ein A<sub>2</sub>-Blut handelt, so ist eine zweite Abgußreihe mit A<sub>2</sub>-Testblutkörperchen auszuwerten. — Bleibt nun die Agglutination in den höheren Stufen aus, so ist das zu untersuchende Blut ein A<sub>2</sub>-Blut (= eigentlicher A<sub>2</sub>-Nachweis).

4. Tritt bei der Auswertung mit A<sub>2</sub>-Blutkörperchen eine Agglutination auch in den höheren Stufen ein, so ist ein solches Blut weder ein A<sub>1</sub>- noch ein A<sub>2</sub>-Blut.

Soll nun festgestellt werden, ob es sich bei einem solchen Blut um ein A<sub>3</sub>-Blut handelt, so ist eine dritte Abgußreihe mit A<sub>3</sub>-Testblutkörperchen auszuwerten. Da solche kaum stets zur Verfügung stehen dürften, ist mit den zu untersuchenden Blutkörperchen auszuwerten. Hierbei werden Agglutinate in den niedrigen Stufen auftreten und in den höheren Stufen (vom Erschöpfungspunkt an) ausbleiben.

5. Die Methode ist nicht an die Capillarmethode gebunden. Das Capillarröhrchen kann aber als Meßgefäß und als Zentrifugiergefäß verwandt werden.