

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. H. ELBEL).

Über den Gelatine-Rhesustest.

Von

Dr. med. OTTO PROKOP,
Assistent am Institut.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 1. Januar 1950.)

Der Nachweis von Rhesusantigenen oder von Antikörpern kann auf verschiedene Weise mit einer der üblichen Agglutinationsmethoden geführt werden, wobei man je nach der Wirksamkeit der Reagentien das Verfahren variieren wird, um sowohl den Erfordernissen der Empfindlichkeit wie auch denen der Spezifität zu genügen.

Eine der ersten Feststellungen von amerikanischer Seite war (WIENER), daß die Reaktion mit in Kochsalz aufgeschwemmten Blutkörperchen und entsprechend verdünnten Seren in manchen Fällen negativ verlief, obwohl an dem Vorhandensein von homologen Antigenen und Antikörpern kein Zweifel sein konnte. Dagegen konnte man eine positive Reaktion herbeiführen, wenn man die Blutkörperchen wusch und in Albuminlösung suspendierte („indirekter Coombstest“). Man kann auch die durch in diesem Falle „blockierte“ (DIAMOND und ABELSON) Antikörper sensibilisierten Blutkörperchen waschen und dann ein Antimenschenglobulinserum zusetzen (direkter Coombstest). Ebenso gelingt der Nachweis, wenn man die Blutkörperchen in einer Aufschwemmung von AB-Serum untersucht.

WIENER meint, daß es sich um 2 verschiedene Arten von Antikörpern handelt, univalente und bivalente. Die bivalenten reagieren sowohl im Kochsalz als auch im AB-Serum und mit dem Coombstest positiv, die univalenten sind in Kochsalzaufschwemmung negativ. WIENER bezeichnet sie auch als „Konglutinine“. Beide Antikörper sind also meist nebeneinander nachweisbar und ihr Verhältnis zueinander ist noch nicht geklärt. Der Titer der univalenten Antikörper steigt sehr häufig erst an, wenn der Kochsalztiter sinkt. Andererseits ist bei kochsalzpositiven Seren der Konglutintiter meistens noch höher. Nach unserer bisherigen Erfahrung haben wir sogar immer einen höheren Konglutintiter gefunden, wenn auch bivalente Antikörper nachweisbar waren. Dagegen hatten unsere kochsalz-negativen Antikörper stets einen niedrigeren univalenten Titer als jene. Wir haben gewisse Bedenken gegen die von WIENER behauptete strenge Trennung und halten es auch für möglich, daß die von ihm angewandte fraktionierte Fällung durch verschiedene konzentrierte Natriumsulfatlösungen ein viel zu grober Eingriff in die Struktur der Eiweißkörper ist. Natürlich denkt der mit der Blutgruppenserologie vertraute Untersucher immer an die Analogien, welche zu dem Problem der initialen Hemmung bestehen. Jedenfalls haben wir die Absicht, eingehend zu untersuchen, ob diese Phänomene sich nicht durch quantitative Faktoren erklären lassen.

Bei derartigen Untersuchungen machte sich, wie wohl auch an anderer Stelle, bei uns bald ein fühlbarer Mangel an AB-Serum geltend, wenn größere Reihenexperimente angestellt werden mußten und wir haben daher gleich die von FISK und McGEE empfohlene Gelatinelösung aufgegriffen, die inzwischen auch von der Industrie (SCHMIDTMANN) als besonders wertvolles Substitutionsmittel für AB-Serum propagiert worden ist. Die Gelatinelösung soll durch ihre kohäsive Kraft in unspezifischer Weise die Konglutation erleichtern, einen höheren Titer anzeigen als der AB-Serumtest und daher besonders zur Schnellbestimmung geeignet sein.

Die angegebenen Titer sind ganz ungewöhnlich hoch. Mit unseren Gelatinelösungen haben wir, was gleich vorweg gesagt werden soll, niemals einen höheren Titer erreicht als mit AB-Serum, es sei denn auf Kosten der Spezifität. Den Endstufen der Verdünnungsreihen konnte man bei der mikroskopischen Ablesung nicht mehr ansehen, ob die gefundenen Agglutinate (Konglutinate) spezifisch oder unspezifisch waren. Das gilt vor allem für hochprozentige Gelatinelösungen.

Als wir die gleichen Versuche mit der von der Industrie herausgebrachten „Konglutininlösung“ (5%ige Gelatine) anstellten, waren die Titer auch nicht höher als mit AB-Serum. Verminderten wir die Konzentration der Gelatine, so sank der Titer ab und je mehr man sich in der Verdünnung der einfachen gepufferten Salzlösung näherte, um so näher kam man auch dem Titer, der beim gewöhnlichen Test in Kochsalzlösung auf bivalente Antikörper erzielt wird. Es hatte also den Anschein, daß mit der fallenden Kohäsion der Suspendierflüssigkeit auch der Titer fällt, was die Vermutung aufkommen ließ, daß die Titerhöhe eine Frage der Viscosität ist oder mit anderen Worten von der Sedimentationsgeschwindigkeit der Erythrocyten abhängt. Somit wären Agglutination und Konglutation gleiche Phänomene, die sich nur in der Zeit unterscheiden, in der die Blutkörperchen in Schwebē gehalten miteinander reagieren können.

Auf ein Verfahren, das sich diese Gesichtspunkte vielleicht unbewußt zum Vorteil zuordnet, möchten wir bei dieser Gelegenheit hinweisen. Es handelt sich um die Capillarmethode von CHOWN, der auf das PONSOLDSche Verfahren zurückgreift¹. Der Vorteil liegt unseres Erachtens nicht nur in der Serumersparnis, wie DAHR meint (wir benötigen weder zum Objektträger- noch zur Röhrchentestung eine größere Serummenge), sondern vor allem in der langsamem, verzögerten Sedimentation in einer langen Capillare. CHOWN stellt seine Capillaren noch dazu in 45° Schrägen auf.

Die von uns angestellten Versuche sollten das Wesen der Konglutation in ihrer physikalischen Grundlage beleuchten. Die Gelatinelösungen wurden zuerst nach dem Rezept von FISK und McGEE angefertigt: x g Gelatine, 1 g sekundäres Natriumphosphat, 100,0 Aqua dest.

¹ Allerdings ohne PONSOLD zu nennen.

Nach 24 Std Quellungszeit 2 Std Aufenthalt im Autoklaven bei 120° C und 1,1 Atü. Der entstehende Bodensatz wurde abfiltriert (ursprünglich hielten FISK und Mc GEE ihre Lösungen nur 15 min im Autoklaven). Wir prüften nun unter Anwendung der Röhrchenmethode die Titerhöhe, die sich mit verschiedenen konzentrierten Gelatinelösungen erzielen ließ. Dabei konnte bis zu einer bestimmten Konzentration eine ansteigende Tendenz beobachtet werden. Ab 8% begann die Pseudoagglutination. Alle Versuche wurden mit demselben Rh-Serum angestellt (AB-Serumtiter 512, NaCl-Titer 64), Austestung gegen R_1R_1 -Blutkörperchen. Mit einem 2. Serum (Serum Ha gegen R_1R_2 -Blutkörperchen) war das Ergebnis gleich. Die 8%ige Lösung zeigt bereits eine positive Leerkontrolle.

Tabelle 1. *Abhängigkeit des Konglutinintiters von der Gelatinekonzentration. Die Autoklavenzeit betrug 2 Std.*
(Mikroskopische Ablesung.)

Gelatine %	Titer	
	Serum x : $R_1 R_1$	Serum Ha : $R_1 R_2$
0,7	128	32
2,0	128	128
4,0	256	128
6,0	512	256
8,0	Pseudo- agglutinate	Pseudo- agglutinate

8%ige Gelatinelösung ergab bei 4ständigem Autoklavenaufenthalt mit denselben Reagentien einen Titer von 1:256 und die 10%ige ergab beim gleichen Autoklavenaufenthalt überraschenderweise denselben Titer.

Es drängte sich nun die Frage auf, welcher Umbau in der Gelatine durch den längeren Autoklavenaufenthalt vorgeht. Zunächst mußte natürlich mit Rücksicht auf die Erfahrungen der Technologie der Gelatine an die Viscosität gedacht werden. Es schien uns sehr wahrscheinlich, daß die Titerhöhe im Gelatinetest von der Viscosität abhängt, daß es also, wie bereits erwähnt, auf die Sedimentationsgeschwindigkeit ankommt, die ja der Viscosität parallel läuft.

Eine Reihe von Versuchen hat dies bestätigt. Zahlenangaben hätten hier keinen Zweck, da es sich nur um Vergleichsmessungen handelte. Wir haben ein einfaches Auslaufviscosimeter eingesetzt und die Sedimentationsgeschwindigkeit in einem Modellversuch mittels paraffinüberzogener Glaskugeln gemessen. Die beiden Werte können jederzeit von jedem Untersucher ohne Schwierigkeiten gemessen werden und laufen einander parallel. Da es hier nicht auf exakt auf Wasser bezogene Werte ankommt, sondern nur auf Vergleichsmessungen, kann man die beiden Methoden anhaftende Fehlerquelle der Wirbelbildung ohne weiteres in Kauf nehmen.

Sofort änderte sich das Bild, wenn die 8%ige bzw. sogar eine 10%ige Gelatinelösung einem längeren Aufenthalt im Autoklaven ausgesetzt wurden. Die Viscosität sank sofort auf Werte, die denen der 4%igen und der 6%igen Lösung glichen und damit änderte sich auch der Titer. Die Reaktionen waren durchaus spezifisch und gut brauchbar: Die

Wir haben nun mit 2 Gelatinelösungen von verschiedener Konzentration (8%ig und 4%ig) die Titerverhältnisse bei verschiedenen Autoklavzeiten untersucht und mit der Viscosität verglichen. Dabei zeigte sich von 1—4 Std Autoklavenaufenthalt ein Ansteigen der Titerwerte bei gleichzeitigem Absinken der Viscosität. Bei 6ständigem Aufenthalt im Autoklaven sank die Viscosität natürlich weiter ab, aber auch der Titer fiel (Abb. 1). Die Werte wurden bei beiden Gelatinelösungen mit denselben Reagentien (Serum und Testblutkörperchen) erhalten. Weitere Versuche bestätigten, daß die gleiche Titerhöhe mit Gelatinelösungen verschiedener Konzentration bei gleicher Autoklavzeit erzielt werden kann. Auch für eine Gelatinelösung von 10% ist das Optimum der Autoklavzeit 4 Std. Das bedeutet also, daß es bei der Gelatinelösung weniger auf die Konzentration als vielmehr auf die optimale Aufenthaltszeit im Autoklaven ankommt. Die Autoklavzeit steht zwar, wie vorhin gezeigt, in einem bestimmten Verhältnis zur Viscosität, es ist aber ersichtlich, daß Gelatinelösungen, die in ihrer Viscosität infolge des Konzentrationsunterschiedes (4% bzw. 10%) auch bei gleicher Autoklavzeit noch grob differieren, ein gemeinsames Optimum dieser Autoklavzeit haben. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist also für die Stärke der Konglutinationsreaktion nicht allein entscheidend.

Man kann aus den Versuchen ersehen, daß man mit Gelatinelösungen geringerer Konzentration Titer erreicht, die höherprozentigen Lösungen entsprechen. Offenbar liegt das an einem Wechselspiel zwischen der durch den Autoklavenaufenthalt herausgelösten Glutinsubstanz und der Viscosität: Hochprozentige Lösungen hemmen bei dem Optimum der Autoklavzeit die Konglutation zwar durch noch zu hohe Viscosität, aber sie enthalten mehr Glutinsubstanz. Niederprozentige Lösungen fehlt die hemmende zu hohe Viscosität, sie enthalten aber wenig Glutinsubstanz (LIESEGANG). Das gemeinsame Optimum der Lösungen verschiedener Konzentration deutet darauf hin, daß es bei Verlängerung der Autoklavzeit zu tiefgreifenden Umbauvorgängen in der wirksamen (Glutin-?)Substanz kommt. Aus der Abb. 1 ist ersichtlich, daß das Autoklavzeitoptimum bei der höher konzentrierten Lösung viel schärfer ausgeprägt ist, als bei der weniger

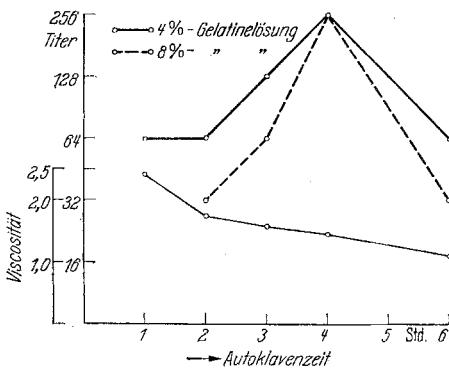


Abb. 1. Abhängigkeit des Konglutinintiters von der Autoklavzeit. Der Viscositätsabfall der 4%igen Gelatinelösung ist eingezeichnet (dünne ausgezogene Kurve).

konzentrierten. Das unterstützt die Vermutung, daß bei Autoklavenaufenthalt über 4 Std eine Schädigung der Glutinsubstanz auftreten dürfte. Praktisch ist daraus die Folgerung zu ziehen, daß man bei steigender Konzentration der Gelatinelösung vermehrte Sorgfalt auf die Ermittlung des optimalen Aufschlusses verwenden muß. Daß hierbei der angewandte Dampfdruck berücksichtigt werden muß, ist selbstverständlich.

Zusammenfassung.

Bei der Verwendung von Gelatinelösung zum Konglutinintest hat sich gezeigt, daß für die Titerhöhe die prozentuale Konzentration nicht allein entscheidend ist, sondern daß es im wesentlichen auf die Technik der Verarbeitung ankommt. Das Optimum der Wirksamkeit einer Gelatinelösung ist nämlich von der Konzentration nicht so sehr abhängig wie von der Autoklavenzeit. Aus unseren Versuchen ergab sich, daß mit der Gelatinelösung kein höherer Titer erreicht werden kann, als mit AB-Serum. Dennoch ist der Gelatinetest aus der Arbeit bei der Rhesusuntersuchung nicht mehr wegzudenken. Gelatinelösungen sind jederzeit billig herzustellen und liefern vollwertige und hervorragend klare Resultate. Es sei jedoch davor gewarnt, mit schlecht behandelten oder zu hoch konzentrierten Lösungen zu arbeiten oder die Erwartungen einer Reaktionsverstärkung an sich niedertitriger Seren durch Arbeiten in Gelatine zu hochzuschrauben oder gar eine positive Reaktion dort zu erwarten, wo wegen Fehlens von Antikörpern oder Rezeptoren schon im AB-Serumtest keine positive Reaktion zu erzielen ist.

Literatur.

CHOWN: Amer. J. clin. Path. (Techn. Suppl.) **11**, 14 (1944). — DAHR, P.: Technik der Blutgruppen- und Blutfaktorenbestimmung. Stuttgart: Georg Thieme 1948. — DIAMOND and ABELSON: J. clin. Invest. **24**, 122 (1945). — FISK and Mc GEE: Amer. J. clin. Path. **17**, 737 (1947). — LIESEGANG, R. E.: Kolloid-chemische Technologie. Leipzig: Theodor Steinkopff 1927. — PONSOLD: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **24**, 60 (1934). — SCHMIDTMANN, K. W.: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 1003. — WIENER, A. S.: Rh-Syllabus. Stuttgart: Georg Thieme 1949.

Dr. OTTO PROKOP, Bonn,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität.