

# Über die Bedeutung der Temperatur für die Differenzierung der echten und falschen Isoagglutination.

Von

Privatdozent Dr. **Goroney**, Königsberg i. Pr.

Mit 2 Textabbildungen.

[Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Modena. — Direktor: Professor *Lattes*<sup>1</sup>.]

Zu den wichtigen Vorbedingungen, die die Blutgruppendiagnose als forensische Methode erfüllen muß, gehört auch besonders die, daß menschliches Serum niemals Blutkörperchen der gleichen Person beeinflußt, daß es also eine normale Autoagglutination nicht gibt.

Demgegenüber haben jedoch experimentelle Untersuchungen ergeben, daß es außer der echten Isoagglutination (d. h. der spezifischen Blutkörperchenagglutination durch Serum anderer Individuen derselben Gattung) Phänomene gibt, die der echten Isoagglutination in mehr oder minder hohem Grade ähnlich sind oder sogar mikroskopisch und makroskopisch gleich aussehen. Zu diesen Phänomenen gehören die Pseudoagglutination durch Geldrollenbildung und die Autoagglutination.

Die Kenntnis dieser Vorgänge und die Unterscheidung ist naturgemäß von großer Wichtigkeit.

Die Geldrollenbildung ist eine im normalen und pathologischen Blut konstante und unspezifische Erscheinung. *Lattes* hat gefunden, daß unter bestimmten Umständen (Verdünnung oder Konzentration des Serums) diese Geldrollenbildung eine unregelmäßige Anhäufung der Blutkörperchen erzeugen kann: Pseudoagglutination. Dann ist es nicht möglich, lediglich aus der Gestalt der Klumpen die Differentialdiagnose wahre oder falsche Agglutination zu stellen.

Die Pseudoagglutination unterscheidet sich grundsätzlich von der echten Isoagglutination dadurch, daß sie nicht spezifisch ist und unter dem Einfluß jedwelchen Serums auf jedwelche Blutkörperchen eintritt. Sie ist ein rein physikalischer Vorgang, der ohne Bindung irgend eines Antikörpers vor sich geht, so daß ein pseudoagglutinierendes Serum niemals durch Blutkörperchen erschöpft werden kann.

<sup>1</sup>) Die Bedeutung, die der Blutgruppendiagnose in der gerichtlichen Medizin in immer steigendem Maße zukommt, veranlaßte mich, bei einem anerkannten Forscher wie *Lattes* persönlich zu arbeiten. Für das große Entgegenkommen, das Professor *Lattes* besonders auch bei den Untersuchungen vorliegender Arbeit mir zeigte, spreche ich ihm auch an dieser Stelle meinen besten Dank aus.

Daneben kann es, und zwar besonders bei Kranken, zu dem Vorgang der Autoagglutination kommen, den *Lattes* zuerst als abhängig von der Pseudoagglutination durch Geldrollenbildung betrachtet hatte. Es hat sich aber herausgestellt, daß diese Autoagglutination manchmal mit der Bindung eines Antikörpers vor sich geht [*Clough-Richter, Mino, V. Debenedetti, Togunova*<sup>1)</sup>].

Eine solche Bindung hatte schon vor vielen Jahren *Landsteiner* beim Kaninchen beobachtet; sie kam nur in der Kälte vor. Neuerdings haben *Hirszfeld, Bialosuknia, Mino* dasselbe Phänomen auch beim Menschen beobachtet, und zwar als eine ganz physiologische Erscheinung, die auch nur in der Kälte vorkommt. Gewöhnlich bleibt das Phänomen über 5° aus. Es gibt aber bei verschiedenen Menschen Schwankungen der sog. Wärmeamplitude des Serums, so daß in einigen seltenen, möglicherweise pathologisch oder konstitutionell bedingten Fällen die Reaktion auch bei höheren Temperaturen sogar bis 20° stattfinden kann. Auf diese Weise können die oben erwähnten klinischen Fälle erklärt werden.

Demgegenüber haben die Isoagglutinine eine Wärmeamplitude von 0–40°, verlieren aber nach den Untersuchungen *Minos* erheblich an Reaktionsfähigkeit, je mehr sie sich der Körpertemperatur nähern.

Die Autoagglutination ist ähnlich der Pseudoagglutination ein nicht-spezifisches Phänomen, so daß *Mino* für sie den Namen „Panagglutination“ vorgeschlagen hat, weil solche autoagglutinierenden Sera alle Blutkörperchen der gleichen Gruppen ebenso agglutinieren wie die eigenen. Sie unterscheidet sich von der echten Isoagglutination abgesehen von den Beziehungen zur Temperatur eben dadurch, daß ihr gar keine Spezifität zukommt.

Daß beide Phänomene, die Pseudoagglutination durch Geldrollenbildung sowie die Autoagglutination, zu Verwechslungen oder zum mindesten zur Erschwerung der Diagnose führen, ist klar. Es ist das Verdienst von *Lattes*, darauf hingewiesen und Methoden angegeben zu haben, die die Differenzierung der wahren von der falschen Isoagglutination ermöglichen. *Lattes* fand, daß durch schwache Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung (gewöhnlich 1 : 2) oder Lecithinzusatz oder die Anwendung nichtinaktivierter abgelagerter Testsera die falsche Agglutination verhindert werden kann.

Die oben erwähnten Beziehungen zu der Temperatur schienen jedoch eines genaueren Studiums wert, zumal für die forensisch-medizinische Fragestellung jede nur mögliche Sicherung notwendig ist. Die entsprechenden Untersuchungen haben wir auf Anregung von *Lattes* gemeinsam vorgenommen, und zwar war uns dabei der leitende Gedanke: welches ist die beste Methode hinsichtlich der Temperatur, die die Fehler-

<sup>1)</sup> Ganz ausführliche Literatur siehe: *Lattes*, Individuelle Blutdiagnose. Berlin: Springer 1925.

quellen der Pseudo- und Autoagglutination vermeiden läßt, sowohl für die Herstellung der für die Untersuchungen notwendigen Testsera wie für die Behandlung forensischen Blutmaterials?

Wir gingen so vor, daß wir 1. frisches Blut, 2. trockenes Blut, wie es in Blutflecken vorzukommen pflegt, untersuchten.

### I. Untersuchung von frischem Blut.

Etwa 1 ccm Blut wurde bei der Entnahme in eisgekühltem Gläschen aufgefangen, im Eisschrank bis zur Gerinnung aufgehoben und im Eis zentrifugiert.

Eine entsprechende Portion wurde im Brutschrank bei 37° aufgefangen, dort belassen und bei 37° zentrifugiert.

Diese beiden so gewonnenen Sera wurden mit eigenen Blutkörperchen, die nebenbei gewonnen und gewaschen waren, versetzt, und zwar derart, daß eine Spur Blutkörperchensediment verschiedenen Verdünnungen der Sera im hängenden Tropfen zugesetzt wurde. Die Präparate wurden nach dem Ansetzen etwa  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Stunde bei 12° beobachtet und dann in Eis gebracht. Die Resultate ergibt Tab. 1.

Tabelle 1.

	Verdünnung	Serum	Reaktionsbild bei 12°	Reaktionsbild bei 0°
1.	0	k	Geldrollen stark	Geldrollen stark wie bei 12°
2.	0	w	stärker als bei 1	Bild völlig verändert, sehr große Haufen, einige Geldrollelemente
3.	1 : 2	k	negativ	Spuren von Anhäufungen
4.	1 : 2	w	Spuren von Blutkörperchenanhäufungen	Große Haufen ohne Geldrollen
5.	1 : 3	k	negativ	negativ
6.	1 : 3	w	negativ	Häufelung angedeutet.

k = bei 0° hergestellt; w = bei 37° hergestellt.

Das Bedeutsame der in Tab. 1 verzeichneten Untersuchungen beruht darin, daß die bei 0° gewonnenen Seren die eigenen Blutkörperchen bei Zimmertemperatur überhaupt nicht agglutinieren und unverdünnt nur typische Geldrollen erzeugen. Bei 0° allerdings, wie Versuch 3 zeigt, treten Spuren auf. Die bei 37° gewonnenen Seren dagegen bewirken bei Zimmertemperatur unverdünnt und, was besonders bemerkenswert ist, bei der Verdünnung bis 1 : 2 eine geringe, aber deutlich feststellbare Agglutination, und diese verstärkt sich außerordentlich bei 0° und erscheint auch bei dieser Temperatur in höherer Verdünnung.

Die Autoagglutinine werden, so lehrt dieser Versuch, offenbar in der Kälte während der Trennung des verwendeten Serums vom Blutkuchen völlig an die Blutkörperchen gebunden.

Die praktische Folgerung ist daher die, daß die Testseren am besten auf Eis gewonnen werden. Auf diese Weise erhält man Seren, die völlig

oder fast völlig frei von Autoagglutininen sind. Selbstverständlich bilden auch diese Seren Geldrollen. Aber diese Erscheinung kann ausgeschaltet werden, wenn man wie üblich die Reaktion mit Blutkörperchenaufschwemmung vornimmt, und zwar zweckmäßig zu gleichen Teilen.

## II. Untersuchung von trockenem Blut.

Es gibt zwei Wege zur Untersuchung der agglutinierenden Eigenschaften von trockenem Blut: Die Extraktbereitung mit weiterer Untersuchung im hängenden Tropfen und die direkte Beobachtung der Reaktion trockener Blutspuren auf Blutkörperchenaufschwemmung unter dem Deckglas.

Was die Extraktuntersuchung anbetrifft, haben wir versucht festzustellen, unter welchen Temperaturbedingungen es die zuverlässigsten Resultate gibt, d. h. die Wirkung der Isoagglutinine am reinsten, unter Ausschaltung der autoagglutinierenden Phänomene, in Erscheinung tritt. Bei der direkten Beobachtung der trockenen Blutspuren hatten wir nur feststellen wollen, ob sich Verschiedenheiten fänden, je nachdem die Blutflecken in der Kälte oder in der Wärme entstanden waren.

Tabelle 2.

	Verdünnung	Serum	Temp.	Reaktionsbild	Temp.	Reaktionsbild	
1.	0	k	15	Spuren von Geldrollen, kl. Elemente	0	Rollen etwas vermehrt, viele Blutkörperchen frei	Flecke bei 0° resp. bei 37°
2.	0	w	15	Zahlr. Geldrollen u. Haufenbildung aus Geldrollen	0	Nur große Haufen, k. Blutkörperchen frei	
3.	1 : 2	k	15	negativ	0	negativ	16 St. getrockn. und 6 St. extrahiert.
4.	1 : 2	w	15	Spuren von Haufen	0	Deutl. Haufenbildg.	
5.	0	k	15	negativ	0	negativ	14 St. getrocknet, 11 St. extrahiert
6.	0	w	18	Spuren von Haufen, Blutkörperchen stechapfelförmig	0	Schwache Haufenbildung	
7.	1 : 2	w	18	negativ	0	Spuren von Haufen	12 St. getrockn., 14 St. extrahiert. Blutkrusten gewogen u. ganz genau verdünnt.

1—5 Blut Oaβ; 6—7 Blut Aβ.

Wir gingen folgendermaßen vor. Blutstropfen, wie sie bei Einstich in die Fingerbeere entstehen, wurden auf Glasplatten bei 0° und bei 37° eingetrocknet gelassen und bei dieser Temperatur aufbewahrt. Eine bestimmte (gewogene) Menge des bei 0° eingetrockneten Blutes wurde mit einer entsprechenden Menge Aq. dest. (auf das 5fache) mehrere Stunden im Eisschrank extrahiert und in Eis zentrifugiert. Dann wurde sofort der Extrakt abgehoben. Entsprechend wurden die warmen Flecken im

Brutschrank mit warmer Aq. dest. extrahiert und warm zentrifugiert. Beide Extrakte wurden mit eigenem frischem Blutkörperchensediment versetzt, und zwar unverdünnt und in der Verdünnung von 1:2. Die Präparate wurden  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Stunde bei Zimmertemperatur beobachtet und dann in Eis gebracht.

Die Ergebnisse der Tab. 2 sind einleuchtend. Man sieht, daß es deutliche Unterschiede gibt, je nachdem der Extrakt kalt oder warm angesetzt und gewonnen ist. Die von manchen Autoren vorgeschlagene Methode, die Extrakte, um sie leichter zu gewinnen, bei 37° anzusetzen, bietet daher außer der Möglichkeit der Fäulnis auch die Gefahr, daß die Autoagglutinine in den Extrakt übergehen und so die Isoagglutination überlagern können.

Wenn man im Gegenteil in der Kälte extrahiert, bleiben die Autoagglutinine im Rückstand gebunden. Es wird der Extrakt von diesen störenden Substanzen befreit, und so kann die echte Isoagglutination am reinsten beobachtet werden. Diese Maßnahmen genügen jedoch nicht, um die Geldrollenbildung auszuschalten. Dazu muß man, wie oben erwähnt, darauf achten, daß die Konzentration der Extrakte zweckmäßig ist, oder man muß Lecithinzusatz verwenden.

In der Praxis wird man daher die Extrakte stets in der Kälte bereiten, denn dieser Untersuchungsmethode haften nur Vorteile und keine Nachteile an.

Wir haben dann dasselbe eingetrocknete Blut der Gruppen I und II mit der Deckglas-methode untersucht, d. h. wir haben die betreffende Spur, mit einer Blutkörperchenaufschwemmung versetzt, unter dem Deckglas beobachtet. Wir hatten hier absichtlich keine weiteren Eingriffe auf das eingetrocknete Blut unternommen; denn wir wollten nur beobachten, ob sich Unterschiede zwischen in der Kälte und in der Wärme eingetrocknetem Blut finden.

In der Tat haben wir Unterschiede in prägnanter Weise beobachtet. Die kalten Blutspuren, bei Zimmertemperatur und sodann in Eis untersucht, haben entweder negative Resultate ergeben oder eine regelmäßige Geldrollenbildung, die nur an gewissen Stellen, wo offenbar die Konzentration die geeignete war, stärker ausgeprägt war (s. Abb. 1). Die warmen Flecken dagegen zeigten schon bei Zimmertemperatur und noch viel

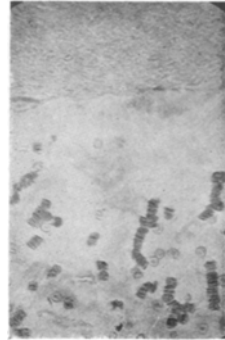


Abb. 1.

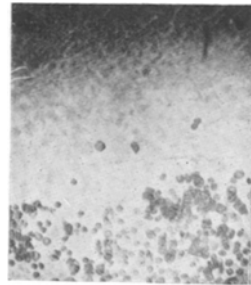


Abb. 2.

stärker in der Kälte deutliche Haufenbildung, die zweifellos von Autoagglutination herrührte (s. Abb. 2).

Aus diesen Untersuchungen können wir nur den Hinweis für die Praxis geben, daß die in der Kälte entstandenen Flecke viel leichter und zuverlässiger zu diagnostizieren sind als die in der Wärme entstandenen. Dieser Unterschied könnte daher einen gewissen Anhaltspunkt für die immer schwer zu beantwortende Frage nach dem Alter des Flecks in bezug auf die Jahreszeit (Winter oder Sommer), in der der Fleck entstanden ist, geben.

Ferner hat sich wiederum gezeigt, daß es besonders für warme Flecken, bei denen die Fehlerquellen am stärksten ins Gewicht fallen, wenn irgend möglich, zweckmäßig ist, die Reaktion mit austitrierten Extrakten anstatt direkt mit Blutspuren vorzunehmen. Wenn man allerdings wegen der Kleinheit der Spur gezwungen ist, direkt unter dem Deckglas zu beobachten, so empfiehlt es sich, die Temperaturbedingungen streng zu beachten und die Reaktion jedenfalls nicht unter  $20^{\circ}$  anzustellen.

#### *Zusammenfassung.*

1. Die noch bis etwa  $20^{\circ}$  auftretende Autoagglutination, die die Isoagglutination stören kann, muß durch geeignete Temperaturverhältnisse ausgeschaltet werden.

a) Testsera müssen zur Blutgruppenbestimmung immer in der Kälte bereitet werden, damit die Autoagglutinine absorbiert werden.

b) In der forensischen individuellen Blutdiagnostik muß man aus denselben Gründen die Extraktion der Flecke immer in Eis vornehmen.

2. Bei der direkten Untersuchung von Blutspuren unter dem Deckglas zeigen in der Kälte und in der Wärme entstandene Flecken deutliche Unterschiede. Warme Flecken, die mehr zu Zweifel Anlaß geben, müssen möglichst nicht unter  $20^{\circ}$  auf Isoagglutination untersucht werden.

---