

(Aus dem Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin der Universität Bonn.  
Direktor: Prof. Dr. *Pietrusky*.)

## Über eingeengte Seren und über andere Untersuchungsmethoden zum Nachweis des schwachen N-Receptors (N<sub>2</sub>) im Blute.

Von  
F. *Pietrusky*.

Daß bei der Faktorengruppe MN der N-Faktor im Blute einmal durch die gewöhnlichen Untersuchungen nicht bzw. nicht mit der erforderlichen Sicherheit nachgewiesen werden kann, ist bekannt. In der Literatur finden sich bisher 2 solche Beobachtungen, was dafür spricht, daß ein solcher schwacher Receptor (N<sub>2</sub>) nur sehr selten vorkommen dürfte. Am hiesigen Institut fand *Crome*<sup>1</sup> bei einer Mutter M ein Kind N. Nachuntersuchungen durch erfahrene andere Sachverständige kamen zu dem gleichen Ergebnis. Nur *Thomsen* gelang es, bei der Mutter ein ganz schwaches N zu finden. Er bemerkte aber, daß dieses bei Unkenntnis der Vorgänge durch die üblichen Untersuchungen sehr wahrscheinlich nicht entdeckt worden wäre. Die zweite Beobachtung ist von *Friedenreich*<sup>2</sup>. Diese ist insofern eine etwas andere, als das schwache N mit besonders guten Gebrauchsseren noch zu erkennen war, mit weniger guten, aber nach damaliger Ansicht noch brauchbaren, dem Nachweis entging.

In der Münch. med. Wschr.<sup>3</sup> habe ich die Herstellung eines *eingeeengten Antiserums* beschrieben, mit dem es gelang, den sehr schwachen N-Receptor im Falle *Crome* einwandfrei zu ermitteln. Auch ergab die Nachuntersuchung des mir in liebenswürdigerweise von *Friedenreich* übersandten Blutes ein deutliches Resultat, wenn auch nicht so stark, wie man erwartete, weil das Blut leicht zersetzt hier ankam.

Bei der Herstellung dieser eingeeengten Seren (E.S.) ging ich von folgender Erwägung aus. Durch die Vorbehandlung der Kaninchen mit ON (ebenso mit OM-Blut) bilden sich in ihrem Blute neben dem Anti-N noch zahlreiche Antikörper gegen Faktoren, die teils unspezifisch, teils spezifisch uns zunächst noch nicht bekannt sind. Durch die Reinigung des Rohserums werden diese Anti-XYZ so stark absorbiert, daß nur noch das Anti-N wirksam bleibt. Wird ein solches reines Gebrauchsantiserum eingeeengt, dann wird nicht nur das Anti-N konzentriert, sondern

<sup>1</sup> *Crome*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **24**, 167 (1935).

<sup>2</sup> *Friedenreich*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **25**, 258 (1936).

<sup>3</sup> *Pietrusky*, Münch. med. Wschr. **1936**, Nr 28, 1123 und *Künkele*, Münch. med. Wschr. **1936**, Nr 37, 1520.

auch die darin noch enthaltenen, stark abgeschwächten Anti-XYZ. Das Serum wird unrein, weil diese unbekannt Antikörper jetzt so stark sind, daß sie agglutinieren. Um das zu verhindern, muß das Gebrauchsserum vor der Einengung *besonders stark* gereinigt werden. Dadurch fällt wohl erheblich der Titer gegen N, es werden aber die Anti-XYZ, die im Verhältnis zum Anti-N ja nur in nicht wirksamer Menge in diesen Gebrauchsseren vorhanden sind, theoretisch jedenfalls ganz absorbiert. Wird das auf diese Weise stark gereinigte Gebrauchsserum eingeengt, dann erhöht sich der Titer von Anti-N, das nur in Spuren vorhandene Anti-XYZ bleibt trotz der Konzentrierung so schwach, daß es praktisch nicht wirksam wird.

Um ein solches Ergebnis zu erreichen, benutzen wir Rohseren, die zur Herstellung von Gebrauchsseren geeignet sind, die eine hohe Titerdifferenz haben. Um die Bildung von etwaigen spezifischen, noch unbekannt Anti-XYZ im Kaninchenblut hintenanzuhalten, werden *Blutgemische* von verschiedenen *frischen* ON-Bluten zur Immunisierung verwandt. Es kann im allgemeinen nicht angenommen werden, daß jeder der N-Blutspender auch mehrere dieser bisher unbekannt Faktoren XYZ hat. Wenn sie in diesem und jenem der N-Blute einzeln oder in Gruppen vorhanden sein mögen, so wird die Bildung von Antistoffen gegen sie, weil das Tier nur verhältnismäßig wenig von ihnen im Vergleich zu N enthält, eine nur geringe sein. Die von uns verwandte Verdünnung der Rohseren vor der Reinigung ist verschieden und muß ausprobiert werden, ist meist eine solche von 1:100, doch auch manchmal von 1:80 oder 1:200.

Zur Absorption werden frische AM-Blutkörperchen benutzt. Die Menge beträgt etwa  $1\frac{1}{4}$  Volumen der Menge der Rohserenverdünnung; also bei 20 ccm Rohserumverdünnung 1:100 wird mit etwa 25 ccm gewaschener, frischer AM-Blutkörperchen absorbiert. Wir verlangen, daß *vor* der Einengung das so gereinigte Antiserum auch nach 1 Stunde keine Agglutination mit verschiedenen M-Bluten gibt. Nach der Einengung auf etwa  $\frac{1}{10}$  Volumen wird es 12 Stunden dialysiert, um den Salzgehalt auszugleichen. Nicht so selten ist das erhaltene E.S. jetzt auch noch nicht rein. Dann wird erneut mit geringer Menge AM-Blut gereinigt. Gefordert wird, daß das E.S. noch nach 20 Minuten mit verschiedenen *frischen* M-Bluten geprüft, auch mikroskopisch keine Agglutination gibt, doch sichere  $N_2$ -Blutkörperchen im Laufe von 5 Minuten zusammenballt. Es kommt hin und wieder vor, daß Hämolyse eintritt. Dann ist entweder das Serum nicht genügend dialysiert oder aber es ist zu warm. Wir haben mehrmals festgestellt, daß diese Hämolyse im Hochsommer bei einer Zimmertemperatur von 25—30° sich einstellte, aber nicht eintrat, wenn wir in einem kühleren Raum von etwa 18—20° die Untersuchungen vornahmen.

Unbedingt erforderlich ist, daß einmal *Kontrollen* mit einem sicheren schwachen N-Blut ( $N_2$ ) gemacht werden und weiter, daß gleichzeitig das eingeengte Serum mit *frisch* entnommenen M-Bluten, und zwar von *verschiedenen* Personen, geprüft wird. Wir haben zunächst geglaubt, daß Kontrollblutkörperchen, die 1 oder 2 Tage alt sind, auch benutzt werden können, daß das eingeengte Serum sich längere Zeit hält. Bei unseren *Reihenuntersuchungen* von etwa 400 M-Bluten auf den schwachen N-Faktor fanden wir 8 Fälle, die uns dringend verdächtig erschienen und die wir für  $N_2$ -Fälle ansahen. Nachuntersuchungen konnten aber nicht in allen Fällen diese Annahme bestätigen. Die Ursache für die Fehlbestimmungen lag darin, daß einmal das eingeengte Serum manchmal schon nach 1—2 Wochen, manchmal erst nach 6 Wochen, unrein, also unbrauchbar wurde. Die Fälle kamen für eine gerichtliche Begutachtung nicht in Betracht. Wir hatten bei diesen *Reihenuntersuchungen* nicht in jedem Falle mit sicherem  $N_2$ -Blut kontrolliert, weil wir die längere Brauchbarkeit des Serums voraussetzten. Andererseits sind die zur Kontrolle benutzten M-Blute nur dann brauchbar, wenn sie *frisch* entnommen sind. Der Titer von M und N fällt sehr rasch. Wir haben Untersuchungen darüber angestellt und solche Blute einmal in Aufschwemmung, dann aber auch in verschlossenen Capillaren im Eisschrank aufbewahrt. Dabei konnten wir feststellen, daß der Titer selbst bei den in Capillaren kühl aufbewahrten Bluten häufig schon innerhalb 3 Tagen auf fast die Hälfte fiel. Es ist klar, daß ein nicht frisch entnommenes M-Blut feinere Unreinheiten in dem eingeengten Serum nicht so anzeigen wird, wie frisches Blut, daß so ein E.S. für rein gehalten wird, das es nicht ist. Ebenso fällt der Titer unseres sicheren  $N_2$ -Blutes nach 24 Stunden nach der Entnahme deutlich, wenn der Nachweis uns auch noch längere Zeit später gelungen ist.

Die Kontrollen mit verschiedenen M-Bluten sind notwendig, um die ja sehr naheliegende Annahme auszuschalten, daß ein *anderer Antikörper*, als das Anti-N die Agglutination bedingt (daß durch die Einengung ein solcher gewonnen werden kann, ist zu vermuten). Wenn das der Fall wäre, dann müßten wir ein positives Resultat *öfter* erhalten als es bisher geschehen ist. Unter den etwa 400 M-Bluten habe wir aber nach einwandfreier Prüfung einen  $N_2$ -Fall festgestellt, der auch mit einem hochwertigen Gebrauchsserum eine geringe Agglutination ergab, also der einer Beobachtung *Friedenreichs* entsprechen würde und einen zweiten Fall, der mit Gebrauchsserum das gleiche Ergebnis zeigte. Leider haben wir diesen nicht nachprüfen können, weil wir das Blut nicht mehr erhalten konnten. Zwei weitere Blute zeigten nach der üblichen Absorption eine etwas größere Abnahme des Titers als gewöhnlich. Sie müssen noch nachgeprüft werden. Vier

verdächtige Fälle, die *ohne* Kontrolle untersucht worden waren, haben sich inzwischen mit dieser Kontrolle *nicht* als N<sub>2</sub> erwiesen. Die Schwierigkeit dieser Untersuchungen liegt nicht zuletzt darin, brauchbare eingeeengte Antiseren bei ihrer schlechten Haltbarkeit vorrätig zu haben.

Absorbiert man das eingeeengte Anti-N-Serum mit je einem N-Blut mehrerer Personen, dann geben die Abgüsse mit anderen N-Bluten ebenso wie mit N<sub>2</sub> *keine* Agglutination. Würde es sich bei dieser nicht um die Anti-N-Wirkung handeln, sondern um eine Anti-XYZ-Wirkung, dann müßten doch wohl einmal diese Antikörper durch die N-Blute der verschiedenen Personen, die wohl kaum alle das XYZ enthalten dürften, im eingeeengten Serum *nicht* absorbiert werden und zur Wirkung kommen. Es kann nicht angenommen werden, daß einer oder mehrere dieser unbekannteten Faktoren wohl in den zur Immunisierung gebrauchten ON-Bluten vorhanden sind und hier zur Bildung der entsprechenden Antistoffe führen, daß sie aber in den zahlreichen hier mit den verschiedenen Abgüssen untersuchten N-Bluten fehlen. Ebenso war eine Agglutination mit M-Blutkörperchen nicht zu erzielen.

Absorbiert man das eingeeengte Anti-N-Serum mit sicherem N<sub>2</sub>-Blut, dann fällt der Titer *deutlich* im Verhältnis zu den Kontrollen mit verschiedenen M-Bluten. Daß das ganze Anti-N durch das schwache N nicht gebunden wird, ist nicht auffallend.

Man wird, wenn man eine Anti-XYZ-Wirkung bei den eingeeengten Seren annimmt, die ja auch im Kaninchenserum selbst liegen kann, erwarten müssen, daß einmal ein *sicheres* N-Blut durch die eingeeengten Seren, die mit N<sub>2</sub> reagieren, *nicht* agglutiniert wird, weil doch schließlich nicht jedes N-Blut einen solchen fremden Faktor enthalten dürfte. Sehr zahlreiche Kontrollen aber haben niemals etwas derartiges ergeben.

Was den Titer des E.S. anbelangt, so gelingt es nur selten, einen solchen von 1:128 zu erhalten. Wesentlich aber ist, daß auch ein hochgradig reines E.S. mit einem viel geringeren Titer (1:32) bei den Prüfungen mit sicherem N<sub>2</sub> ein deutliches Resultat gibt. Wir haben Versuche darüber angestellt, ob es hier nicht besser ist, zur Agglutination nicht die übliche Blutkörperchenaufschwemmung, sondern *reine, zweimal gewaschene Blutkörperchen* (also so gut wie ohne Kochsalzlösung) zu verwenden. Wir gingen dabei so vor, daß wir der bei der üblichen Untersuchung gebrauchten Menge von E.S. so viel reine gewaschene Blutkörperchen zufügten, wie in der sonst gebrauchten Menge der Blutkörperchenaufschwemmung enthalten sind, also sehr wenig. Die Kontrollen mit verschiedenen frischen M-Bluten wurden natürlich in gleicher Weise vorgenommen. So gelang es, mit E.S., die sehr schwach waren, auch noch klare Resultate zu erhalten. Daß bei diesem Vorgehen das E.S. noch reiner als sonst sein muß, weil die Verdünnung durch die

Kochsalzlösung der Blutkörperchenaufschwemmung fehlt, ist selbstverständlich. Wie ich inzwischen von *Mayser* (Stuttgart), dem N<sub>2</sub>-Blut zur Verfügung stand, hörte, hat er mit den eingeengten Seren gute Erfolge. Die Methode der Einengung ist auch brauchbar zur Herstellung hochwertiger Anti-A<sub>1</sub>-Seren, was mir von *Holzer* (Innsbruck) bestätigt wurde. Ebenso haben wir mit ihr früher ein reines Anti-M-Serum erhalten mit einem Titer von etwa 1:2000.

Da die Herstellung eingeengter Anti-N-Seren nicht ganz einfach ist, viel Zeit und wegen der Verwendung frischer Blute zur Reinigung und wegen der geringen Haltbarkeit der Seren auch viel Geld kostet, haben wir versucht, auf andere Weise das schwache N nachzuweisen. Wir gehen dabei so vor, daß wir einem *wenigstens* 10 Minuten absolut reinen Gebrauchsserum mit dem Titer 1:64 so viel reine, zweimal gewaschene Blutkörperchen (also fast ohne Kochsalzlösung bzw. Normosal, das wir jetzt mit Erfolg verwenden) zusetzten, daß die Menge des Antiserums dem etwa 20—30fachen der Blutkörperchenmenge entspricht. Unter ganz gleichen Bedingungen werden Kontrollen mit mehreren verschiedenen *frischen* M-Bluten angesetzt. Dabei geschieht es manchmal, daß auch die Kontrollen eine Agglutination geben, daß also eine unspezifische Reaktion vorliegt. Geht man nun mit der Serummenge herunter, dann wird der Unterschied in der Stärke und der Zeit des Eintretens der Agglutination ein deutlicher, bis die Kontrollen negativ sind und die Verklumpung mit N<sub>2</sub>-Blut deutlich bleibt. Nach unseren bisherigen Untersuchungen trat dabei die unspezifische Reaktion nach etwa 8 Minuten auf, die Agglutination mit N<sub>2</sub> nach 2—3 Minuten. Bei sehr guten Seren haben wir auch brauchbare Ergebnisse erhalten bei Benutzung einer 30—50proz. Blutkörperchenaufschwemmung, der das 4—5fache Volumen des Antiserums zugesetzt wurde. Uns steht zu diesen Untersuchungen der sichere N<sub>2</sub>-Receptor des von *Crome* veröffentlichten Falles zur Verfügung, der den Vorteil hat, daß dieser Faktor besonders schwach bei ihm vorliegt.

Wir haben schließlich noch auf einem dritten Wege versucht, dieses schwache N zu erkennen. Auf hohlgeschliffenen Objektträgern wird die übliche 2proz. Blutkörperchenaufschwemmung zu gleichen Teilen mit einem *wenigstens* 10 Minuten lang absolut reinen Anti-N-Gebrauchsserum 1:64 gut durchmischt, nachdem die Objektträger bei +5° gekühlt worden sind. Darauf werden sie für 1—2 Minuten bei +5° im Eisschrank stehengelassen und anschließend bei Zimmertemperatur hin- und herbewegt. Bei N<sub>2</sub>-Blut tritt dabei sofort eine deutliche Agglutination auf, die immer stärker wird, bei M fehlt sie. Wird die Blutkörperchenaufschwemmung zu lange der Kälte ausgesetzt, dann stellt sich manchmal auch bei M-Blut eine leichte Zusammenballung ein, die aber nach Erwärmen, selbst schon bei Zimmertemperatur schwindet.

*Schwache* Antiseren von *denselben* und *anderen* Rohseren geben *keine* Ballung der Blutkörperchen. Um eine etwaige Heteroagglutination durch das Kaninchenserum infolge der Kälte zu erkennen, haben wir einen Teil der gebrauchten Antiseren vorher mit N absorbiert. Die Abgüsse reagierten aber ebenso *negativ* wie schwache Seren. Wurde das Gebrauchssserum vorher mit M-Blut in der *Kälte* absorbiert, dann behielt es die gleiche Agglutinationsfähigkeit gegen N<sub>2</sub>. Der Titer des N<sub>2</sub> nach 2 Minuten Stehen in der Kälte ist 1:2; bei einer Verdünnung von 1:4 ist nur eine ganz schwache Agglutination kaum noch zu erkennen. Im Reagensglas nach Zentrifugieren gelang der Nachweis des N<sub>2</sub> bei der gewöhnlichen Untersuchung, wenn die Gläser vor Gebrauch *abgekühlt* worden waren. Bei den zahlreichen Kontrollen, die wir mit frischen M-Bluten verschiedener Gruppen und 10 Antiseren vorgenommen haben glauben wir bei diesen Ergebnissen unspezifische, etwa durch die Kälte hervorgerufene Agglutinationen ausschließen zu können. Durch die kurze Zeit einwirkende Kälte wird die Zusammenballung so angeregt, daß es einem starken Gebrauchssserum gelingt, den im Blut sicher vorhandenen, nur sehr schwach ausgeprägten N-Receptor unseres Falles zu erfassen. *Mayser* bestätigte mir die Brauchbarkeit der beiden Methoden zur N<sub>2</sub>-Diagnose, möchte aber die eingengten Anti-N-Seren dabei nicht missen. Ich bin auch der Meinung, daß bei den geringen bisher vorliegenden Erfahrungen alle Wege zur Feststellung des N<sub>2</sub> besritten werden sollen, daß die verschiedenen Untersuchungsmethoden, die auch mit Erfolg kombiniert werden können, sich zu ergänzen haben.

---