

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

## **Das Mengenverhältnis der Absorptionsblutkörperchen zu dem zu absorbierenden Serum als Ausdruck der Receptorstärke.**

**(Eine Methode.)**

Von

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

Mit 1 Textabbildung.

### **Einleitung.**

Der Empfindlichkeitsgrad von Blutkörperchen für die Isoagglutinine Anti-A und Anti-B, also die Ausstattung der Blutkörperchen mit A- und B-Receptoren, läßt sich gegenüber einem gegebenen Serum auf zweierlei Weise prüfen: 1. durch die Bestimmung der schwächsten Serumkonzentration, die noch eine Reaktion gibt, und 2. durch die Bestimmung der geringsten Blutkörperchenmenge, die allen in einem gegebenen Serumvolumen enthaltenen Antistoff zu absorbieren fähig ist (*Thomsen*).

Es ist üblich, die Bindungsfähigkeit von Blutkörperchen durch die Agglutination in der niedrigsten Konzentration einer Verdünnungsreihe zum Ausdruck zu bringen. Hiernach dient der Agglutinations(!)-Titer als Maßstab der Receptorstärke. Da aber das Titrieren eine Methode ist, die eigentlich zur Bestimmung der Zusammenballbarkeit dient, haben wir uns die Aufgabe gestellt, eine Methode auszuarbeiten, in der die *Bindungsfähigkeit* bestimmt wird, und zwar aus der geringsten Blutkörperchenmenge, die allen in einem gegebenen Serumvolumen enthaltenen Antistoff zu absorbieren fähig ist. Unsere Methode stellt also die von *Thomsen* dargelegte zweite Möglichkeit der Bestimmung des Empfindlichkeitsgrades bzw. der Receptorausstattung dar.

### **I. Methodik.**

Das Messen dieser geringsten Blutkörperchenmenge wird in dem von uns geübten Verfahren nach dem Hämatokritprinzip vorgenommen, d. h. die Absorptionsblutkörperchen werden als Sediment (Zentrifugat) im Verhältnis zu einem bestimmten Testserum gemessen. Dieses ist insofern bestimmt, als es (zu Vergleichszwecken) stets von ein und derselben Person stammen muß.

Beim Zusatz der Absorptionsblutkörperchen ist eine sog. optimale Einstellung zu dem zu absorbierenden Serum anzustreben, d. h. es werden *nur soviel* Blutkörperchen zugesetzt, als erforderlich sind, das Serum gerade zu „erschöpfen“. Da diese Menge von vornherein nicht genau

feststeht, wird eine *Reihe* von Proben mit verschiedenen Absorptionsblutkörperchenmengen angelegt, wobei in einigen dieser Proben eine nicht ausreichende, in einer eine ausreichende und in den anderen eine überschüssige Menge zugesetzt ist. Bei der Probe, bei der die *gerade ausreichende Menge* zugesetzt worden war, liegt die optimale Einstellung.

Wenn beispielsweise die zur Absorption erforderliche Blutkörperchensedimentmenge etwa 20% der Menge (des Volumens) des Testserums ausmacht, so werden diesem, das in 3 Capillarröhrchen vorgelegt worden ist, an Blutkörperchen in dem einen Röhrchen 20%, in dem anderen 15% und im dritten 25% zugesetzt.

Im Anschluß an die Absorption wird eine *qualitative* Auswertung vorgenommen. Tritt hierbei eine Zusammenballung der Testblutkörperchen bei demjenigen Röhrchen (Serum) ein, bei welchem an Blutkörperchen 20% zugesetzt worden waren, während bei dem Röhrchen, bei dem an Blutkörperchen 25% zugesetzt worden waren, eine Zusammenballung ausbleibt, so bedeutet das, daß der Grenzzustand (=optimale Einstellung) zwischen den Blutkörperchensedimentmengen von 20% und 25% liegt, also etwas über 20% — um beim Beispiel zu bleiben. Durch Anlegen einer neuen Absorptionsreihe innerhalb dieser Mengen von 20 und 25% kann eine weitere Einengung des Grenzwertes erreicht werden.

Das Sediment wird in *Capillarröhrchen* angelegt, und zwar, um die Menge der Blutkörperchen an der Höhe des Sedimentes *meßbar* zu machen.

## II. Technik.

### A. Das Absorbieren.

#### 1. Das Anlegen eines Ausgangsblutkörperchensedimentes.

Das Blut wird bei der Entnahme in Capillarröhrchen<sup>1</sup> (10 cm lang, dünnwandig,  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  mm weit) aufgefangen. Das Entnahmeröhrchen ist vorher mit einem gerinnungsverhütenden Mittel, z. B. mit 5proz. „Liquoid La Roche“ zu beschicken, und zwar geschieht das dadurch, daß das Capillarröhrchen hiermit durchspült wird und daß in dem Capillarröhrchen eine Liquoidmenge zurückgelassen wird, die ungefähr eine Säulenlänge von 1 cm einnimmt.

Das Capillarröhrchen wird an den heraustretenden Bluttröpfen herangehalten, und zwar mit dem Ende, an welchem sich das vorgelegte gerinnungsverhütende Mittel befindet. Während der Blutentnahme ist der Inhalt mehrmals zum Hin- und Herfließen zu bringen, damit das Blut ausgiebig mit dem Liquoid durchmischt wird.

Bei eingesandtem, d. W. Blut wird das Sediment von einer Aufschwemmung hergestellt (s. Abb. [I]).

Das Capillarröhrchen wird an dem beim Blutauffangen unbenetzt gebliebenen Ende, von welchem die eingedrungene Blutsäule etwa 1 cm entfernt bleiben muß, über der Sparflamme eines Bunsenbrenners zugeschmolzen. Das geschieht, um

<sup>1</sup> Zu beziehen bei Firma Max Kühn, Stützerbach (Thür.).

das Blut in demselben Capillarröhrchen zu zentrifugieren, in dem es aufgefangen wurde.

Bei einem Zentrifugieren mit einer Tourenzahl von 3000 und einer Dauer von 15—20 Minuten ist eine annähernd gleichmäßige Dichte in der Anhäufung der Blutkörperchen innerhalb des Sediments erreicht. Die Gleichmäßigkeit dieser Dichte ist die Voraussetzung für die Meßbarkeit der Blutkörperchenmenge beim Zusetzen zum Serum (s. Abb. [2]).

## 2. Das Vorlegen des zu absorbierenden Testserums.

Dieses Serum, das, wie betont, als Testserum stets von ein und derselben Person stammen muß, wird in einem Capillarröhrchen vorgelegt, d. h. es werden soviel Capillarröhrchen mit Testserum beschickt — in der Regel genügen 3 bis 5 Röhrchen — als Absorptionsstufen angelegt werden sollen.

Wieviel Serum vorgelegt werden soll, das ist an jedem einzelnen Capillarröhrchen vorher festzulegen. Da das Capillarröhrchen nicht über die halbe Länge hinaus angefüllt werden soll, weil sonst später die Mischbarkeit von Serum und Blutkörperchen beeinträchtigt wird, wird in jedem Röhrchen eine Serummenge vorgelegt, die einschließlich der zuzufügenden Blutkörperchenmenge ungefähr die Hälfte des Röhrchens einnimmt (s. Abb. [4]).

Das Capillarröhrchen wird an einem mit Millimeterstrichen graduierten Maßstab herangehalten oder auf einen Bogen Millimeterpapier aufgelegt und der Punkt, bis zu dem das Serum aufgezogen werden soll, am Capillarröhrchen (mit Tinte) markiert. Es wird also beispielsweise bei einem Blutkörperchensedimentzusatz in der Menge von 10% bei einem 10 cm langen Capillarröhrchen der Punkt von 40 mm und derjenigen von 44 mm markiert. Dieser zweite Punkt ist derjenige, bis zu dem sich beim nachfolgenden Zusatz der Blutkörperchen das Ende der Serumsäule zu verschieben hat. Bei einem Zusatz von Blutkörperchen in der Menge von 20% werden die Punkte von 40 mm und von 48 mm markiert.

Nachdem nun diese Markierungen vorgenommen sind, wird das zu absorbierende Serum bis zu dem ersten Punkt, dem 40 bzw. 35 mm-Punkt, aufgezogen (= vorgelegt).

## 3. Das Zusetzen der Absorptionsblutkörperchen zum Absorptions-Testserum.

Alsdann werden Blutkörperchen vom vorher angefertigten Ausgangssediment (Zentrifugat) aus dem einen Capillarröhrchen zu dem (in einem anderen Capillarröhrchen) vorgelegten Serum hinzugefügt. Hierzu wird am Ausgangssediment einerseits der darüberstehende Serumanteil entfernt (abgefeilt), andererseits das zugeschmolzene Endstück, über dem sich das Blutkörperchensediment befindet (s. Abb. [3]). Das Sediment ist, obgleich es sich lediglich aus Blutkörperchen zusammensetzt, durch Aneinanderhalten der beiden Capillarröhrchen und bei leichter Neigung ohne weiteres zum Herüberfließen<sup>1</sup> zu bringen, denn der Flüssigkeitsgehalt der Blutkörperchen selbst ist ein so beträchtlicher, daß das Blutkörperchensediment als Ganzes eine flüssige Masse darstellt (s. Abb. [4]).

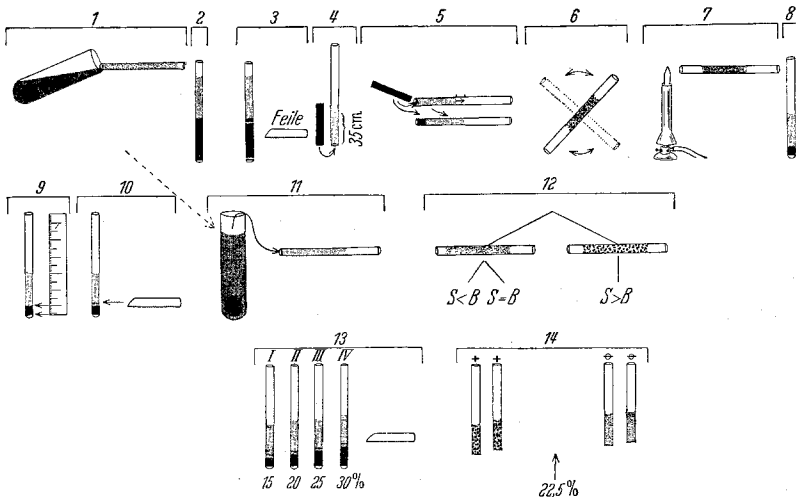
Während die Blutkörperchen an einem Ende der Serumsäule zugesetzt werden, wird das andere Ende der Serumsäule genau ins Auge gefaßt und die Verschiebung dieses Endes vom ersten Punkt aus, dem 40 mm-Punkt, bis zu dem anderen (markierten) Punkte verfolgt. Sowie dieser erreicht ist, wird das Zusetzen von Blutkörperchen abgebrochen (s. Abb. [5]).

<sup>1</sup> Voraussetzung ist, daß die Capillarröhrchen dünnwandig und damit relativ weit in ihrer Lichtung sind. Bei dickwandigen (= enges Lumen) stößt das Herüberfließenlassen auf Schwierigkeiten.

#### 4. Die Absorption.

Mit dem Moment, wo nach Zusatz der Blutkörperchen eine Agglutination eintritt, setzt auch eine Absorption ein. Da nun die Serumsäule und die Blutkörperchensäule zunächst nur eine ganz geringe Berührungsfläche haben, ist der Inhalt des Röhrchens zur Durchmischung mehrmals zum Hin- und Herfließen zu bringen (s. Abb. [6]). Hierbei ist besonders darauf zu achten, daß nichts vom Inhalt aus dem Capillarröhrchen herausfließt, denn dann ist eine quantitative Bestimmung nicht mehr durchführbar. Das Hin- und Herfließenlassen hat also langsam zu erfolgen, ohne daß dabei der Inhalt (die Säule) die Öffnungen des Capillarröhrchens erreicht.

Das Absorbieren ist bei Zimmertemperatur 10—15 Minuten lang fortzusetzen. Diese Zeitpunkte sind unter der Voraussetzung gewählt, daß der Absorptionsvorgang abgeschlossen ist, wenn der Agglutinationsvorgang beendet ist.



- 1 = Anfüllen eines Capillarröhrchens mit Blutkörperchen zum Anlegen des Ausgangssedimentes.
- 2 = An einem Ende zugeschmolzenes Capillarröhrchen mit Ausgangssediment und darüber abgeschiedenem Serum.
- 3 = Abfeilen dieses Serumanteiles und des zugeschmolzenen Endes.
- 4 = Übertragen des Sedimentes aus dem Capillarröhrchenteilstück in ein neues Capillarröhrchen, in welchem das Testserum vorgelegt ist.
- 5 = Markierung der Punkte, um welche sich die Testserumsäule beim Zusatz des Sedimentes verschieben soll.
- 6 = Mischen des Testserum-Absorptionsblutkörperchen-Gemisches durch Hin- und Herfließenlassen im Capillarröhrchen.
- 7 = Zuschmelzen einer Capillarröhrchenöffnung nach Abschluß der Absorption.
- 8 = Zentrifugieren, wobei sich die Absorptionsblutkörperchen als Sediment abscheiden.
- 9 = Ausmessen der Länge dieses Blutkörperchensedimentes durch Heranhalten eines Maßstabes.
- 10 = Abfeilen des Serums vom Sediment.
- 11 = Zusatz von Testblutkörperchen zu dem auszuwertenden Serum aus der Venüle, aus der das Ausgangsmaterial entnommen wurde, ev. unter Zuhilfenahme eines anderen Capillarröhrchens.
- 12 = Die beiden Möglichkeiten des Reaktionsausfalles bei der qualitativen Auswertung: ausbleibende, wenn genügend (=) bzw. überschüssig (<) Blutkörperchen zugesetzt wurden und eintretende Agglutination, wenn das Serum (>) überschüssig war.
- 13 = Anlegen einer Absorptionsreihe mit verschiedenen Absorptionsblutkörperchenmengen. (Übersicht von 1—12.)
- 14 = Auswerten dieser Reihe.

## B. Das Auswerten.

### 1. Das Messen.

#### a) Das Ausmessen der Säulenlänge des Sedimentes.

Nach vollendeter Absorption, d. h. etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde nach Zusatz der Blutkörperchen, wird die eine Öffnung des Capillarröhrchens zugeschmolzen (s. Abb. [7]) und der Inhalt 10 Minuten zentrifugiert. Hierbei nehmen die Blutkörperchen innerhalb des Sedimentes (s. Abb. [8]) ein lackfarbened Aussehen an, was jedoch nicht bedeutet, daß eine Hämolyse eingetreten ist, sondern daß die Blutkörperchen sozusagen lückenlos aneinanderliegen.

Nach Abschluß des Zentrifugierens wird die Länge der Blutkörperchensäule nochmals[!] bestimmt (s. Abb. [9]), denn sie kann unter Umständen — verglichen mit dem Ausgangsmaß — jetzt verkürzt erscheinen. Beim Zentrifugieren (zur Herstellung eines Ausgangssedimentes) (s. Abb. [2]) ist nämlich die Dichte der Blutkörperchen in der Sedimentsäule nicht in ihrer ganzen Ausdehnung die gleiche, denn an der Basis (Boden) des Sedimentes liegen die Blutkörperchen dichter zusammen (infolge größeren Abstandes von der Zentrifugenachse), als an dem entgegengesetzten Ende des Sedimentes, da hier noch Spuren von Serum enthalten geblieben sein können. Werden nun Blutkörperchen von der Basis zugesetzt, so ist die Länge der Blutkörperchensäule nach dem Zentrifugieren die gleiche wie vor dem Zentrifugieren. Werden dagegen Blutkörperchen von einer höheren Schicht zugesetzt, so kann es vorkommen, daß mit den Blutkörperchen auch geringe Mengen von Serum zugesetzt werden. Wird nun nach dem Absorbieren der Inhalt des Capillarröhrchens zentrifugiert, so gelangt die Absorptionsblutkörperchensäule jetzt in einen anderen (weiteren) Abstand von der Zentrifugenachse als ursprünglich, d. h. als beim Anlegen des Ausgangssedimentes. Die Blutkörperchensäule nimmt nun unter dem höheren Schleuderdrucke eine geringere Ausdehnung (Länge) ein als zuvor (vgl. in Abb. [2] u. [8]) und das zwischen ihnen noch enthalten gewesene Serum wird jetzt aus der Sedimentsäule in das vorgelegte Testserum ausgetrieben. Dieses erfährt dadurch eine scheinbare Verlängerung seiner Säule. Hierbei handelt es sich aber nur um relative Veränderungen innerhalb der Säule, die in ihrer Gesamtlänge unverändert bleibt.

Zur Vermeidung von Fehlbestimmungen ist also die Länge der Serumsäulen *vor* dem Zentrifugieren und die der *Blutkörperchensäulen nach* dem Zentrifugieren endgültig, d. h. nochmals zu bestimmen (s. Abb. [9]), da bei der vorläufigen Bestimmung (vor dem Zentrifugieren) nicht genau genug bemessen werden kann, welche Menge von Blutkörperchen tatsächlich hinzugesetzt worden ist (s. Abb. [5]).

Das Ausmessen der Säulenlänge des Blutkörperchensedimentes erfolgt durch Anlegen des Capillarröhrchens an einen mit Millimeterstrichen

graduierten Maßstab (bzw. Millimeterpapier) (s. Abb. [9]), wie das Ausmessen beim Vorlegen des Serums, dessen Säulenlänge jetzt nicht wieder ausgemessen zu werden braucht, da diese ja von dem Vorlegen her bekannt (= 40 bzw. 35 mm) ist.

Die ursprünglich angelegten Markierungspunkte (s. Abb. [4] u. [5]) gelten nun nicht mehr, da durch das Zuschmelzen der Capillarröhrchenöffnung das Capillarröhrchen eine Verkürzung erfahren hat und der Inhalt des Capillarröhrchens dadurch gegenüber den Markierungspunkten verschoben erscheint.

**b) Die Bestimmung des Mengenverhältnisses von Absorptionsblutkörperchen zum Absorptionsserum.**

Hierzu werden die Längenmaße (= Säulenlängen in Millimeter) zueinander in Relation gebracht, und zwar ohne Errechnung des Volumens. Die Länge der Blutkörperchensäule wird auf die Länge der Serumsäule bezogen und das prozentuale Verhältnis bestimmt.

Dieser ermittelte Verhältniswert hat aber nur in bezug auf ein ganz bestimmtes Testserum seine Geltung. Das wird durch eine besondere Schreibweise zum Ausdruck gebracht.

$$\frac{\text{Dietrich-(Test-)Serum}}{x\text{-Blutkörperchen}} = 25\%.$$

Mit dem Namen Dietrich (45 Jahre alt) ist hier das Serum (Titer 1 : 64) derjenigen Person bezeichnet, die zur Blutgruppe B gehört und ständig das Anti-A-Serum als Testmaterial lieferte. Mit dem „x“ sind die Blutkörperchen (derjenigen Person) bezeichnet, deren Receptorstärke zu bestimmen ist.

Die Zahl 25% besagt, daß eine solche Mindestmenge von Blutkörperchen der Person „x“ erforderlich ist, um — bezogen auf 100 Teile des Dietrich-Serums — dieses zu erschöpfen.

Was nun die Receptorstärke anbetrifft, so stellt sie eigentlich den *reziproken* Wert der errechneten Prozentzahl, in diesem Falle 25%, also 4 dar. Denn die Receptorstärke steht in einem umgekehrten Verhältnis zur Menge der Blutkörperchen. Je geringer die Bindungsfähigkeit, desto größer die erforderliche Blutkörperchenmenge und umgekehrt.

*2. Das Auswerten des absorbierten (s. Abb. [10] u. [13]) Serums.*

Dieses wird grundsätzlich nicht quantitativ in der Form des Auswertens in einer Verdünnungsreihe vorgenommen, sondern ausschließlich als ein *qualitatives*.

Die Möglichkeit hierzu ist dadurch gegeben, daß in einer der Absorptionsstufen die optimale Einstellung (hinsichtlich des Mengenverhältnisses der Absorptionsblutkörperchen in bezug auf das zu absor-

bierende Serum) bestand, daß das Serum also titerlos wurde und sich somit eine quantitative Auswertung erübrigt.

Als Testblutkörperchen werden nicht solche irgendeiner beliebigen Person verwandt, sondern *diejenigen Blutkörperchen, deren Receptorstärke bestimmt werden soll*. Es wird also hierzu vom Ausgangsblut (s. Abb. [11]) eine Aufschwemmung hergestellt bzw. direkt vom Ausgangsediment (s. Abb. [2]) eine Blutkörperchensäule in der Länge von  $\frac{1}{2}$  mm als Testblut zugesetzt.

Mit der Verwendung dieser (!) Blutkörperchen als Testmaterial soll die Vollständigkeit der durchgeführten Absorption festgestellt werden. Werden diese Blutkörperchen durch das absorbierte Serum nicht mehr zusammengeballt<sup>1</sup>, so ist dieses (!) Serum in bezug auf diese (!) Blutkörperchen agglutininfrei geworden. Das ist der Fall in denjenigen Stufen, in denen überschüssige und in denen ausreichende Blutkörperchenmengen zugesetzt worden waren (s. Abb. [12]). In denjenigen Stufen, in denen zur Absorption nicht ausreichende Mengen von Blutkörperchen verwandt worden waren, tritt eine Agglutination ein. Die optimale Einstellung (geringste ausreichende Menge) liegt also zwischen der letzten Stufe mit nicht ausreichender und der ersten Stufe mit ausreichender Blutkörperchenmenge (s. Abb. [14]). Der Mittelwert, der sich aus diesen beiden Stufen (an der Grenze von vollständiger<sup>2</sup> und unvollständiger Absorption) ergibt, bringt die Receptorstärke zum Ausdruck.

#### *Zusammenfassung.*

I. Nach dem von uns geübten Verfahren wird die Agglutininbindungsfähigkeit von Blutkörperchen durch die *Menge der Absorptionsblutkörperchen* bestimmt, und zwar durch diejenige (geringste!) Menge, die zur Absorption der Antistoffe einer bestimmten Testserummenge gerade eine ausreichende ist.

II. Dieses Ausreichen wird durch Anlegen einer Reihe von Stufen mit verschiedenen Blutkörperchenmengen bei gleichbleibender Serummenge ermittelt.

III. Gemessen wird die Menge der Blutkörperchen als Sediment (Säulenlänge im Zentrifugat) in Capillarröhrchen (Hämatokritprinzip).

#### **Literaturverzeichnis.**

*Ponsold*, Münch. med. Wschr. **1933**, Nr 41, 1594 — Dtsch. Z. gerichtl. Med. **22**, 46—60; **26**, 303—310; **28**, 248—255. — *Thomsen*, Ukrain. Zbl. Blutgruppenforsch. **4** (1930).

<sup>1</sup> Cave Goldrollen!

<sup>2</sup> Daß der Absorptionsvorgang ein asymptotischer (= ein eigentlich unvollständiger) ist, kann hier außer acht gelassen werden.