

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. W. LAVES).

A₁-A₂-Untergruppenbestimmung mittels Antiglobulintest*.

Von

Dr. med. J. JUNGWIRTH.

In der gerichtsmmedizinischen Praxis sind verschiedene Methoden der A-Untergruppenbestimmung in Gebrauch^{1,2}. So erscheint es vielleicht auf den ersten Blick unnötig, auf eine weitere Technik hinzuweisen. Bei Ausschlußfällen ist es jedoch sehr zweckmäßig, den Befund der Erstuntersuchung mit Hilfe anderer Verfahren zu bestätigen. Bei der relativ geringen Häufigkeit der A-Untergruppenausschlüsse dürfte daher die Durchführung der Antiglobulinmethode als Kontrolluntersuchung keine besonderen technischen Schwierigkeiten bereiten.

Mit der Einführung des Antiglobulintestes (A. G.-Test) wurde die Blutgruppenserologie um ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel bereichert. Die ursprünglichen Beschreibungen des Verfahrens finden sich bei MORESCHI³ (1908) und GUEST⁴ (1925). Seine wichtige Bedeutung wurde erst erkannt, als COOMBS, MOURANT und RACE⁵ (1945) zeigten, daß man damit inkomplette (albuminagglutinierende⁶) Rh-Antikörper nachweisen konnte. Seither hat der A. G.-Test eine ausgedehnte Anwendung in der klinischen Blutgruppenserologie gefunden. Manche neuen Blutgruppensysteme, wie z. B. KELL⁷ und DUFFY⁸, konnten erst mit Hilfe dieser empfindlichen Testmethode entdeckt werden, da deren Antikörper weder in Kochsalz-, noch in Proteinmedien Testblutkörperchen agglutinierten.

Nach der Entdeckung des Rh-Systems erkannte man bald, daß es qualitativ verschiedene Arten von Blutgruppenantikörpern gibt (RACE⁹, WIENER¹⁰). BOORMAN und DODD^{11,12} und später WITEBSKY¹³ zeigten, daß die menschlichen Immun-Anti-A- und -B-Antikörper sich ähnlich wie die Rh-Antikörper verhielten. So konnten mittels des Albumintestes inkomplette α - und β -Antikörper von den Isoagglutininen abgegrenzt werden. Die inkompletten Antikörper konnten weiterhin nach Absättigung der Agglutininfraktion in solche mit negativen und positiven A. G.-Reaktionen unterschieden werden (YOUNG^{14,15}). Seren mit letzteren Eigenschaften, auch Immun-Anti-A-Seren genannt, sind

* Herrn Prof. Dr. KARL REUTER zum 80. Geburtstag gewidmet.

dadurch gekennzeichnet, daß sie unter anderem nach partieller Neutralisation, mit A_1 -Blutkörperchen positive A. G.-Reaktionen liefern, während A_2 -Blutkörperchen negatives Verhalten zeigen. Diese Eigenschaft der Immun-Anti-A-Seren bildet die Grundlage der zu schildernden Untersuchungsmethode.

Die Auffindung eines geeigneten Testserums ist nicht allzu schwierig. Der Verfasser konnte bei Müttern der Blutgruppen 0 und B eine Häufigkeit von etwa 5% feststellen (an über 500 Fällen¹⁶). Folgende Befunde, die auch teilweise fehlen können, sind für solche Seren charakteristisch: Starker Hämolysingehalt, Zonenphänomen, Titererhöhung bei Verwendung von Proteinmedien und positiver Antiglobulintest¹⁷. Seren, welche innerhalb 5—10 min bei Zimmertemperatur A_1 -Blutkörperchen hämolysieren, enthalten erfahrungsgemäß am häufigsten eine brauchbare Immunfraktion¹⁶.

Das zum Test vorgesehene Serum muß erst durch Zugabe von A_1B -Ausscheiderspeichel (oder $A_1 + B$) von Hämolysinen und Agglutininen gereinigt werden (wegen Zubereitung von Speichel siehe DAHR¹, WIENER²). Eine Inaktivierung erübrigt sich, da die Hämolysine schon durch Zusatz relativ geringer Speichelmengen ausgeschaltet werden. Es ist zweckmäßig, die geringste notwendige Speichelmenge zu bestimmen. Zu 1 Volumen Serum gibt man jeweils $\frac{1}{2}$, 1 und 2 Volumina Speichel. An Stelle von Speichel können auch sog. „gereinigte Blutgruppensubstanzen“, wie sie im Ausland erhältlich sind, bei entsprechender Verdünnung verwendet werden. Dasjenige Serum-Speichelgemisch, welches nach 15 min eine 2%ige Kochsalzsuspension von frischen A_1 -Blutkörperchen nicht mehr agglutiniert, zeigt das günstigste Mischungsverhältnis an.

Das abgesättigte Serum wird nun gegen eine Reihe bekannter Blutkörperchen der Typen A_1 , A_2 , A_1B , A_2B und B (letzteres zur Erkennung eines eventuell gleichzeitig vorhandenen Immun-Anti-B) auf seine Eignung geprüft. Zu diesem Zweck werden die Blutkörperchen 1mal gewaschen und aus den Sedimenten eine 30%ige Aufschwemmung hergestellt. Zu je 1 Volumen des abgesättigten Serums gibt man 1 Volumen Aufschwemmung. Die Gemische werden 2 Std bei 37° inkubiert und in Abständen von 20 min geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Blutkörperchen 3mal gewaschen. Den Sedimenten wird so viel Kochsalzlösung zugegeben, daß eine etwa 50%ige Aufschwemmung entsteht. Jeweils 1 Tropfen dieser Aufschwemmungen wird auf einer Milchglasplatte mit einem starken Antiglobulinserum getestet. Ein 2. Tropfen jeder Aufschwemmung wird gleichzeitig mit 1 Tropfen Kochsalzlösung als Kontrolle vermischt. Das Vermischen aller Ansätze soll möglichst gleichzeitig erfolgen, da der zeitliche Reaktionsablauf für die Beurteilung von großer Bedeutung ist.

Die Reaktionen werden jeweils nach 2, 5 und 10 min abgelesen und protokolliert. Folgende Schreibweise, wie sie gegenwärtig am Lister Institut, London, verwendet wird, ist zu empfehlen:

- = negativ
- w = schwach; feinste Agglutinate, gerade noch makroskopisch sichtbar.
- 1 = gleichmäßig ausgebildete, feinkörnige Agglutinate.
- 2 = viele grobkörnige Agglutinate mit freien Blutkörperchen.
- 3 = wenige grobkörnige Schollen ohne freie Blutkörperchen.

Zur Kontrolle des Antiglobulinserums werden alle negativen Reaktionen mit sensibilisierten Blutkörperchen (Kochsalzsuspension Rh-positiver Blutkörperchen, die mit einem inkompletten anti-Rh-Serum 1 Std inkubiert wurden) beschickt.

Ein Immun-Anti-A-Serum ist dann brauchbar, wenn alle A₁ und A₁B-Blute innerhalb von 2—5 min deutliche Agglutination zeigen, die A₂-, A₂B- und B-Blute nach 10 min noch negativ sind. Bei unvollständiger Absättigung des Testserums können die A₂-Blutkörperchen ebenfalls, wenn auch schwächer reagieren¹⁷. Es ist daher sehr wichtig, die für jedes Serum notwendige Speichelmenge genau zu ermitteln. Nach Auffindung eines geeigneten Serums werden die laufenden Untersuchungen neben Verwendung bekannter Kontrollen, wie oben beschrieben durchgeführt.

Zusammenfassung.

Die Eigenschaft menschlicher Immun-Anti-A-Seren, nach entsprechender partieller Neutralisation spezifisch mit A₁-Blutkörperchen zu reagieren, kann mit Hilfe des indirekten Antiglobulintestes zur A-Untergruppenbestimmung herangezogen werden. Der Nachweis erfolgt mittels eines Kaninchen-Anti-Mensch-Globulinserums, welches das von den A₁-Receptoren absorbierte Antikörperglobulin anzeigt. Mit dieser Methode lassen sich die individuellen Unterschiede in der Receptorenstärke verschiedener A₁-Blute deutlich darstellen. Im Gegensatz zum A-Untergruppennachweis mittels des Absättigungsversuchs werden hier die von den A₁-Receptoren absorbierten Antikörper *direkt* nachgewiesen. Wichtigste Voraussetzungen für ein einwandfreies Arbeiten mit dieser Methode sind ein geeignetes Testserum und eine exakte Arbeitsweise. Da die technische Durchführung der Antiglobulinmethode etwas umständlich ist, dürfte ihre Anwendung vor allem den Kontrolluntersuchungen bei Vaterschaftsausschlüssen vorbehalten sein.

Literatur.

- ¹ DAHR, P.: Die Technik der Blutgruppen und Faktorenbestimmung. Leipzig: Georg Thieme 1950. — ² WIENER, A. S.: Blood Groups and Transfusion. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1943. — ³ MORESCHI, C.: Zbl. Bakter. **46**, 49, 456 (1908). ⁴ GUEST, G.: C. r. Soc. Biol. Paris **92**, 1122 (1925). — ⁵ COOMBS, R. R. A., A. E. MOURANT and R. R. RACE: Brit. J. Exper. Path. **26**, 255 (1945). — ⁶ MOLLISON,

P. L., A. E. MOURANT and R. R. RACE: Med. Res. Council, Memorandum No 27. 1952. — ⁷ COOMBS, R. R. A., A. E. MOURANT and R. R. RACE: Lancet 1946 I, 264. — ⁸ CUTBUSH, MARIE, P. L. MOLLISON and M. PARKIN DOROTHY: Nature (Lond.) 165, 188 (1950). — ⁹ RACE, R. R.: Nature (Lond.) 153, 771 (1944). — ¹⁰ WIENER, A. S.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 56, 173 (1944). — ¹¹ BOORMAN, K. E., and B. E. DODD: Nature (Lond.) 158, 589 (1946). — ¹² BOORMAN, K. E., and W. T. J. MORGAN: Nature (Lond.) 156, 663 (1945). — ¹³ WITEBSKY, E.: Blood 3, 66 (1948). — ¹⁴ ERVIN, D. M., R. M. CHRISTIAN and L. E. YOUNG: Blood 5, 553 (1950). — ¹⁵ ERVIN, D. M., and L. E. YOUNG: Blood 5, 61 (1950). — ¹⁶ JUNGWIRTH, J.: In Vorbereitung. — ¹⁷ MOLLISON, P. L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine. Blackwell Scientific Publications Oxford. 1951. — ¹⁸ CRAWFORD, HAL., HELEN FALCONER, MARIE CUTBUSH and P. L. MOLLISON: Lancet 1952, 219.

Dr. med. J. JUNGWIRTH, München,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität.
