

Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. med. HALLERMANN)

Experimentelle Untersuchungen über den Faktor P* mittels natürlicher Anti-P-Heteroseren

Von

A. ILLCHMANN-CHRIST

Mit 5 Textabbildungen

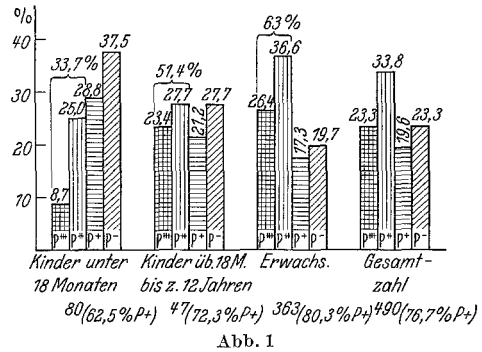
(Eingegangen am 2. November 1956)

Die auch heute immer noch bestehenden Schwierigkeiten der P-Bestimmung haben ihren Grund bekanntlich darin, daß nur selten menschliche oder tierische Normalseren von ausreichendem Titer gefunden werden, daß die vorliegenden Erfahrungen mit Immunsereen die Erwartungen bisher noch nicht erfüllen konnten und daß der Faktor P in ganz verschiedenen Stärkegraden mit fließenden Übergängen von extrem stark zu äußerst schwach ausgeprägten Rezeptoren auftritt, wie schon LANDSTEINER und LEVINE festgestellt hatten, und wie seither immer wieder, zuletzt von SCHMIDT, MANZ und TRAENCKNER, bestätigt worden ist. Um die P-Bestimmung zuverlässiger zu gestalten, d. h. auch sehr schwache, durch relativ niedrig titrige Testseren nicht nachweisbare P-Faktoren sicher erfassen und von p-negativen Bluten abgrenzen zu können, ist bereits von den amerikanischen Autoren MORTON, PICKLES u. a. versucht worden, durch Fermentbehandlung der Blutkörperchen eine Verstärkung der Agglutination zu erzielen, ohne daß dies aber in wesentlichem Ausmaß gelungen wäre. Hingegen hat neuerdings KRAH durch die Fermentierung eine wesentliche Steigerung der Reaktionsfähigkeit erzielt, die er nicht auf eine Verstärkung inkompletter Antikörper, sondern auf eine Herabsetzung der Suspensionsstabilität der Erythrocytenaufschwemmung zurückführt.

Um einen Beitrag zur Klärung dieser Frage und der hier noch bestehenden Divergenzen leisten zu können, wurden systematische Untersuchungen auf breiterer Grundlage durchgeführt, wozu vom Schwein gewonnene Testseren verwandt worden sind. In insgesamt 586 Schweinebluten konnten 15 Seren (2,6%) mit einem Anti-P-Titer von 1:16 und darüber, 3 Blute (0,5%) mit einem Titer von 1:64 und darüber, und nur 1 Serum mit einem Titer von 1:128 festgestellt werden. Die Ausbeute an noch einigermaßen brauchbaren Seren ist also bei weitem nicht so groß gewesen wie die von KRAH und HARTER, die in

* Vortrag, gehalten auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin, vom 1.—3. 10. 56 in Marburg.

5% der Schweineblute einen Anti-P-Titer von 1:16 fanden, wenn auch größer als die von JUNGMICHEL mit nur einem Blut dieses Titers bei 202 Schweinen. Auch wir beobachteten im übrigen wie KRAH und HARTER einen auffallenden Wechsel der Anti-P-Heteroagglutinine in den einzelnen Untersuchungsserien, jedoch — im Gegensatz zu diesen Autoren — keine Bevorzugung der älteren Tiere in bezug auf die Anti-P-Bildung. (Zur Methodik kann hier nur bemerkt werden, daß sich uns nach zahlreichen Vorversuchen eine Absorptionsdauer von 1 Std bei Zimmertemperatur und von anschließend 3 Std im Eisschrank sowie das Austrieren der Abgüsse nach 2stündiger Agglutinationsdauer auf dem Eisschrank, also bei etwa 12°, in hohlgeschliffenen Glasplatten mit nachträglicher Lupenablesung als am zweckmäßigsten erwies, wobei die fertigen Abgüsse selbst schwache P-Receptoren eindeutig erfassen mußten, hingegen auch unter schärfsten Bedingungen nicht mit p-negativen Blutkörperchen aller 4 Blutgruppen reagieren durften.) Die Hauptversuche wurden schließlich nur mit dem Testserum vom Titer 1:128 durchgeführt, nachdem unsere Feststellungen hinsichtlich seiner Spezifität und Titerstärke von Herrn Prof. KRAH liebenswürdigerweise nachgeprüft und bestätigt worden waren.



Die Hauptversuche wurden schließlich nur mit dem Testserum vom Titer 1:128 durchgeführt, nachdem unsere Feststellungen hinsichtlich seiner Spezifität und Titerstärke von Herrn Prof. KRAH liebenswürdigerweise nachgeprüft und bestätigt worden waren.

Es interessierte zunächst die Frage der Häufigkeit des P-Merkmales bei Berücksichtigung seiner verschiedenen Receptorenstärken in verschiedenen Altersstufen, da der P-Faktor nach den Erfahrungen von JUNGMICHEL, HENNINGSEN, ANDRESEN und KRAH im Säuglings- und Kleinkindesalter häufig schwächer ausgeprägt sein soll, während nach DAHR und WIESENER bereits bei der Geburt die Receptorenstärke des P-Faktors endgültig festgelegt sei.

Unter insgesamt 490 Personen mit 76,7% P₊- und 23,3% p₋-Bluten (Abb. 1) fand sich bei 363 Erwachsenen ein Verhältnis von 80,3% (292) P₊-:19,7% (71) p₋-Bluten, wobei die starken Receptoren (mit einem Titer von 1:16 und darüber) und die mittleren (mit einem Titer von 1:4—1:8) mit 63% (229) weit an der Spitze standen, die schwachen Receptoren (mit einem Titer bis 1:2) aber mit 17,3% (63) stark zurücktraten, während bei den 80 Säuglingen und Kleinkindern bis zu 18 Monaten die p₋-Blute mit 37,5% (30) gegenüber den P₊-Bluten mit 62,5% (50) eine deutliche relative Vermehrung, und die P₊-Blute eine Verschiebung

der Receptorenstärke in dem Sinne zeigten, daß die starken und mittleren Receptoren zusammen lediglich 33,7% (27), die schwachen allein aber 28,8% (23) aller Blute ausmachten. Die kleine Gruppe der 47 Kinder zwischen 18 Monaten und 12 Jahren nahm insofern eine Mittelstellung ein, als hier 72,3% (34) P⁺- 27,7% (13) p₋-Bluten gegenüberstanden und die starken sowie mittleren Receptoren 51,4% (24), die schwachen 21,2% (10), also weniger als bei den Erwachsenen, aber mehr als bei den Säuglingen und Kleinkindern betrogen¹.

Es zeigte sich somit nicht nur eine fast doppelt so hohe Prozentzahl der p₋-Blute bei den Säuglingen und Kleinkindern im Vergleich zu den Erwachsenen, sondern auch eine eindeutige Zunahme der starken und mittelstarken, sowie eine Abnahme der schwachen P-Receptoren bei den Erwachsenen im Vergleich zu den Säuglingen und Kleinkindern. Es erscheint sehr naheliegend, dieses Phänomen auf eine Reifung des P-Faktors im Laufe des Individuallebens zurückzuführen und die teilweise recht unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Untersucher hinsichtlich der Häufigkeit und Verteilung des P-Merkmales nicht zuletzt auch durch die jeweils wechselnden Anteile kindlicher, zu Unrecht als p₋-bestimmter Blute zu erklären.

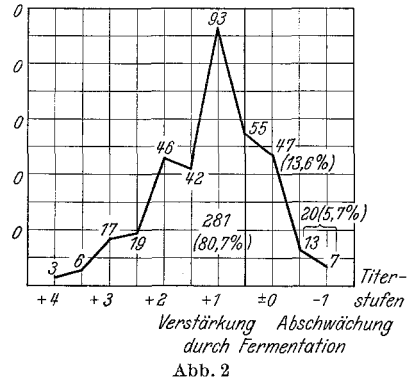
Zur Prüfung der Frage, wieweit die durch diese Situation bedingten Fehlermöglichkeiten durch die Fermentierungsmethode ausgeschaltet oder zumindest vermindert werden könnten, wurden 436 Blute jeweils fermentiert und unfermentiert untersucht, wobei das Serum jeweils bis zur Verdünnung 1 : 250 austitriert worden ist. Dabei verglichen wir in ausgedehnten Voruntersuchungen die von KUHNS und BAILEY mit der von KRAH angegebenen Fermentierungsmethode und konnten nachweisen, daß die amerikanische Methode (bei der nach unseren Feststellungen 1 cm³ Blutkörperchensediment durch 2 mg Papain fermentiert wird) gegenüber der KRAHschen Methode (bei der auf die gleiche Menge Sediment 25 mg Papein einwirken) sehr viel weniger günstige Ergebnisse erzielte, so daß die KRAHsche Methode in den Hauptversuchen allein verwandt wurde.

Unter den 436 Bluten fanden sich 348 (77,3%) P₊- und 88 (22,7%) p₋-Blute. Es zeigte sich zunächst, daß von den 88 p₋-Bluten nach der Fermentierung noch 78 (88,3%) als negativ bestimmt wurden, während 10 Blute (11,7%) dann in der untersten Stufe eine schwache Agglutination erkennen ließen (insofern 4 Blute eine + -, 6 Blute eine ± -Reaktion aufwiesen). Diese unspezifischen Reaktionen konnten dadurch ausgeschaltet werden, daß einmal die fertigen Abgüsse auf

¹ Das Verhältnis der Prozentzahlen sowohl der p₋ und der P₊-Blute als auch der starken sowie der mittleren und schwachen P₊-Receptoren bei den Säuglingen zu dem bei den Erwachsenen liegt gerade außerhalb des dreifachen, deutlich außerhalb des zweifachen mittleren Fehlers.

1/2 oder 1/4 verdünnt wurden, so daß die fermentierten p-Kontrollen nicht mehr reagierten, die fermentierten P-schwachen Blute aber nach wie vor verstärkt wurden; ein anderes Mal dadurch, daß die P-schwachen Blute unter Einschaltung einer p-Kontrolle austitriert wurden. (Eine letzte Entscheidung wurde mit dem Absorptionsversuch möglich, der gleichfalls bei sämtlichen unfermentierten und fermentierten Bluten durchgeführt wurde, auf dessen Ergebnisse hier aber nicht näher eingegangen werden kann.)

Von den 348 unfermentiert als P₊ bestimmten Bluten wurden 281 (80,7%) durch die Fermentation durchschnittlich um 1,41 Stufen verstärkt (Abb. 2), 47 Blute (13,6%) blieben unverändert und 20 Blute (5,7%) wurden sogar abgeschwächt (nämlich 13 um eine halbe, 7 um eine ganze Stufe). Darüber ging die Titerreduktion aber niemals hinaus; sie betraf außerdem praktisch nur starke Receptoren (nämlich 18 unter 20 Bluten) bei nur 2 mittelstarken Receptoren, während umgekehrt eine maximale Titererhöhung um 3 und 4 Stufen lediglich bei schwachen und mittelstarken Receptoren beobachtet wurde. Auch bei den nach der Fermentation in ihrem Titer unverändert gebliebenen 47 Bluten handelte es sich in 26 Fällen um starke, in 18 Fällen um mittelstarke und nur 3mal um schwache P-Receptoren.



Von besonderem Interesse schien weiter die Frage, ob durch die Fermentation auch eine Agglutinationsverstärkung neben der Titersteigerung oder auch ohne eine solche erfolgte. Dazu wurden bei allen 348 P-Bluten die Agglutinationsstärken der unfermentierten und fermentierten Blute bei der Titerstufe 1:4 miteinander verglichen — mit Ausnahme von 25 sehr schwachen P-Bluten, bei denen in dieser Stufe auch nach der Fermentation keine Agglutination mehr aufgetreten war —, so daß 323 Blute übrigblieben. Dabei zeigte sich in 203 Fällen (62,8% von jetzt 323 Bluten) eine Verstärkung der Agglutination — darunter in 77,8% (bei 158 Bluten) bis zu einer, in 22,2% (bei 45 Bluten) über eine Stufe; bei 112 Bluten (34,7%) trat bei dieser Titerstufe auch nach der Fermentation keine Veränderung ein, und nur 8 Blute (2,5%) erlitten eine Abschwächung der Agglutinationsstärke, die aber wieder ausschließlich die starken Receptoren betraf.

Von den 47 Bluten, die nach der Fermentation keine Titererhöhung gezeigt hatten, ließen 25 in der Maximaltiterstufe auch fermentiert

keine qualitative Agglutinationsverstärkung erkennen, während 22 Blute fermentiert eine um $\frac{1}{2}$ Stufe stärkere Agglutination als das gleiche Blut unfermentiert aufwies.

Insgesamt erfolgte also durch die Fermentierung der P-Blute einerseits in etwa $\frac{4}{5}$ aller Fälle (80,7%, 281 Blute) eine Titersteigerung, andererseits in fast $\frac{3}{5}$ der P-Blute (58,3%, 225 Blute) eine Verstärkung der Agglutination, während Titerensenkungen und qualitative Agglutinationsabschwächungen nach der Fermentierung einmal in nur sehr geringer Häufigkeit (in 5,7% Titerensenkungen, in 2,5% Agglutinationsabschwächungen), ein anderes Mal nur bei starken P-Receptoren beobachtet wurden, also keine Quelle der Fehlbeurteilung darstellen konnten.

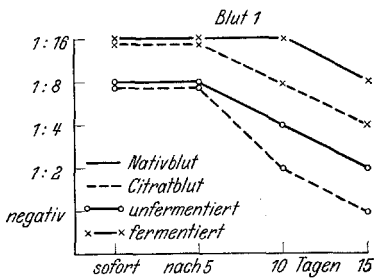


Abb. 3

Schließlich wurden zur Feststellung des Wertes der Fermentierung zur serologischen P-Differenzierung alternierender Blute je 36 P-Blute sofort nach der Entnahme, nach 5, 10 und 15 Tagen im einfachen und fermentierten Agglutinationsversuch als Nativ- und Citratblut geprüft. Dabei ergab sich — wie vorliegendes Beispiel zeigt (Abb. 3) — im unfermentierten Nativ- und Citratblut, im letzteren noch stärker, schon nach

5 Tagen ein deutlicher Titerabfall, wogegen im fermentierten Nativblut erst nach 10 Tagen eine Titerensenkung hervortrat. Im fermentierten Citratblut kam es zwar auch bereits nach 5 Tagen zu einer Titerreduktion, die aber — wegen des hier höheren Ausgangstiters — erst nach 10 Tagen die Titerhöhe des 5 Tage alten unfermentierten Blutes erreicht hatte.

Mit geringen Unterschieden im einzelnen konnte dieses Verhalten auch bei den anderen Bluten beobachtet werden. Ganz allgemein ergab sich (Abb. 4), daß nach 10 Tagen in den weitaus meisten unfermentierten Bluten, nämlich bei 28, eine Verminderung der P-Agglutinabilität bestand, und zwar im Nativblut in 23 Fällen um 1, in 5 Fällen um 2 Stufen, im Citratblut sogar in 18 Fällen um 2 und in 4 Fällen um 3 Stufen, so daß dann sichere P-Blute ohne Fermentierung als p_- bestimmt wurden. Dagegen erfolgte nach der Fermentierung nach 10 Tagen im Nativblut jetzt umgekehrt in den weitaus meisten Fällen, nämlich bei 22 Bluten, keine Titerveränderung und nur in 12 Fällen eine Titerreduktion um 1, in 2 Fällen um 2 Stufen. Im fermentierten Citratblut hingegen war nach 10 Tagen bereits in 18 Fällen eine Titerabnahme um 1, in 8 Fällen um 2 Stufen nachzuweisen.

Nach 15 Tagen (Abb. 5) schließlich war zwar die Zahl der in ihrem Titer unveränderten unfermentierten Blute mit je 8 gleichgeblieben; die Titerreduktionen zeigten jetzt aber erheblich größere Ausmaße, insofern

im Nativblut von 28 Bluten 5 Blute eine Titerabschwächung um 1, 17 um 2, 16 Blute um 3 Stufen aufwiesen und im Citratblut diese Verschiebung noch deutlicher wurde. Dagegen waren in den fermentierten Nativbluten nur in 12 Fällen Titerreduktionen um 2 und in 3 Fällen um 3 Stufen nachzuweisen. In den fermentierten Citratbluten hatte sich die Titersenkung um 2 und mehr Stufen auf insgesamt 22 Fälle erhöht, entsprach also in ihrem Ausmaß etwa den Verhältnissen bei den unfermentierten Nativbluten.

Auch nach 15tägigem Altern der Blute konnte durch die Fermentierung immer eine Fehlbestimmung auch schwacher P-Receptoren als

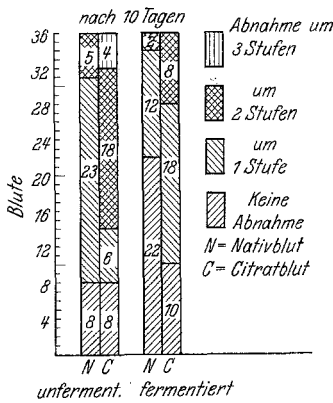


Abb. 4

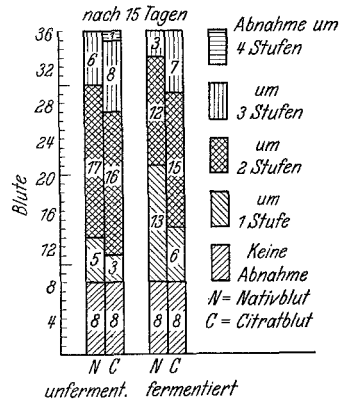


Abb. 5

p₋-Blute verhindert werden. Schließlich erwies sich der im eigenen Serum gehaltene Blutkuchen als wesentlich haltbarer, im besonderen als für die P-Bestimmung brauchbarer als der in Citratlösung aufbewahrte.

Die Fermentierung bedeutet also offensichtlich eine geeignete Methode zur Entscheidung unklarer Fälle; d. h. einmal zur Feststellung schwacher P-Receptoren und zur Sicherung der p-Proben, ein anderes Mal zur Untersuchung älterer und dadurch in ihrer Agglutinabilität geschwächer P-Blute. Wenn die Methode auch auf Grund ihrer diffizilen und zeitraubenden Technik im Routinebetrieb kaum zu verwenden sein wird, so sollte sie doch in den Fällen, in denen von dem Ergebnis der P-Bestimmung ein Vaterschaftsausschluß abhängt (neben dem Absorptionsversuch) unter Berücksichtigung der erforderlichen methodischen Bedingungen herangezogen werden; zu diesen gehört vor allem auch die Entfernung der artspezifischen Heteroagglutinine aus den Schweineseren bzw. etwaiger unspezifischer Kälteagglutinine aus den Humanseren durch größere Mengen p₋-Blute und die Spezifitätsprüfung der Abgüsse mit fermentierten p₋-Blutkörperchen.

Literatur

ANDRESEN, P. H.: Untersuchungen über das Blutgruppensystem P. bestimmt durch ein kräftiges Isoagglutinin. *Z. Immunforsch.* **100**, 429 (1941). — DAHR, P.: Erblichkeitsuntersuchungen über den Blutfaktor P an Familien und Zwillingen. *Z. Immunforsch.* **97**, 168 (1939). — DAHR, P., u. E. H. WIESENER: Der erbliche Blutfaktor P bei Neugeborenen. *Münch. med. Wschr.* **1940**, 527. — HENNINGSEN, K.: *Acta path. scand.* (Københ.) **26**, 639, 769 (1949). — JUNGMICHEL, G.: Der Blutfaktor P. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **36**, 259 (1942). — KRAH, E.: Verstärkung der Reaktionsfähigkeit des Blutgruppenmerkmals P durch Fermentbehandlung der Blutkörperchen. *Klin. Wschr.* **1952**, Nr 39/40, 953. — KRAH, E., u. F. HARTER: Über Erfahrungen bei der Gewinnung tierischer P-Antisera. *Z. Immunforsch.* **108**, 370 (1951). — KUHN, and BAILEY: *Amer. J. Clin. Path.* **20**, 1067 (1950). — LANDSTEINER, K., and LEVINE: *J. of Exper. Med.* **47**, 757 (1928). — MORTON, and PICKLES: *Nature* (Lond.) **159**, 779 (1947). — *J. Clin. Path.* **4**, 189 (1951). — PICKLES: *Nature* (Lond.) **158**, 880 (1946). — SCHMIDT, O., R. MANZ u. K. H. TRÄENCKNER: Serologische Untersuchungen bei Zwillingen mit besonderer Berücksichtigung der Rh-Untergruppen sowie des Faktors P, seiner Receptorenstärke und der Ausscheidereigenschaft. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **40**, 197 (1951).

Prof. Dr. ILLCHMANN-CHRIST, Kiel, Hospitalstr. 42
