

Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit im System ABO aus histologischem Material

I. Histologische Präparate der seziierten Fälle

VL. SLAVÍK und FR. MELUZÍN

Pathologisch-anatomische Abteilung des Bezirks-Gesundheits-Institutes Blansko mit dem Sitz in Boskovice und Bezirks-Transfusions-Abteilung des Bezirks-Gesundheits-Institutes Blansko mit dem Sitz in Boskovice (ČSSR)

Eingegangen am 19. Oktober 1971

Determination of the Group Specificity in the System ABO from Histologic Material

I. Histologic Preparations of Dissections

Summary. A method for the determination of group specificity in the ABO system in histologic sections is described. The method is analogous to that previously described by Landsteiner and Miller who used elution of antibody from whole erythrocytes. In the present study results of tissue examinations correlated with control blood samples in all (103) cases tested.

478 tissue blocks from 6 different parenchymatous organs were tested for their suitability for determination of group specificity. The most suitable organs appear to be the spleen and kidneys, then the heart, lungs and liver. The brain is not suitable. A better agglutination was achieved by anti-B than by anti-A serum, regardless of the organ used.

Out of 10 histologic techniques for the determination of the group specificity, the following methods are recommended: hematoxylin-eosin, van Gieson's, orceine-staining of elastic tissues, carmine stain for glycogen as outlined by Best and Bodian's impregnation. The periodic acid-Schiff method, reticulum-impregnation after Gomori, Masson's green trichrom-staining — Goldner's modification and methods requiring mounting in gelatine were not found to be suitable.

Elution and absorption methods are compared and advantages of the described elution method are discussed with regard to its reliability and accuracy. The reasons for failure due to unsuitability of some methods are discussed.

Zusammenfassung. Die Autoren beschreiben ein Verfahren zur Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit im System ABO aus histologischen Präparaten, welches eine Analogie zum Verfahren der Elution von Antikörpern aus ungeteilten Erythrocyten nach Landsteiner u. Miller ist. Mit dem beschriebenen Verfahren erzielten sie die Übereinstimmung mit der Kontrolluntersuchung der Blutgruppe bei allen 103 Fällen der Versuchszusammenstellung.

Aus 478 Gewebelöcken aus 6 Parenchymorganen bestimmten sie als die geeignetsten Organe für die Feststellung der Gruppenangehörigkeit Milz und Niere, weiterhin Herz, Lungen und Leber, das Hirn ist ungeeignet. Sie fanden, daß bessere Agglutinationsergebnisse ohne Rücksicht auf das verwendete Organ durch das Serum Anti-B gegenüber dem Serum Anti-A erzielt wurden.

Unter 10 histologischen Verfahren zur Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit bewiesen sich als geeignetste Färbemethoden: Hämatoxylin-Eosin, van Gieson, Darstellung der Elastica mit Orcein, Glykogen nach Best und Imprägnierung nach Bodian. Dagegen haben sie folgende Methoden als ungeeignet festgestellt: die Reaktion PAS, die Imprägnierung des Reticulum nach Gomori, Schleimfärbung mit Mucikarmin, Massons grünes Trichrom in Modifikation nach Goldner und Methoden, welche Montage der Präparate in Gelatine erfordern.

Die Autoren vergleichen in der Diskussion die eigene Methode mit dem Absorptionsverfahren im Hinblick auf Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit und verweisen auf die Vorteile

des Elutionsverfahrens nach diesen beiden Richtungen hin. Sie diskutieren auch die Ursachen von Mißerfolgen bei histologischen, nachweisbar ungeeigneten Methoden.

Key words: Blutgruppen — AB0-Blutgruppen, Bestimmung aus histologischen Präparaten.

Im Verlaufe von Untersuchungen tritt ab und zu die Notwendigkeit auf, die Gruppenzugehörigkeit des Verschiedenen zu kennen, wenn sie nicht vor dem Begräbnis, resp. vor der Einäscherung, ermittelt wurde. Mit dem Gedanken, in solchen Fällen den Nachweis der Blutgruppe aus histologischem Material zu erbringen, haben sich mehrere Autoren befaßt, z. B. die Italiener Pozzato u. Molla [2, 3], die tschechischen Autoren Tesar u. Sobotka [4]; sie alle gaben dem Absorptionsverfahren den Vorzug.

Bei Verwendung der gebräuchlichen diagnostischen Seren und einer erreichbaren Menge histologischen Materials wurden von uns bei der Titration vor und nach der Absorption keine verlässlichen Ergebnisse erzielt, was übrigens mit der Forderung von Tesar u. Sobotka, ausschließlich mit hochwertigen Seren zu arbeiten, übereinstimmte. Aus diesem Grunde gingen wir zur Elution der im voraus an Agglutinogene in histologischen Schnitten gebundenen Agglutinine über. Dieser Arbeitsgang ist eine Analogie zur Methode der Elution von Antikörpern aus ungeteilten Erythrocyten nach Landsteiner u. Miller [1], welche die Tatsache ausnützt, daß die Bindung zwischen Agglutinogenen und Agglutininen durch Wärme gelockert wird. Bei Wertung unseres Verfahrens waren wir bestrebt, Antwort auf drei Fragen zu finden:

1. ob das Elutionsverfahren genügend verlässlich und empfindlich ist,
2. ob für die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit alle Organe gleichermaßen geeignet sind,
3. ob Resultate bei verschiedenen histologischen Verfahren in gleichem Maße verlässlich sind.

Im Verlaufe der Arbeit ergab sich als weitere Frage die Erwägung, ob Serum Anti-A gleich gute Ergebnisse wie Serum Anti-B liefert.

Methodik

Untersucht wurden histologische Präparate im Alter von 1 Tag bis 18 Monaten aus Geweben, die 1—18 Monate vorher in Paraffin eingegossen worden waren. Die einzelnen Schnitte hatten in 80% der Fälle eine Fläche von 0,5 bis 1,0 cm² (die übrigen waren nur um ein wenig kleiner oder größer) und eine Dicke von ungefähr 5 µm (Hirnschnitte um 10 µm herum). Bei Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit wurden verwendet:

Bei den Einzelfällen in Färbung Hämatoxylin-Eosin für jedes Reagensglas je 3 Schnitte von jedem Organ (Hirn, Lunge, Herz, Milz, Leber, Niere — resp. nur von jenen, die bei der Sezierung entnommen wurden).

Bei Bewertung der einzelnen Organe (Färbung Hämatoxylin-Eosin) nur 3—6 Schnitte für jedes Probierglas.

Bei Bewertung der einzelnen histologischen Methoden eine analoge Anzahl Schnitte wie bei der erwähnten Gruppenzugehörigkeitsbestimmung von Einzelfällen in Färbung Hämatoxylin-Eosin.

Verarbeitung der Schnitte

1. Das Deckglas wird durch Eintauchen des Präparates in Xylol, je nach dem Alter des Präparates für die Dauer von 1—2 Std, gelockert, dann wird das Deckglas vorsichtig herunterschoben und der Objektträger mit dem Schnitt wird noch 2—4 min in Xylol belassen.

2. Das Entfärben des Schnittes zum Zwecke des leichteren Ablesens der Agglutination wird zum Großteil durch Eintauchen des Präparates in 96%igen Äthylalkohol für 40 min und nachher für 15 min in 75%igen Äthylalkohol erreicht.

Nach unseren Erfahrungen ist das unerwünschte Auslaugen von Agglutinogenen aus dem Schnittgewebe durch 96%iges Äthanol nicht markanter als bei dem bisher verwendeten 80%igen Äthanol oder bei dem empfohlenen Äther.

3. Die entfärbten Schnitte werden nach Zermalmen mit einem Glasstäbchen vom Objektträger in zwei signierte Agglutinationsprobiergläser übertragen und je 0,2 ml unverdünnten Serums Anti-A resp. Anti-B beigefügt. Die Probiergläser werden 48 Std in Zimmertemperatur belassen.

Wir verwendeten die den tschechoslowakischen Staatsnormen entsprechenden diagnostischen Routineseren, die im Transfusionsdienst verwendet werden, d. h. angemessene Avidität, minimaler Titer 1:32 + + + +, beim Serum Anti-A gegen Erythrocyten A₂ 1:8 + + + +.

4. Die zermalnten Schnitte werden bei Zimmertemperatur in einer sehr großen Menge physiologischer Kochsalzlösung zweimal gewaschen, nachher geschleudert und abgesogen. Daraufhin wird — je nach Anzahl der Schnitte — eine kleine Menge physiologischer Kochsalzlösung, durchschnittlich 0,1 ml, zugegeben.

5. Die Probiergläser werden für 10 min in ein Wasserbad von 56°C getaucht und nachher kurze Zeit in einer vorgewärmten Zentrifuge geschleudert. Die supernatante Lösung wird in andere Probiergläser abgesogen.

Bei einer Temperatur von 56°C gehen die gebundenen Agglutinine in die beigefügte physiologische Kochsalzlösung über. Bei einem Temperaturrückgang binden sie sich neuerdings an die Agglutinogene. Wenn keine vorgewärmte Zentrifuge zur Verfügung steht, ist es nötig, daß die Probiergläser in der Zentrifuge in Wasser von Temperaturhöhe 56°C getaucht werden. Das Absaugen muß ebenfalls sehr schnell vor sich gehen. Eine eventuelle kleine Beimischung von Schnittstückchen ist nicht von Nachteil; beim Ablesen muß jedoch stets auf gute Beleuchtung geachtet werden, damit es nicht zur Verwechslung mit Agglutinaten kommt.

6. Der supernatanten Lösung werden 1—2 Tropfen der 2%igen Blutkörperchenanschwemmung der bekannten Gruppenzugehörigkeit in der physiologischen Kochsalzlösung beigegeben, und zwar zum Supernatanten aus der Untersuchung mit dem Serum Anti-A die Blutkörperchen A, aus der Untersuchung mit dem Serum Anti-B die Blutkörperchen B. Nach einstündiger Inkubation bei Zimmertemperatur wird die Agglutination bei sanftem Beklopfen des Probierglasbodens abgelesen. Das Ergebnis wird nach 24 Std neuerlich kontrolliert.

Bewertung der Agglutination:

- + Feine Anhäufungen von agglutinierten Blutkörperchen, in der Lösung größere Mengen freier Erythrocyten.
- ++ Kleinere Anhäufungen, in der Lösung nur wenige freie Erythrocyten.
- +++ Einige größere Anhäufungen, im übrigen klare Lösung.
- ± Unsichere Ergebnisse (bei Bewertung des Verfahrens, in der Praxis als negativ anzusehen).

Als Kontrolle der Ergebnisse des Verfahrens diente die Feststellung der Gruppenzugehörigkeit durch Bestimmung von sowohl Agglutinogenen als auch Agglutininen aus dem Blut post mortem, soweit die Blutgruppe nicht schon aus klinischen Untersuchungen während der Hospitalisierung bekannt war.

Alle Gruppenbestimmungen aus histologischem Material sind selbstverständlich blind (d. h. ohne vorherige Kenntnis des bei Blutuntersuchung gewonnenen Ergebnisses) durchgeführt worden und wurden mit der aus dem Blut ermittelten Gruppenzugehörigkeit erst bei der Schlußbewertung der Arbeit verglichen.

Bei Verarbeitung von Präparaten, die nach anderen histologischen Methoden gefärbt wurden, haben wir den betreffenden Fällen vollkommen neue Nummern verliehen, um ein „Abschreiben“ aus bereits vorliegenden Laboratoriumsprotokollen auszuschließen.

Versuchszusammenstellung

Die Eigenschaften der untersuchten Zusammenstellung sind in Tabelle 1 und 2 angegeben.

Tabelle 1
Beschreibung einer Sammlung von Fällen nach Geschlecht, Alter und Gruppenzugehörigkeit

D		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Σ	R	R♂	♀
♂	A	1	—	2	1	4	6	8	6	1	—	29	46,8		
	B	—	—	1	—	—	—	3	2	1	—	7	11,3		
	AB	—	—	—	1	2	—	2	1	—	—	6	9,7		
	0	1	—	—	—	1	5	6	6	1	—	20	32,2		
	Σ	2	—	3	2	7	11	19	15	3	—	62	100,0	60,2	
	R	3,2	—	4,8	3,2	11,3	17,8	30,7	24,2	4,8	—	100,0			
♀	A	—	—	—	—	2	—	6	2	2	—	12	29,3		
	B	—	—	—	—	1	2	—	1	1	—	5	12,2		
	AB	—	—	—	—	—	—	6	1	—	1	8	19,5		
	0	1	—	1	1	1	2	7	2	1	—	16	39,0		
	Σ	1	—	1	1	4	4	19	6	4	1	41	100,0	39,8	
	R	2,4	—	2,4	2,4	9,8	9,8	46,3	14,7	9,8	2,4	100,0			
Σ	A	1	—	2	1	6	6	14	8	3	—	41	39,8		
	B	—	—	1	—	1	2	3	3	2	—	12	11,6		
	AB	—	—	—	1	2	—	8	2	—	1	14	13,6		
	0	2	—	1	1	2	7	13	8	2	—	36	35,0		
	Σ	3	—	4	3	11	15	38	21	7	1	103	100,0	100,0	
	R	2,9	—	3,9	2,9	10,7	14,5	36,9	20,4	6,8	1,0	100,0			

D = Alter in Dezennien; R = relative Häufigkeit [%]; R♂ ♀ = relative Häufigkeit nach Geschlecht [%]; Σ = Summe.

Tabelle 2. *Auswahl der Gewebsblöcke nach den einzelnen Organen*

	Cerebrum	Pulmo	Cor	Lien	Hepar	Ren	Σ
N	85	84	67	74	91	77	478
R	17,8	17,6	14,0	15,5	19,0	16,1	100,0

N = Absolute Häufigkeit; R = relative Häufigkeit [%]; Σ = Summe.

Ergebnisse

1. Bei allen 103 untersuchten Fällen wurde eine Übereinstimmung zwischen dem durch oben beschriebenes Elutionsverfahren erzielten Ergebnis und dem Ergebnis der Kontrollblutuntersuchung erreicht, und zwar in 102 Fällen nach einstündiger Inkubation der mit Blutkörperchen der bekannten Gruppenzugehörigkeit vermischten supernatanten Lösung, in einem Falle nach 24stündiger Inkubation (Gruppe AB).

2. Die Agglutinationsstufe bei den einzelnen Organen nach der Gruppenzugehörigkeit führt die Zusammenstellung in Tabelle 3 an. Auf Grund der Bewertung dieser Ergebnisse wurde die Eignung der einzelnen für die Ermittlung der Gruppenzugehörigkeit in Frage kommenden Organe in der Weise bestimmt, daß bei den einzelnen Organen die Agglutinationsstufe sowohl dann gewertet wurde, wenn die Agglutination eintreten, als auch dann, wenn sie nicht eintreten sollte. Die bezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle 4 festgehalten. Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß beim Hirn mit Ausschwemmung der Blutkörperchen A die Agglutination 44mal erwartet wurde (31mal Gruppe A, 13mal Gruppe AB), bei

Tabelle 3. Agglutinationsstufe bei den einzelnen Organen nach Gruppenzugehörigkeit

Syst. ABO	Serum	Agglut.	Cerebrum		Pulmo		Cor		Lien		Hepar		Ren		
			N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	
A	Anti-A	—	3	9,7	—	—	1	4,3	—	—	2	5,9	—	—	
		±	14	45,1	2	6,7	1	4,3	—	—	3	8,8	2	6,4	
		+	13	42,0	16	53,3	17	73,9	18	64,2	22	64,7	15	48,4	
		++	—	—	11	36,7	4	17,5	9	32,2	7	20,6	11	35,5	
		+++	1	3,2	1	3,3	—	—	1	3,6	—	—	3	9,7	
		Σ	31	100,0	30	100,0	23	100,0	28	100,0	34	100,0	31	100,0	
	Anti-B	—	30	96,9	30	100,0	23	100,0	28	100,0	34	100,0	31	100,0	
		±	1	3,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		Σ	31	100,0	30	100,0	23	100,0	28	100,0	34	100,0	31	100,0	
	B	Anti-A	—	10	100,0	9	81,8	8	80,0	8	100,0	12	100,0	9	100,0
			±	—	—	2	18,2	2	20,0	—	—	—	—	—	—
			+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
+++			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Σ			10	100,0	11	100,0	10	100,0	8	100,0	12	100,0	9	100,0	
Anti-B		—	1	10,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		±	4	40,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		+	5	50,0	5	45,5	5	50,0	4	50,0	9	75,0	3	33,3	
		++	—	—	4	36,3	2	20,0	2	25,0	2	16,7	4	44,5	
		+++	—	—	2	18,2	3	30,0	2	25,0	1	8,3	2	22,2	
		Σ	10	100,0	11	100,0	10	100,0	8	100,0	12	100,0	9	100,0	
AB		Anti-A	—	1	7,6	1	7,6	—	—	—	—	1	8,3	—	—
			±	6	46,2	2	15,4	1	9,1	1	8,3	1	8,3	—	—
			+	6	46,2	8	61,6	7	63,6	7	58,3	7	58,3	3	42,9
	++		—	—	2	15,4	2	18,2	3	25,1	2	16,8	3	42,9	
	+++		—	—	—	—	1	9,1	1	8,3	1	8,3	1	14,2	
	Σ		13	100,0	13	100,0	11	100,0	12	100,0	12	100,0	7	100,0	
	Anti-B	—	2	15,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		±	5	38,4	1	7,7	—	—	—	—	2	16,7	—	—	
		±	6	46,2	5	38,4	3	27,3	4	33,3	5	41,7	2	28,6	
		++	—	—	6	46,2	5	45,4	6	50,0	4	33,3	4	57,2	
		+++	—	—	1	7,7	3	27,3	2	16,7	1	8,3	1	14,2	
		Σ	13	100,0	13	100,0	11	100,0	12	100,0	12	100,0	7	100,0	
	0	Anti-A	—	30	96,9	30	100,0	23	100,0	25	96,2	30	90,9	30	100,0
			±	1	3,1	—	—	—	—	1	3,8	3	9,1	—	—
			+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
+++			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Σ			31	100,0	30	100,0	23	100,0	26	100,0	33	100,0	30	100,0	
Anti-B		—	31	100,0	30	100,0	23	100,0	26	100,0	33	100,0	29	96,7	
		±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3,3	
		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		Σ	31	100,0	30	100,0	23	100,0	26	100,0	33	100,0	30	100,0	

N = Absolute Häufigkeit; R = relative Häufigkeit [%]; Σ = Summe; Agglut. = Agglutinationsstufe.

Tabelle 4. Ergebnisse der einzelnen Organe nach der Stufe der erwarteten sowohl positiven als auch negativen Agglutination...

Anti- gen	Serum	Agglut.	Cerebrum		Hepar		Pulmo		Cor		Ren		Lien		
			Σ	R	Σ	R	Σ	R	Σ	R	Σ	R	Σ	R	
+	Anti-A	—	4	9,1	3	6,5	1	2,3	1	2,9	—	—	—	—	
		±	20	45,4	4	8,7	4	9,3	2	5,8	2	5,3	1	2,5	
		+	19	43,2	29	63	24	55,8	24	70,6	18	47,2	25	62,5	
		++	—	—	9	19,6	13	30,3	6	17,8	14	36,9	12	30	
		+++	1	2,3	1	2,2	1	2,3	1	2,9	4	10,6	2	5	
	Σ		44	100	46	100	43	100	34	100	38	100	40	100	
	Anti-B	—		3	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		±		9	39,2	2	8,3	1	4,2	—	—	—	—	—	
		+		11	47,8	14	58,4	10	41,7	8	38,1	5	31,2	8	40
		++		—	—	6	25	10	41,7	7	33,3	8	50	8	40
		+++		—	—	2	8,3	3	12,4	6	28,6	3	18,8	4	20
	Σ		23	100	24	100	24	100	21	100	16	100	20	100	
	Σ	—		7	10,5	3	4,3	1	1,5	1	1,8	—	—	—	—
		±		29	43,3	6	8,7	5	7,5	2	3,6	2	3,7	1	1,7
		+		30	44,7	43	61,5	34	50,7	32	58,3	23	42,6	33	55
++			—	—	15	21,2	23	34,3	13	23,6	22	40,7	20	33,3	
+++			1	1,5	3	4,3	4	6	7	12,7	7	13	6	10	
Σ		67	100	70	100	67	100	55	100	54	100	60	100		
—	Anti-A	—	40	97,6	42	93,3	39	95,1	31	93,9	39	100	33	96,7	
		±	1	2,4	3	6,7	2	4,9	2	6,1	—	—	1	3,3	
		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Σ		41	100	45	100	41	100	33	100	39	100	34	100	
	Anti-B	—		61	98,4	67	100	60	100	46	100	60	98,4	54	100
		±		1	1,6	—	—	—	—	—	—	1	1,6	—	—
		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Σ		62	100	67	100	60	100	46	100	61	100	54	100	
	Σ	—		101	98,1	109	97,3	99	98	77	97,5	99	99	87	98,8
		±		2	1,9	3	2,7	2	2	2	2,5	1	1	1	1,2
		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
++		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
+++		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Σ		103	100	112	100	101	100	79	100	100	100	88	100		

Σ = Summe; R = relative Häufigkeit [%]; Agglut. = Agglutinationsstufe; +, — = erwartete — nichterwartete Agglutination.

Tabelle 5. Bewertung der Ergebnisse nach Serum Anti-A und Anti-B

Anti- gen	Serum												
	Anti-A						Anti-B						Σ
+	9	33	139	54	10	245	3	12	56	39	18	128	
	3,7	13,4	56,8	22	4,1	100	2,3	9,4	43,8	30,5	14	100	R
—	224	9	—	—	—	233	348	2	—	—	—	350	Σ
	96,1	3,9	—	—	—	100	99,4	0,6	—	—	—	100	R
Agglut.	—	±	+	++	+++	Σ	—	±	+	++	+++	Σ	

R = Relative Häufigkeit [%]; Σ = Summe; Agglut. = Agglutinationsstufe; +, — = erwartete — nichterwartete Agglutination.

der Wertung ergab sich jedoch: — 4mal, \pm 20mal, + 19mal und +++ 1mal. Die Agglutination trat also nur 20mal ein (d. i. 45,5%). Dementsprechend wurde mit Ausschwemmung der Blutkörperchen B die Agglutination 23mal erwartet (10mal Gruppe B, 13mal Gruppe AB), sie trat jedoch nur 11mal ein (d. i. 47,8%). Im Gegensatz dazu wurde die Agglutination mit Ausschwemmung der Blutkörperchen A 41mal nicht erwartet (10mal Gruppe B, 31mal Gruppe 0) und ist 40mal nicht eingetreten, 1mal war das Ergebnis ungewiß (\pm); bei der Gesamtbewertung ist die Agglutination also in 100% der Feststellungen nicht eingetreten. Übereinstimmend damit wurde mit Ausschwemmung der Blutkörperchen B die Agglutination 62mal nicht erwartet (31mal Gruppe A, 31mal Gruppe 0) und ist tatsächlich nirgends verzeichnet worden. Insgesamt wurde in 103 Feststellungen (mit Ausschwemmung der Blutkörperchen A oder B) die Agglutination nicht erwartet und ist auch in keiner einzigen eingetreten. In ähnlicher Weise wurden in der Tabelle 4 die Ergebnisse aus den übrigen Organen zusammengestellt.

Die geeignetsten Organe für die Feststellung der Gruppenzugehörigkeit im System AB0 scheinen demzufolge Milz und Niere zu sein, dann Herz, Lunge und Leber. Das Hirn ist ungeeignet.

3. Die Feststellung der Richtigkeit der Ergebnisse bezüglich Serum Anti-A und Serum Anti-B wurde durch Bewertung der Agglutinationsstufe durchgeführt ohne Rücksicht auf das Organ (Tabelle 5). Etwas bessere Ergebnisse liefert das Serum Anti-B (die erwartete Agglutination entstand in 88,3% der Bestimmungen) als das Serum Anti-A (die erwartete Agglutination erfolgte in 82,9% der Bestimmungen). Eine fehlerhafte positive Agglutination wurde weder beim Serum Anti-A noch beim Serum Anti-B ermittelt. Wenn wir aus der Bewertung die aus dem Hirngewebe, welches für die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit offensichtlich nicht geeignet erscheint, gewonnenen Angaben weglassen, ist der Unterschied zwischen der Anzahl der richtigen Ergebnisse 6,1% zugunsten des Serums Anti-B (Serum Anti-A . . . 91,0%, Serum Anti-B . . . 97,1%).

4. Die Eignung der einzelnen histologischen Verfahren wurde an 8 durch die Methode der zufälligen Auslese aus der Grundzusammenstellung gewonnenen Fällen festgestellt (Tabelle 6). Bei Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit im System AB0 können zuverlässige Ergebnisse bei Anwendung der folgenden histologischen Verfahren gewonnen werden: Hämatoxylin-Eosin, van Gieson, Glykogen nach Best, elastische Fasern mit Orcein, Imprägnierung nach Bodian. Dagegen eignen sich für die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit nicht: die Reaktion PAS, Schleim mit Mucikarmin, Massons grünes Trichrom in Modifikation nach Goldner, Imprägnierung des Reticulum nach Gomori und Methoden, welche die Einschließung des Präparates in Gelatine erfordern.

Diskussion

Die Vorteile des beschriebenen Elutionsverfahrens beruhen einerseits in seiner Zuverlässigkeit, andererseits in seiner Empfindlichkeit. Die Gruppenzugehörigkeit ist in allen 103 Fällen richtig festgestellt worden, was im Vergleich zu den Angaben in der zur Verfügung stehenden Literatur ein besseres Ergebnis ist als bei den bisher verwendeten Modifikationen der Absorptionsmethode und bei Verwendung von diagnostischen Routineseren, wie sie im Transfusionsdienst gebräuchlich sind, sowie bei einer wesentlich kleineren Anzahl histologischer Schnitte.

Beim Absorptionsverfahren, selbst dann, wenn sich der zu bewertende Titer-rückgang in den verschiedenen Arbeiten unterscheidet, verweisen alle Autoren auf die Möglichkeit einer unspezifischen Senkung des Titers bis um 2 Stufen. Dagegen kam es in der Zusammenstellung von Pozzato u. Molla, z. B. bei Gruppe AB bei 22 Feststellungen 9mal (d. i. in 40,9%) zu einem spezifischen Sinken nur um 1 oder 2 Stufen. In unserer Zusammenstellung jedoch wurde in 583 Bestimmungen aus den einzelnen Organen bei denen eine Agglutination nicht erwartet wurde, nicht ein einziges Mal ein nicht spezifisches positives Ergebnis verzeichnet.

Verlässliche Resultate erhielten wir schon bei Verwendung von 12 Schnitten (im Gegensatz von 40 Schnitten bei der Absorptionsmethode), jedoch ist es zweckmäßig, diese Anzahl zu erhöhen, insbesondere dann, wenn kein Milz- oder Nierengewebe zur Verfügung steht. Es wurde nämlich versuchsweise bei einem Fall (Gruppe A) ermittelt, daß für den Nachweis der Blutgruppe 6 Schnitte aus Lunge und Leber nicht genügen, da fälschlich die Gruppe 0 herausgekommen ist, während bei Verwendung von Milz- und Nierenschnitten das Ergebnis richtig war. Man kann allerdings die Gruppenzugehörigkeit aus jedem Organ gesondert feststellen und die einzelnen Ergebnisse untereinander vergleichen.

In unsere Zusammenstellung wurden die Organe Hirn, Lunge, Herz, Milz, Leber und Niere inbegriffen, welche bei der Obduktion am häufigsten für histologische Erhebungen entnommen werden. Es wurden daher in die Zusammenstellung Ergebnisse aus Haut und quergestreiften Muskelfasern nicht aufgenommen. Die Gruppenzugehörigkeit wurde weiterhin nicht ermittelt aus Präparaten der Bauchspeicheldrüse und der Wand des Verdauungstraktes, wo sich sehr schnell nach dem Tode die Gewebeatolyse entwickelt, auch wenn gute Ergebnisse aus histologischem *intra vitam* gewonnenem Material erwartet werden können. Aus diesen Gründen ist es nicht möglich, einen Vergleich unserer Zusammenstellung mit der Zusammenstellung der italienischen Autoren, die im Gegensatz zu uns Präparate aus Hirn, Niere und Milz nicht ausgewertet haben, in vollem Umfang durchzuführen. Es ist aber möglich festzustellen, daß ein wesentlicher Unterschied zwischen den aus Leber, Lunge und Myokard gewonnenen Ergebnissen nicht besteht. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die geeignetsten Organe Milz und Nieren sind, wo die erwartete Agglutination nur in 1,7 resp. 3,7% der Excisionen nicht eingetreten ist, obzwar eine minimale Anzahl von Schnitten verwendet wurde, d. s. 3. Dagegen ist das Gewebe des zentralen Nervensystems (53,8% Fehlergebnisse) praktisch unverwendbar, allerdings mit dem Vorbehalt, daß eine größere Anzahl Schnitte verwendet wird.

Das beschriebene Verfahren wurde bereits mit Erfolg bei einem untersuchten Fall angewendet (Gruppe 0, alle angeführten Organe außer Hirn); gleichzeitig wurden zu Kontrollzwecken Präparate einer bekannten Gruppenzugehörigkeit untersucht (mit Absicht Gruppe AB)¹.

Die Eignung der einzelnen histologischen Verfahren ergibt sich aus Tabelle 6. Die Unverwendbarkeit der Reaktion PAS und der Imprägnierung des Reticulum nach Gomori wird offensichtlich durch Oxydationsspaltung der polysacchariden Gruppenagglutinogenkette verursacht, im ersten Verfahren durch Perjodatsäure, im zweiten durch Kaliumpermanganat, da, wie bekannt, durch starke Oxydationreagentien (in der Praxis z. B. durch Na-Perjodat)

1 Fußnote siehe S. 88

die prosthetische Gruppe, gebildet aus einem Polysaccharid mit dem zu bestimmenden Teil, beim A-Antigen N-Acetyl-D-Galaktosamin, beim B-Antigen D-Galaktose, gespalten wird unter gleichzeitiger Entwicklung von Ameisensäure, Formaldehyd und höheren Aldehyden, so daß es so zum Erlöschen der biologischen antigenen Aktivität kommt. Es ist möglich, daß in ähnlicher Weise Mißerfolge bei Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit ABO aus nach Masson oder in der Modifikation nach Goldner gefärbten Präparaten erklärt werden können, da bei diesem Verfahren Farbstoffe verwendet werden (Light green SF oder neuerlich FAST green FCF), welche in ihrer Struktur Gruppen von $-\text{SO}_3$ enthalten.

Fehlerhafte Positivresultate beim Färben von Fettstoffen mit Sudan III entstanden dadurch, daß die Schnitte in Gelatine montiert wurden, welche antigenwirksame Ketten enthält. Das haben wir durch Kontrollserien nachgewiesen, bei denen wir richtige Ergebnisse aus Präparaten gewannen, die bei gleicher Färbung einerseits in Glycerin, andererseits in kanadischen Balsam montiert wurden. Die Feststellungen mit Schnitten, die mit Mucikarmin auf Schleim gefärbt wurden, zeigten eine beträchtlich niedrigere Agglutinationsstufe, vielleicht deshalb, weil das Mucikarmin anscheinend auch Affinität zu den Polysacchariden der Blutgruppe hat und dadurch deren antigene Aktivität blockiert.

Unsere Zusammenstellung von 478 Geweblöcken — gegenüber von 98 Blöcken der italienischen Autoren — gestattete, den Unterschied der Agglutinationsstufe zwischen dem diagnostischen Serum Anti-A und Anti-B zugunsten des Serums Anti-B zu registrieren. Es war nicht Gegenstand dieser Arbeit, sich mit den Gründen dieses Unterschiedes zu befassen, es liegt jedoch die Vermutung nahe, daß sich die geringere Agglutinabilität der Untergruppe A_2 geltend machen könnte (Untergruppen werden nicht bei allen Fällen im Voraus bestimmt), man kann auch nicht einen unterschiedlichen Titer der Antikörper im Serum ausschließen in Anbetracht dessen, daß die ČSN (tschechoslowakische Staatsnormen) nur den minimal zulässigen Titer anführen.

Literatur

1. Landsteiner, K., Miller, C. P. Jr.: J. exp. Med. **42**, 853 (1925). Zit. n. Kout, M., Májský, A., Herzog, P.: Serologische Untersuchungsmethoden in der Immunohämatologie, 1. Aufl. Praha: Staatsverlag für Gesundheitsliteratur 1964.
2. Pozzato, R., Molla, W.: La determinazione delle proprietà gruppospecifiche ABO su frammenti di organo fissati in formalina. Riv. Med. leg. **1**, 19—33 (1959).
3. — — Conservabilità degli agglutinogeni del sistema ABO in frammenti di tessuto inclusi in paraffina e loro rilevazione al fini medico forensi. Riv. Med. leg. **1**, 343—352 (1959).
4. Tesar, J., Sobotka, J.: Zur Frage der Möglichkeit, Blutgruppen in histologischen Präparaten nachzuweisen. Soud. Lék. **12**, 54—55 (1967).
5. Harsányi, I., Gerencsér, G.: Untersuchungen zur Bestimmung der Gruppensubstanzen in histologischen Präparaten. Beitr. gerichtl. Med. **28**, 244—249 (1971).

MUDr Vladimír Slavík
 Úvoz 47
 Brno, ČSSR

1 Zur Zeit, als diese Arbeit bereits an die Redaktion abgesandt war, veröffentlichten Harsányi u. Gerencsér [5] die Ergebnisse ihrer Versuche, mit denen sie die Elutionsmethode, die Mischzellen-Agglutinationsmethode und besonders das Absorptionsverfahren der italienischen Autoren für die Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit im ABO-Gruppensystem aus histologischen Präparaten beglaubigten. Keines der geprüften Verfahren ergab zufriedenstellende Ergebnisse; für die Absorptionsmethode von Pozzato u. Molla, die auch wir beglaubigt haben, sind unsere Ergebnisse ebenso pessimistisch. Die ungarischen Autoren zweifeln jedoch gleichzeitig nicht daran, daß mit Hilfe genügend empfindlicher serologischer Verfahren Antigene des ABO-Gruppensystems in kleinen Gewebeteilen mit Sicherheit nachgewiesen werden können. In dieser Hinsicht vertreten wir dieselbe Ansicht, die durch unsere oben erwähnten experimentellen Ergebnisse heute bereits unterstützt wird.