

Methode zur Blutgruppenbestimmung von unvollständig hämolysiertem Blut nach Verlust seiner Agglutinationsfähigkeit

R. Michailow

Gerichtsmedizinische Abteilung des Bezirkskrankenhauses Stara Zagora
Assen Weltschew Str. 82, 6000 Stara-Zagora, Bulgarien

A Method for Treatment of Partially Haemolysed Blood with Lost Agglutination Properties, Allowing its Blood Group Determination

Summary. A method for treatment of partially haemolysed blood with lost agglutination properties is described, which allows a direct determination of its blood group.

The method is based on the phenomenon of reversible agglomeration of erythrocytes after treatment of the blood with nonelectrolytic and electrolytic solutions. This phenomenon is well known in modern transfusion haematology (Huggins C. E., 1963).

This method has been tested on 156 blood samples with anti-A, B and AB serums and on 47 blood samples with anti-A, B, AB and H serums, as well, with very good results.

Zusammenfassung. Es wird eine Methode zur Bearbeitung hämolysierten Blutes beschrieben, die die direkte Bestimmung der Blutgruppe erlaubt. Durchgeführt wurde sie an 156 Blutproben mit anti-A, B und AB Serum und an 47 Blutproben mit anti-A, B, AB und H Serum mit gutem Resultat.

Key words. Blutgruppenbestimmung, bei gealtertem Blut – Spurenuntersuchung, Blutgruppenbestimmung

In der täglichen kriminalistischen und gerichtsmedizinischen Praxis begegnet man oft Blut mit fortgeschrittener Hämolyse, bei welchem sich die Blutgruppe weder mit der Kreuzungsmethode, noch mit der direkten Methode feststellen läßt. Es handelt sich dabei gewöhnlich um nicht richtig oder zu lange bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrtem Blut, sowie um Blut älterer Leichen. Die Schwierigkeiten bei der Blutgruppenbestimmung in diesen Fällen beruhen auf Strukturänderungen in den Agglutininen im Blutplasma, sowie durch Verminderung der Erythrozytenzahl, Träger der Agglutinogene, als Resultat der postmortalen Fäulnis. Daher fehlt den Fahndungsbehörden bei einigen schwierigen Fällen aus objektiven Gründen ein wichtiges Beweismittel, die Blut-

gruppe, die durch nichts ersetzt werden kann. Deshalb verdient jeder Versuch eines neuen Beitrags in dieser Richtung Beachtung.

1963 stellt Huggins fest, daß die Erythrozyten des Blutes in Anwesenheit von Nichtelektrolytlösungen (Glucose, Fructose, Saccharose u.a.) bei pH zwischen 5,2–6,1 und mittlerer Umgebungstemperatur von 20°C am Gefäßboden agglomerieren und unter Einfluß von Elektrolytlösungen (physiolog. Serum u.a.) deagglomerieren. Diese Erscheinung ist in der medizinischen Transfusionshämatologie als „Phänomen der reversiblen Agglomeration der Erythrozyten“ bekannt, im Gegensatz zur Aggregation und Agglutination der Erythrozyten.

Diese Tatsache brachte uns auf die Idee, daß es eventuell möglich wäre, mit Hilfe von Nichtelektrolytlösung, mit einem pH von 5,2–6,1 und mittlerer Umgebungstemperatur von 20°C Agglomeration von noch erhaltene Erythrozyten in Proben von nicht vollständig hämolysiertem Blut nach Verlust seiner Agglutinationsfähigkeit hervorgerufen, die nach Deagglomeration mit Hilfe von Elektrolytlösung zur Blutgruppenbestimmung benutzt werden können.

Material und Methode

Wir benutzten Blutproben, die über Zeitspannen von 1–4 Monaten im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt waren, die wir aus einem chemischen Labor bezogen, bestimmt zur Feststellung des Blutalkohols. Die Bearbeitung war folgendermaßen:

1. Abmessung von 1 ml hämolysiertem Blut in ein Zentrifugenglas, bei welchem die Blutgruppenbestimmung weder durch Kreuzprobe, noch mit direkter Methode durchführbar war.
2. Langsame Benetzung der Wände des Zentrifugenglases mit 1 ml 40%-iger Saccharoselösung, angesäuert mit 25%-iger Zitronensäure¹, gefolgt von dauerndem vorsichtigen Schütteln über 5 Minuten. Zufügung zu dieser Mischung von 5 ml 7%-iger Saccharoselösung angesäuert mit 25%-iger Zitronensäure², gefolgt von dauerndem Schütteln über 5 Minuten.
3. Zentrifugierung bei 2000 Umdrehungen, 2–3 Minuten.
4. Entfernung der überstehenden Flüssigkeit.
5. Dreimalige Wäsche mit physiologischem Serum.
6. Herstellung der Erythrozytensuspension aus am Reagenzglasboden sedimentierten Erythrozyten.
7. Bestimmung der Blutgruppe mittels direkter Methode mit anti-A,B, AB und H Serum.

Die konzentrierte Saccharoselösung bezweckt die Normalisierung des intrazellulären osmotischen Druckes der Erythrozyten, welcher vornehmlich durch den Einstrom von Natriumkationen und Chloranionen auf dem Diffusionswege während des postmortalen Zerfalles zerstört wird. Wir verwendeten die Kombination von 1 ml Blut, 1 ml 40%-iger und 5 ml 7%-iger Saccharoselösung, um die zur Erythrozytenagglomeration optimale Saccharosekonzentration zu erreichen- 10% (Huggins G. E., 1963). Die Benutzung von größerer als bestimmte in der Methode Menge von Blut und Saccharoselösungen in Verhältnis 1:1:5 garantiert bessere Resultate. Das Schütteln der Zentrifugengläser ist notwendig um einen engeren Kontakt zwischen Saccharose, Plasmagammaglobulinen und Erythrozyten zu erreichen, was seinerseits den Agglomerationsprozeß erleichtert und sowie die Sedimentierung der Erythrozytenagglomeration zu beschleunigen. Dies muß vorsichtig durchgeführt werden, damit die ohnehin geschädigten Erythrozyten nicht zusätzlich traumatisiert werden. Bei aufmerksamer Beobachtung gegen eine Lichtquelle kann man die fortgeschrittene Sedimentierung der agglomerierten Erythrozyten am Boden des Zentrifugenglases verfolgen; Zentrifugierung der agglomerierten Erythrozyten ist die Bedingung zur Erhaltung von maximal reichem Erythrozytensediment.

¹ Zur Ansäuerung von 1 l 40%-iger Saccharoselösung fügt man 0.88 ml 25%-iger Zitronensäure zu

² Zur Ansäuerung von 1 l 7%-iger Saccharoselösung fügt man 0.14 ml 25%-iger Zitronensäure zu

Ergebnisse

Gewöhnlich zeichnet sich bei Bearbeitung des Blutes mit fallenden Konzentrationen von Sacharoselösung am Boden des Zentrifugenglases eine unterschiedlich hohe Säule von agglomerierten Erythrozyten ab. Nach dreimaliger Waschung mit physiologischem Serum erhalten diese die leuchtend rote Farbe arteriellen Blutes, die auch nach Herstellung der Erythrozytensuspension erhalten bleibt. Die Agglutination tritt meist schnell ein. Sie ist auch ohne Lupe zu beobachten. Das Ergebnis überzeugt und hinterläßt keine Zweifel. Unsere Untersuchungen verliefen in 2 Etappen, weil wir nicht rechtzeitig hochwertiges Anti-H-Serum zur Verfügung hatten. Der erste Untersuchungsabschnitt umfaßte 156 Blutproben, der zweite 47 Blutproben.

Die Resultate zeigt Tab. 1 und 2.

Tabelle 1. Blutgruppen von 156 Blutproben, bestimmt mit Anti-A, B und AB-Serum, vor und nach Bearbeitung mit fallenden Konzentrationen einer Sacharoselösung.

vor Bearbeitung						nach Bearbeitung					
Blutgruppe						Blutgruppe					
Anzahl	A	B	AB	0	neg.	Anzahl	A	B	AB	0	neg.
156	28	7	3	—	118	118	25	21	6	—	66

Tabelle 2. Blutgruppen von 47 Blutproben, bestimmt mit Anti-A, B, AB und Anti-H-Serum vor und nach Bearbeitung mit fallenden Konzentrationen Sacharoselösung.

vor Bearbeitung						nach Bearbeitung					
Blutgruppe						Blutgruppe					
Anzahl	A	B	AB	0	neg.	Anzahl	A	B	AB	0	neg.
47	16	3	1	4	23	23	12	2	2	7	—

In der Spalte „0“ der Tab. 1 fehlen Proben, weil wir kein Anti-H-Serum zur Verfügung hatten, im Gegensatz zur Tab. 2 wo 4 bzw. 7 Proben vermerkt sind, da wir bereits über dieses Serum verfügten. Die in der Rubrik „negativ“ vermerkten Proben der Tab. 1 sind wahrscheinlich Blutgruppe 0 – worunter sich auch solche befinden können, bei denen die Hämolysse des Blutes dermaßen fortgeschritten war, daß die Blutgruppenbestimmung auch nach Bearbeitung mit fallenden Konzentrationen von Sacharoselösung unmöglich war. Die erfolgreiche Blutgruppenbestimmung von 23 Blutproben, aufgeführt in Tab. 2 demonstriert die großen Möglichkeiten der Methode.

Diskussion

Das Phänomen von Huggins, erfunden und praktiziert für andere Zwecke in der Transfusionshämatologie zeigt sich als durchaus nutzbringend in der Gerichtsmedizin. Auf diese Art bedient sich die Gerichtsmedizin erneut der Errungenschaften eines anderen Zweiges der medizinischen Wissenschaft um einen Schritt voranzutun.

Huggins legt eine Hypothese vor, mit welcher er sich bemüht dieses Phänomen zu erklären. Die ph-Erniedrigung des Blutes erzeugt reversible Komplexe von Plasmagammaglobulinen und Lipoproteinen an der Erythrozytenoberfläche, die sich weiterhin in gelöstem Zustand befinden. Die Zufügung von Nichtelektrolytlösung vergrößert diese Komplexe durch Bindung der übrigen Plasmagammaglobulinen und die Erythrozyten setzen sich am Gefäßboden ab. Der Zusatz von Elektrolytlösung zum Blut zerstört diese Bindung zwischen Gammaglobulinen und die ph-Erhöhung die Bindung zwischen Gammaglobulinen und Lipoproteinen, infolgedessen sich die Erythrozyten erneut im Blutplasma lösen. Einige seiner Experimente stützen in gewissen Grade diese seine Hypothese. Unserer Ansicht nach führt niedriger ph-Wert und Nichtelektrolytlösung im Blut zum Verlust der elektrischen Ladung der Erythrozyten welche dieselben in gelöstem Zustand erhält und somit zu deren Sedimentierung. Normaler ph-Wert und Elektrolytlösung stellt deren Ladung wieder her.

Die vorgelegte Methode stützt sich auf erhaltene Agglutinogene im hämolysierten Blut, analog der Methode der Agglutininabsorption bei der Untersuchung trockener Blutflecke. Ihre gemeinsame Unzulänglichkeit besteht darin, daß ein Fehlen der Agglutination bei alleinigen Arbeiten mit Anti-A, B und AB-Serum sowohl Gruppe 0, als auch bereits zerstörte A und B Agglutinogene bedeuten kann. Dieser Mangel ist durch die Benutzung von hochtitriertem anti-H Serum zu beheben. Die Methode ist leicht durchführbar. Sie ist für jedes gerichtsmedizinische Labor zugänglich. Sie ist wertvoll für die tägliche kriminalistische und gerichtsmedizinische Praxis, da sie die Zahl der Fälle erhöht, bei der Isoagglutinationseigenschaften des menschlichen Blutes ausgenutzt werden können. Die konkreten Möglichkeiten bezüglich des Alters des Blutes sind noch schwer anzugeben. In dieser Richtung zeigen jedoch unsere bisherigen Resultate eine gute Perspektive.

Literatur

Huggins, C. E.: Reversible agglomeration used to remove dimethylsulfoxide from large volumes of frozen blood. *Science* 139, 504–505 (1963)

Eingegangen am 25. November 1976