

Immunoenzymatische Bestimmung des AB0- und Sekretorstatus an paraffineingebettetem Autopsiematerial

I. Pedal und J. Hülle

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen,
Nägelestraße 5, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Immunoenzymatic Estimation of AB0 and Secretor Status on Paraffin-embedded Autopsy Material

Summary. Using the indirect immunoperoxidase technique (PAP method), A, B, and H antigens were identified on formaldehyde-fixed, paraffin-embedded kidney tissue from 100 autopsies. Comparison with the serologic findings showed all our blood group determinations to be correct. The labeling of the collecting tubules was evaluated as characteristic of the secretor. The secretor status determined according to this parameter was unequivocally confirmed by the Lewis constellation in 78 of 82 cases; group Le(a–b–) could be differentiated with immunohistochemical methods in secretors and nonsecretors. Determination of AB0 blood groups and secretion behavior with immunohistochemical methods was correct even in those cases where classic serology failed due to hemolysis and decomposition. Immunohistologic results obtained with monoclonal antibodies were better than those obtained with human sera.

Key words: Secretor status, blood groups (AB0) – Immunohistochemistry (PAP technique), determination of AB0 blood groups

Zusammenfassung. An formalinfixiertem und paraffineingebettetem Nierengewebe von 100 Sektionsfällen wurden die Antigene A, B und H mit indirekter Immunperoxidasetechnik (PAP-Methode) dargestellt. In allen Fällen wurde die Blutgruppe beim Vergleich mit dem serologischen Befund richtig ermittelt. Als Kriterium der Ausscheidereigenschaft wurde die Markierung der Sammelrohre gewertet. Der nach diesem Merkmal ermittelte Sekretorstatus wurde in 78 von 82 Fällen durch die Lewis-Konstellation eindeutig bestätigt; die Gruppe Le(a–b–) ließ sich immunhistochemisch in Ausscheider und Nicht-Ausscheider differenzieren. Immunhistochemisch gelangen Aussagen über AB0-Zugehörigkeit und Sekretionsverhalten auch

in Fällen, in denen wegen Hämolyse und Fäulnis die klassische Serologie versagte. Monoklonale Antikörper lieferten bei den immunhistochemischen Untersuchungen bessere Ergebnisse als humane Seren.

Schlüsselwörter: Ausscheidereigenschaft, Blutgruppen (AB0) – Immunhistochemie (PAP-Technik), AB0-Zugehörigkeit

Die Antigene A, B und H kommen nicht nur an der Erythrocytenoberfläche, sondern auch in den Geweben des menschlichen Körpers vor [10, 13, 29–31]. Sie sind sowohl gegen autolytische Veränderungen, als auch gegen Formalinfixierung und Paraffineinbettung [1, 9, 17] weitgehend resistent. Daher gelingt es mit geeigneten Methoden, diese Eigenschaften in Gefrierschnitten von Operations- und Biopsiematerial, aber auch in paraffineingebettetem Gewebe von Sektionsfällen nachzuweisen [24, 35]. Somit sind Blutgruppenbestimmungen auch in solchen Fällen durchführbar, in denen konventionelle serologische Untersuchungen aus irgendwelchen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

Es ist zu erwarten, daß die Antigene A, B und H bei Ausscheidern und Nicht-Ausscheidern zumindest in den sezernierenden Geweben Unterschiede in Quantität und Verteilung aufweisen. Tatsächlich wurden solche Unterschiede auch vielfach beobachtet [z. B. 1, 12, 29–31]. Bei der Wahl geeigneter Gewebe und Nachweismethoden sollte es also gelingen, über die Feststellung der Blutgruppeneigenschaft hinaus Aussagen über den Sekretorstatus zu machen.

In früheren Untersuchungen wurde an paraffineingebettetem Gewebe vor allem mit der Absorptions-Elutions-Methode [15, 16, 20, 24, 35] und mit der Mischzellagglutination [3, 8, 9, 17, 34] gearbeitet. Die Mischzellagglutination gilt als die empfindlichere Methode [14, 19]; sie erlaubt außerdem in begrenztem Umfang Aussagen über die topographische Verteilung des Antigens im Gewebe. Eine vergleichbar hohe Empfindlichkeit läßt sich mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik erzielen [5], während die direkte Immunfluoreszenz [10, 11] geringere Sensitivität aufweist. Der wesentliche Vorteil der Immunfluoreszenzverfahren liegt darin, daß sie eine Analyse der Antigen-Verteilung bis in den subzellulären Bereich gestatten. Nachteile sind der relativ große apparative Aufwand und der Umstand, daß die Präparate unter Lichteinwirkung rasch die Eigenschaft der Fluoreszenz verlieren, so daß eine photographische Dokumentation erforderlich ist. Zudem ist die Zuordnung des Antigens zu histologischen Strukturen im Dunkelfeld schwierig.

Sternberger u. Mitarbeiter stellten im Jahre 1970 mit der Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik ein immunenzymatisches Verfahren vor, das gewissermaßen eine Weiterentwicklung der indirekten Immunfluoreszenztechnik darstellt, ohne deren Nachteile zu besitzen [28]. In der auch von uns angewandten PAP-3-Schritt-Variante wird an das nachzuweisende Antigen ein Antikörper aus einer Tierspecies A gebunden (1. Schritt). Es folgt ein gegen Immunglobuline der Species A gerichteter „Brücken-Antikörper“, der in einer Species B erzeugt wurde (2. Schritt). Beim 3. Schritt wird ein Komplex aus Meerrettichperoxidase und einer in Species A erzeugten Anti-Peroxidase (PAP-Komplex) zugegeben, der von dem Brücken-Antikörper als Immunglobulin der Species A

erkannt und gebunden wird. Die Meerrettich-Peroxidase läßt sich nach dem Prinzip der Benzidinreaktion darstellen, wofür heute verschiedene Reagenzien zur Verfügung stehen. Das entstandene farbige Reaktionsprodukt markiert den Ort des Antigens im Gewebe; die Gegenfärbung kann je nach dem gewählten Reagens mit in der Histologie üblichen Farbstoffen erfolgen [21, 27, 37].

Mit Modifikationen dieser Technik lassen sich die Antigene A, B und H in paraffineingebettetem Operations- bzw. Biopsiematerial erfolgreich darstellen. Die bisher durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel, Informationen über das Verhalten der Blutgruppenantigene bei praeneoplastischen und neoplastischen Veränderungen zu gewinnen [z. B. 4, 6, 25, 33] oder in vaskulären Tumoren selektiv die Gefäßendothelien darzustellen [2]. Über Anwendungen dieser Technik auf forensisch-serologische Fragestellungen wurde bisher nur vereinzelt berichtet [32].

Mit der vorliegenden Untersuchung wollten wir durch vergleichende konventionell-serologische und immunenzymatische Analyse folgende Fragen klären: 1) Mit welcher Zuverlässigkeit läßt sich an paraffineingebettetem Sektionsmaterial mit der indirekten Immunperoxidasetechnik die AB0-Zugehörigkeit bestimmen? 2) Sind bei der Untersuchung von Nierengewebe darüber hinaus sichere Aussagen über den Sekretorstatus möglich?

Wir führten die Untersuchungen an der Niere durch, da Nierengewebe bei jeder Leichenöffnung asserviert wird, und weil die Niere zu den ABH-sezierenden Organen zählt, also Unterschiede zwischen Sekretoren und Nicht-Sekretoren erkennen läßt.

Durch den parallelen Einsatz humaner Isoagglutinine und monoklonaler Antikörper wurde geprüft, welches der Präparate für den Einsatz in der Blutgruppen-Immunhistochemie besser geeignet ist.

Material und Methodik

Nierengewebe von 100 unselektierten Sektionsfällen der Jahre 1982 bis 1984, bei denen routinemäßig serologische Untersuchungen durchgeführt worden waren, wurde mit einer modifizierten PAP-3-Schritt-Technik auf Vorhandensein und Verteilung der Blutgruppenantigene A, B und H untersucht.

Die serologische Untersuchung bezüglich der Merkmale A und B erfolgte am Leichenblut nach der üblichen Agglutinationstechnik, jeweils ergänzt durch die Serum-Gegenprobe, unter Verwendung handelsüblicher humaner Seren der Fa. Molter (Katalog-Nr. 110105, 110205, 110305); die A-Untergruppen wurden nicht differenziert. Die H-Eigenschaft wurde nicht regelmäßig geprüft. Als Kriterium des Sekretorstatus diente die Lewis-Konstellation. Die Lewis-Eigenschaften Le(a) und Le(b) wurden mit Ziegen-Antiserum der Fa. Behring (Katalog-Nr. ORXR 04/05, ORXS 04/05) geprüft.

Das Nierengewebe lag in einem kleineren Teil der Fälle paraffineingebettet vor; in den übrigen Fällen wurden Proben des in ungepuffertem Formalin (4%) aufbewahrten Gewebes anlässlich dieser Untersuchung in Paraffin eingebettet. Es wurde darauf geachtet, daß jeder Gewebekblock Rindengewebe und einen Markkegel einschließlich der Papille enthielt. Entparaffinierte Mikrotomschnitte (4 µm) wurden zur Darstellung von A, B und H folgendermaßen behandelt:

a) Darstellung der Antigene A and B mit humanen Seren

Nach Inaktivierung der endogenen Peroxidasen durch 1% H₂O₂-Methanol und anschließender Digestion mit Trypsin (0,1%) erfolgte die Inkubation mit 1:10 verdünntem humanen

Anti-A und, parallel hierzu, Anti-B und Anti-AB der Fa. Molter (Katalog-Nr. 110105, 110205, 110305). Als Erster Antikörper im PAP-3-Schritt-System diene ein gegen humane Immunglobuline gerichtetes Serum vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:4000, Fa. Dakopatts (Katalog-Nr. A 190). Als Brücken-Antikörper verwandten wir ein gegen Kaninchen-Immunglobulin gerichtetes Serum vom Schwein in einer Verdünnung von 1:200, Fa. Dakopatts (Katalog-Nr. Z 196). Der lösliche Komplex aus Meerettichperoxidase und Anti-Meerettichperoxidase vom Kaninchen, Fa. Dakopatts (Katalog-Nr. Z 113), wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die „Entwicklung“ erfolgte mit H_2O_2 und 3-Amino-9-Äthylcarbazol (Fa. Sigma, Katalog-Nr. A-5754). Das Reaktionsprodukt ist hierbei hellrotbraun gefärbt; die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

Inkubiert wurde jeweils 30 min bei Zimmertemperatur. Die angegebenen Titer waren jeweils in Vorversuchen ermittelt worden. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde mit 0,5-molarem Tris-Saline-Puffer, pH 7,6, gespült und mit unspezifischem Schweineserum 1:20 zehn Minuten lang vorinkubiert. Negativkontrollen unter Auslassung der Inkubation mit humanem Antiserum wurden mitgeführt.

b) Darstellung der Antigene A und B mit monoklonalen Antikörpern

In einem Teil der Fälle wurden zusätzlich an Stelle der humanen Seren monoklonale Antikörper der IgM-Klasse gegen A und B (Fa. Biotest: Seroclone Anti-A, Katalog-Nr. 801315; Seroclone Anti-B, Katalog-Nr. 801340) in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Als Erster Antikörper im PAP-3-Schritt-System diene nun ein Kaninchen Serum gegen Maus-IgM (Fa. Bionetics, Katalog-Nr. 8403-09, Vertrieb durch Fa. Fresenius), 1:500 verdünnt. Der weitere Ablauf entspricht dem unter a) angegebenen Schema.

c) Darstellung des H-Antigens

Das H-Antigen wurde durch spezifische Bindung des Ulex europaeus-Agglutinins (UEA I der Fa. Medac, Katalog-Nr. L-2201) identifiziert; die Verdünnung lag, bezogen auf die Reinstanz UEA I, bei 1:40000. In Vorversuchen hatte sich das für die Blutgruppenanalytik bestimmte UEA I der gleichen Firma (Katalog-Nr. B-2201) als untauglich erwiesen. Als Erster Antikörper im PAP-System diene ein Anti-UEA I vom Kaninchen (Fa. Medac, Katalog-Nr. AL 2201), 1:100 verdünnt. Der weitere Ablauf entspricht dem unter a) angegebenen Schema.

Tabelle 1. Histochemischer Nachweis der Blutgruppenantigene A, B und H nach der indirekten Immunperoxidase-methode (vereinfachtes Schema)

Vorbehandlung mit H_2O_2 -Methanol, anschließend Trypsin		
Humanes Serum (Anti-A, Anti-B, Anti-AB)	Monoklonaler Antikörper (Anti-A, Anti-B)	UEA I
Kaninchen-Antiserum gegen:		
Humane Immunglobuline	Maus-IgM	UEA I
Schweine-Antiserum gegen Kaninchen-Immunglobuline PAP-Komplex vom Kaninchen „Entwicklung“ der Peroxidase		

Ergebnisse

Wie nach den übereinstimmenden Befunden aller Autoren zu erwarten war, lassen sich mit der indirekten Immunperoxidasetechnik die Antigene des

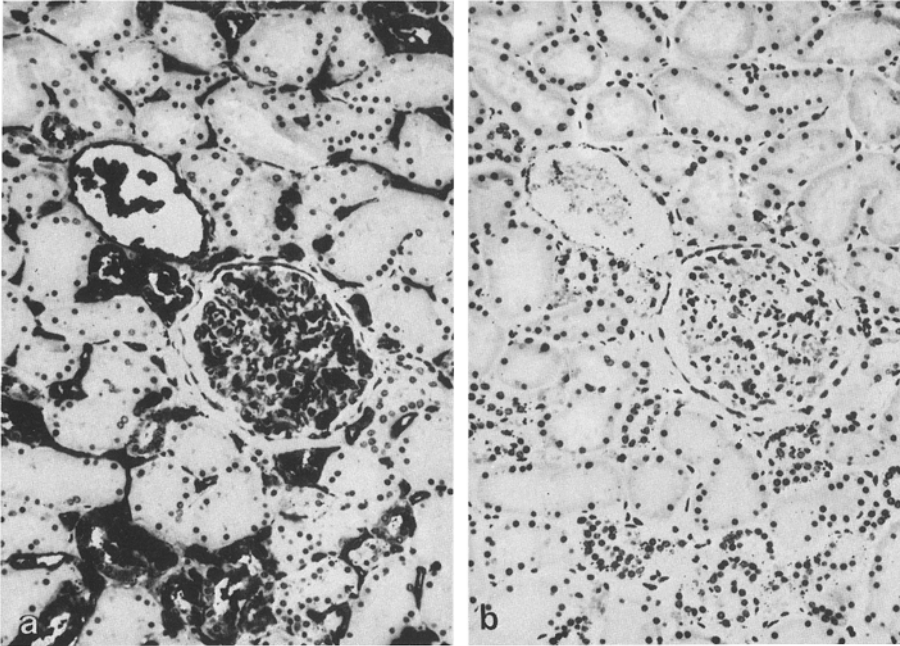


Abb. 1. a Nachweis von Blutgruppenantigenen an Erythrocyten und Endothelien sowie in den Epithelzellen der Tubuli contorti II (Niere, Blutgruppe A; indirekte Immunperoxidasetechnik mit monoklonalem Anti-A, Hämatoxylin-Gegenfärbung; $\times 130$. **b** Negativkontrolle mit monoklonalem Anti-B

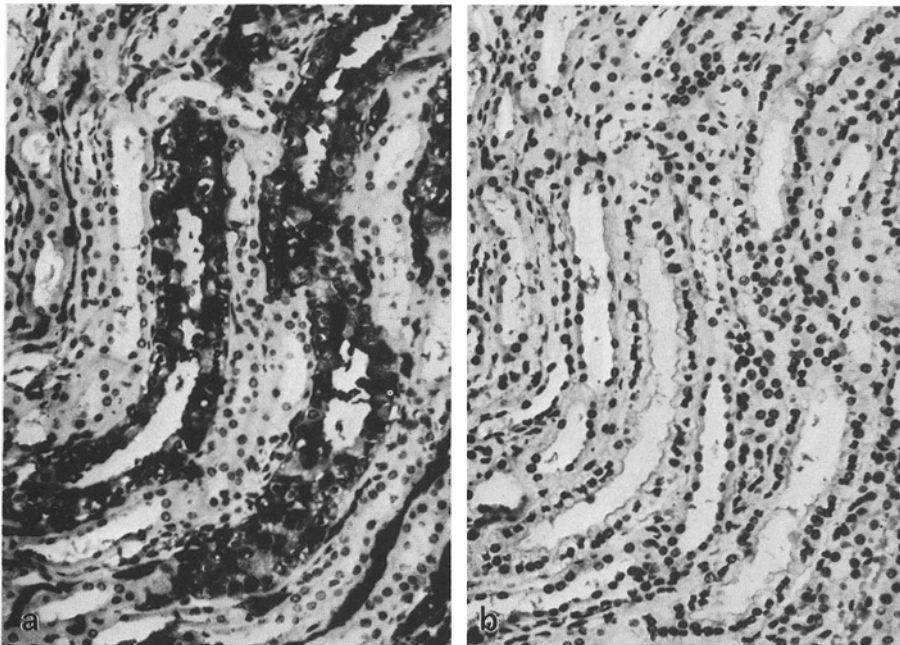


Abb. 2. a Intensive Markierung der Sammelrohre bei einem Ausscheider (Material und Methode wie in Abb. 1; $\times 160$. **b** Negativkontrolle mit monoklonalem Anti-B

ABO(H)-Systems unabhängig vom Sekretorstatus regelmäßig an der Erythrocytenoberfläche und an den Gefäßendothelien nachweisen (Abb. 1). Die Antigendarstellung im Bereich der Sammelrohrepithelien (Abb. 2) gilt dagegen als morphologisches Äquivalent der Ausscheidereigenschaft [1,30]. Wir versuchten, aufgrund dieser einfachen Kriterien in jedem Falle eine Aussage über Blutgruppe und Sekretorstatus zu machen.

Nach dem Ergebnis der konventionellen serologischen Untersuchungen gehörten von unseren 100 Fällen 41 zur Blutgruppe 0, 42 zur Blutgruppe A, 12 zur Blutgruppe B und 3 zur Blutgruppe AB; in zwei Fällen war wegen fortgeschrittener Hämolyse und Fäulnis die Blutgruppe nicht mehr zu bestimmen.

Immunhistochemisch wurde ohne Kenntnis des serologischen Befundes in allen Fällen die Zugehörigkeit zu den Gruppen 0, A, B und AB richtig bestimmt. Ein Fall, der serologisch nur durch Absorption-Elution am Blutfleck der Blutgruppe A zugeordnet werden konnte, bereitete immunhistochemisch keine Schwierigkeiten. Die beiden wegen fortgeschrittener Fäulnis serologisch nicht mehr zu beurteilenden Fälle waren immunhistochemisch eindeutig der Gruppe 0 bzw. B zuzuordnen.

In zwei Fällen, die serologisch als A klassifiziert worden waren, lieferte die immunhistochemische Untersuchung mit humanem Anti-A keinen eindeutig positiven Reaktionsausfall, so daß eine fehlerhafte Zuordnung zur Blutgruppe 0 möglich gewesen wäre. Sowohl mit humanem Anti-AB als auch mit monoklonalem Anti-A war jedoch eine klare Darstellung der Erythrocyten und Endothelien zu erhalten.

Ein falsch positiver Befund war an Erythrocyten und Endothelien nie zu erheben. Dagegen färbten sich mit monoklonalem (nicht aber mit humanem) Anti-B in mehreren Fällen der Blutgruppen 0 und A selektiv die Epithelien der Tubuli contorti II diskret positiv an. Das Muster der überwiegend apikalen Zellmarkierung war von dem einer „richtigen“ Blutgruppen-Antigendarstellung (s. u.) nicht unterscheidbar.

Bei Verwendung humaner Seren stellten sich wegen des Einsatzes eines Anti-Humanglobulins zwangsläufig die im Schnittpräparat enthaltenen Immunglobuline in Plasmazellen und — zum Teil — in Blutgefäßen und Nierentubuli dar. Außerdem trat beim Einsatz humaner Seren vor allem in stärker autolytisch verändertem Gewebe eine diffuse, unspezifische Hintergrundfärbung

	Serologische Methode	Immunhistochemische Methode
Blutgruppe 0	41	42
Blutgruppe A	42	42
Blutgruppe B	12	13
Blutgruppe AB	3	3
Nicht bestimmbar	2	—
Summe	100	100

Tabelle 2. Gliederung des Gesamtmaterials nach den Ergebnissen der serologischen und immunhistochemischen Untersuchungen

Tabelle 3. Zuordnung des immunhistochemischen Kriteriums „Markierung der Sammelrohre“ zu der serologisch ermittelten Lewis-Konstellation

Lewis-Konstellation	Zahl der Fälle	Markierung der Sammelrohre		
		Ja	Nein	Fraglich
Le(a-b+)	68	66	1	1
Le(a+b-)	14	1	12	1
Le(a-b-)	8	6	2	0
Nicht bestimmbar	10	8	2	0

auf. Beide Störfaktoren entfielen bei der Verwendung monoklonaler Antikörper.

Mit UEA I in dem gewählten Titer stellten sich in allen Fällen, unabhängig von Blutgruppe und Sekretorstatus, die Erythrocyten und, in der Regel intensiver, die Gefäßendothelien dar. Der Reaktionsausfall war von Fall zu Fall etwas unterschiedlich stark; bei Blutgruppe 0 kam es im allgemeinen zu einer sehr intensiven Anfärbung.

Im Lewis-System gehörten nach den serologischen Untersuchungen 68 Fälle zu der Gruppe Le(a-b+), 14 zu der Gruppe Le(a+b-) und 8 zu der Gruppe Le(a-b-). In 10 Fällen war die Lewis-Konstellation infolge Hämolyse nicht mehr zu ermitteln, oder es wurde durch Koagulation die unmögliche Konstellation Le(a+b+) vorgetäuscht.

Tabelle 3 zeigt synoptisch die Zuordnung des immunhistochemischen Kriteriums „Markierung der Sammelrohre“ zu der serologisch ermittelten Lewis-Konstellation. Geht man davon aus, daß Angehörige der Gruppe Le(a-b+) regelmäßig Ausscheider und Angehörige der Gruppe Le(a+b-) regelmäßig Nichtausscheider sind, so wurde in diesen beiden Gruppen ($n = 82$) die Sekretoreigenschaft 78mal immunhistochemisch richtig erkannt und viermal falsch ($n = 2$) oder nicht eindeutig ($n = 2$) bestimmt.

Der immunhistochemisch „fragliche“ Fall der Gruppe Le(a-b+) zeigte nur in den papillennahen Abschnitten der Sammelrohre geringe Sekretionsphänomene. Der als fraglich gewertete Fall der Gruppe Le(a+b-) zeigte selektiv im Zytoplasma der Sammelrohrepithelien eine atypische, feinfleckige Antigendarstellung.

In den typischen, histochemisch zutreffend beurteilten Fällen zeigten die Ausscheider in den Epithelien der Sammelrohre einen von Fall zu Fall unterschiedlich starken, stets papillenwärts zunehmenden Antigengehalt. In Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Befunden [12] lassen sich an der einzelnen Epithelzelle in wechselndem Muster eine streifenförmige, meist intensive Markierung der apikalen Oberfläche (Glykokalyx) und eine diffuse, zum Teil tropfenförmig verdichtete Anfärbung vor allem der apikalen Zytoplasmaanteile erkennen; manchmal — vor allem nach autolyse- und schrumpfbedingter Ablösung der Epithelzellen — ist zusätzlich die Basalmembran dargestellt. Unmittelbar benachbarte Zellen können sehr unterschiedlichen Antigengehalt aufweisen. Die Zunahme der Markierung von der Pyramiden-

basis zur Papille betrifft sowohl eine prozentuale Zunahme positiver Zellen, als auch eine Zunahme des durchschnittlichen Antigengehaltes der Einzelzelle. Bei Nichtausscheidern können in einzelnen Sammelrohrepithelien diskrete Antigen-Darstellungen vorkommen.

Die Tubuli contorti II zeigten in einem Teil der untersuchten Fälle eine Markierung, wobei das Antigen in den Epithelzellen und an ihrer Oberfläche eine ähnliche Verteilung aufwies, wie sie für die Sammelrohre beschrieben wurde. Die Darstellung der Tubuli contorti II lieferte kein zuverlässiges Kriterium für die Ausscheidereigenschaft, obgleich sie bei Sekretoren tendenziell stärker ausgeprägt war. Außer den interindividuellen Unterschieden fiel innerhalb ein und derselben Niere ein unterschiedliches Verhalten der angeschnittenen Tubuli contorti II auf, wie dies auch andere Autoren [1] beobachtet hatten.

Ließen sich in Sammelrohren und/oder Mittelstücken A- bzw. B-Antigene nachweisen, so ergab sich im allgemeinen mit UEA I eine entsprechende Darstellung. In Einzelfällen bestand eine Diskrepanz mit positivem A-Nachweis bei fehlender UEA I-Bindung. Entsprechende Diskrepanzen ergaben sich für das allerdings nur in wenigen Fällen angeschnittene Urothel der Nierenkelche, dessen Darstellung übrigens keine Abhängigkeit vom Sekretorstatus erkennen ließ.

Diskussion

Mit immunhistochemischen Methoden ist der Nachweis von Blutgruppen-substanzen des AB0(H)-Systems im Gewebe grundsätzlich möglich. Die bisherigen, vor allem unter Gesichtspunkten der experimentellen Pathologie durchgeführten Untersuchungen gingen von einer bekannten Blutgruppe aus und benutzten die Darstellung der Blutgruppenantigene zur Markierung von Endothelien oder zur Untersuchung (prae-)neoplastischer Veränderungen. Uns stellte sich die Frage, ob mit entsprechenden Methoden unter den Feldbedingungen der forensischen Medizin — also an autoptischem Material, an zum Teil jahrelang formalengelagertem Gewebe und an älterem, paraffineingebetteten Material — ein in foro verwertbarer Blutgruppennachweis geführt werden kann.

Wir untersuchten formalinfixiertes und paraffineingebettetes Nierengewebe von 100 unselektierten Sektionsfällen nach der PAP-Methode, wobei zur Erkennung der Eigenschaften A und B humane Seren und monoklonale Antikörper, zum Nachweis des H-Antigens UEA I benutzt wurden. In allen Fällen konnte die Blutgruppe — im Vergleich zu vorausgegangenen serologischen Untersuchungen — zutreffend bestimmt werden. Darüber hinaus wurde geprüft, ob der immunhistochemische Antigennachweis im Bereich der Sammelrohre als zuverlässiges Kriterium der Ausscheidereigenschaft zu werten ist. In 78 von 82 Fällen wurde bei den Lewis-Konstellationen Le(a-b+) und Le(a+b-) der Sekretorstatus nach dem immunhistochemischen Bild richtig erkannt. Diese ermutigenden Ergebnisse bestätigen, daß die Antigene des ABH-Systems gegen Autolyse, Fixierung in ungepuffertem Formalin und

Paraffineinbettung weitgehend resistent sind. Dies gilt sowohl für die Glykolipide der Erythrocytenoberfläche und der Endothelien, als auch für die Glykoproteine des Tubulusepithels. Die Nachweisbarkeit der alkohollöslichen Glykolipid-Fraktion nach Paraffineinbettung hängt offenbar wesentlich von der Methodik ab: Während mit indirekter Immunfluoreszenz die alkohollöslichen Blutgruppenantigene der Erythrocyten und Endothelien schon nach kurzer Äthanolvorbehandlung nicht mehr nachweisbar sind [10, 11, 13], gelingt ihr Nachweis selbst nach Paraffineinbettung problemlos mit der Mischzellagglutination [8, 9, 17] und mit immunenzymatischen Verfahren.

In manchen Punkten lieferte die PAP-Methode bessere Ergebnisse als die konventionelle Serologie: In zwei Fällen war die Blutgruppe wegen fortgeschrittener Hämolyse und Fäulnis serologisch nicht mehr zu ermitteln, während ihre Bestimmung immunhistochemisch eindeutig gelang. In 10 Fällen konnten die Lewis-Eigenschaften serologisch nicht mehr ermittelt werden, während immunhistochemisch stets eine Aussage über den Sekretorstatus (8 Sekretoren, 2 Nonsekretoren) gemacht werden konnte. In der 8 Fälle umfassenden inhomogenen Gruppe Le(a-b-) gestattete der immunhistochemische Befund ebenfalls eindeutige Aussagen darüber, ob es sich um Ausscheider ($n = 6$) oder Nicht-Ausscheider ($n = 2$) handelte.

Gegenüber dem Blutgruppennachweis im Gewebe mittels Absorption-Elution besitzen die immunhistochemischen Verfahren theoretische und praktische Vorteile: Das Leistungsvermögen der Absorption-Elution hängt vom Gesamt-Antigengehalt des Gewebes ab, so daß an antigenarmem Material, wie etwa Hirngewebe, die Blutgruppenbestimmung Schwierigkeiten bereitet [24, im Gegensatz zu 35]. Immunenzymatische Methoden erlauben bereits aufgrund einzelner Gefäßanschnitte oder Erythrocyten zuverlässige Aussagen. Die Ergebnisse der Absorption-Elution könnten außerdem durch mikrobielle Kontamination verfälscht werden [22]. Diese Fehlermöglichkeit ist bei den immunhistochemischen Methoden theoretisch auszuschließen, da sich die Blutgruppendiagnose auf die hochgradig charakteristische Verteilung der Antigene im Gewebe stützen kann und ein topographisch begrenztes Vorkommen in Verbindung mit Bakterienkolonien auffallen müßte.

Bei der immunenzymatischen Blutgruppenbestimmung am (Nieren-) Gewebe sind nach unseren bisherigen Erfahrungen einige Gesichtspunkte besonders zu beachten:

- 1) Monoklonale Antikörper sind in der Selektivität der Antigendarstellung humanen Seren deutlich überlegen: Polyklonale humane Seren ergeben vor allem bei stärker autolytisch verändertem Gewebe eine unspezifische Hintergrundfärbung; zudem stellen sich wegen des notwendigen Einsatzes eines Anti-Humanglobulins die im Schnittpräparat vorhandenen Immunglobuline dar. Ferner war das monoklonale Anti-A bei zwei unserer Fälle in der Erfassung einer schwachen A-Eigenschaft dem humanen Anti-A überlegen.
- 2) Unabhängig davon, ob mit humanen Seren oder monoklonalen Antikörpern gearbeitet wird, ist in jedem Falle ein Ansatz mit menschlichem Anti-AB-Serum mitzuführen [7, 23]. Dadurch kann, wie unsere Beobachtungen auch für die Immunhistochemie bestätigen, das Übersehen einer schwachen A- oder B-

Eigenschaft vermieden werden. Die bisher verfügbaren monoklonalen „Anti-AB“-Antikörper können das humane Serum nicht ersetzen, da es sich bei ihnen entweder lediglich um ein Gemisch aus monoklonalem Anti-A und monoklonalem Anti-B, oder aber um einen mit A und B kreuzreagierenden Antikörper [36] handelt; in beiden Fällen wird A_x nicht angezeigt.

3) Das von uns verwandte monoklonale Anti-B führte in einem Teil der Fälle mit Blutgruppe 0 und A zu einer diskreten, falsch-positiven Epithelmarkierung in den Tubuli concorti II. Dieser Befund kann nicht zu einer Fehlbestimmung als B bzw. AB führen, da weder Sammelrohre, noch Erythrocyten oder Endothelien dargestellt sind. Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf Sektionsmaterial; insofern ist nicht auszuschließen, daß bei der auto- bzw. heterolysebedingten Degradation der A- resp. H-Substanz ein Antigen freigesetzt wird, mit dem das monoklonale Anti-B, im Gegensatz zu humanem Serum, kreuzreagiert. Laufende Untersuchungen an Nierengewebe unter fortschreitender Autolyse und Fäulnis scheinen diese Vorstellung zu stützen.

4) Im Epithel der Sammelrohre nimmt bei Ausscheidern der Antigengehalt regelmäßig von der Pyramidenbasis papillenwärts zu. Bei ausgeprägten Befunden ist die Erkennung der Sekretionsäquivalente in allen Teilen des Markkegels möglich. Bei schwächerer Antigendarstellung im Tubulusepithel — mutmaßlich entsprechend einer schwächeren Sekretion — kommt es wesentlich auf die Beurteilung der papillennahen Markkegelanteile an. Deshalb ist zur Vermeidung von Fehlbeurteilungen darauf zu achten, daß die Präparate stets den Schnitt durch einen kompletten Markkegel enthalten. Bei Nicht-Ausscheidern kann eine diskrete Markierung einzelner Sammelrohrepithelien vorkommen, die von Befunden bei Sekretoren manchmal nicht sicher unterscheidbar ist. In diesem Grenzbereich kann es zu Fehleinschätzungen bezüglich des Sekretorstatus kommen; nach unseren Befunden ist in etwa 5% der Fälle mit unsicheren oder falschen Aussagen zu rechnen. Dies war auch nach den ultrastrukturellen Befunden von Hinglais et al. [12] zu erwarten, die zwischen Ausscheidern und Nicht-Ausscheidern an ihrem allerdings sehr kleinen Kollektiv lediglich graduelle Unterschiede des Antigengehaltes fanden.

5) Szulman [30] erhielt mit humanem Anti-H-Serum (von Bombay-Spendern) und einem Anti-H-Serum vom Huhn bei A_1 - und A_1B -Individuen eine schwache bis negative fluoreszenzmikroskopische Antigendarstellung. Seine Befunde wurden von Slocombe et al. [25] bei Immunperoxidaseuntersuchungen mit einem Anti-H-Serum vom Kaninchen tendenziell bestätigt. Dagegen erhielten wir in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern [z. B. 18, 33] mit UEA I in allen Fällen — unabhängig von Blutgruppe und Sekretorstatus — eine Erythrocyten- und Endothelmarkierung, die von Fall zu Fall nur geringe Intensitätsschwankungen aufwies. Dieser Befund entspricht der Tatsache, daß Angehörige aller Blutgruppen H-Substanz produzieren, die mit ausreichend sensitiven Methoden selbst bei A_1 - und A_1B -Individuen nachgewiesen werden kann [26]. Möglicherweise wäre UEA I in höherer Verdünnung im immunhistochemischen Ansatz ebenso wie in der konventionellen Serologie geeignet, zwischen A_1 und A_2 zu differenzieren.

Bei schlecht erhaltenem Gewebe kann ein stark positiver Ausfall mit UEA I bei negativen Ergebnissen mit Anti-A, Anti-B und Anti-AB die Diagnose

„Blutgruppe 0“ absichern. Angesichts der sehr ähnlichen molekularen Strukturen der Substanzen A, B und H wäre nämlich ein Verlust der A- bzw. B-Eigenschaft ohne Beeinträchtigung der H-Eigenschaft kaum denkbar. Eine solche Bestätigung der Zugehörigkeit zu Blutgruppe 0 ist aber sehr erwünscht, da ein immunhistochemisches Äquivalent der sogenannten Serum-Gegenprobe bisher nicht existiert.

Danksagung. Dank schulden wir Herrn Dr. P. Fritz, Oberarzt am Pathologischen Institut des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart, und seinen Mitarbeiterinnen, ohne deren Anregung und tätige Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Literatur

1. Bariéty J, Oriol R, Hinglais N, Zanetti M, Bretton R, Dalix A-M, Mandet Ch (1980) Distribution of blood group antigen A in normal and pathologic human kidneys. *Kidney Int* 17:820–826
2. Berry CL, Amerigo J (1980) Blood group antigens in vascular tumours. Evaluation of the immunoperoxidase technique. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 388:167–174
3. Coombs RR, Bedford D, Rouillard IM (1956) A and B group antigens on human epidermal cells demonstrated by mixed agglutination. *Lancet* I:461–464
4. Coon JS, Weinstein RS (1981) Detection of ABH tissue isoantigens by immunoperoxidase methods in normal and neoplastic urothelium. *Am J Clin Pathol* 76:163–171
5. Dabelsteen E, Rygaard J (1972) A sensitive immunofluorescence technique for detecting blood group substances A and B. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 80:433–439
6. Dabelsteen E, Vedtofte P, Hakomori S, Young WW Jr (1983) Accumulation of a blood group antigen precursor in oral premalignant lesions. *Cancer Res* 43:1451–1454
7. Daniels GL (1982) Monoclonal antibodies to red blood cell antigens. *Biotest Bull* 3:161–166
8. Davidson I, Ni LY, Stejskal R (1971) Tissue isoantigens A, B and H in carcinoma of the stomach. *Arch Pathol* 92:456–464
9. Denk H, Tappeiner G, Davidovits A, Eckerstorfer R, Holzner JH (1974) Carcinoembryonic antigen and blood group substances in carcinomas of the stomach and colon. *J Natl Cancer Inst* 53:933–942
10. Glynn LE, Holborow EJ (1959) Distribution of blood-group substances in human tissues. *Br Med Bull* 15:150–153
11. Glynn LE, Holborow EJ, Johnson GD (1957) The distribution of blood-group substances in human gastric and duodenal mucosa. *Lancet* II:1083–1088
12. Hinglais N, Bretton R, Rouchon M, Oriol R, Bariéty J (1981) Ultrastructural localization of blood group A antigen in normal human kidneys. *J Ultrastruct Res* 74:34–45
13. Holborow EJ, Brown PC, Glynn LE, Hawes MD, Gresham GA, O'Brien TF, Coombs RA (1960) The distribution of the blood group A antigen in human tissues. *Br J Exp Pathol* 41:430–437
14. Ishiyama I, Okada T (1975) Anwendung der modifizierten Mischzellagglutination (mixed cell agglutination reaction, MCAR nach Davidsohn) in der forensischen Serologie; MCAR auf dem Klebestreifen. *Z Rechtsmed* 77:25–40
15. Kind SS (1960) Absorption-elution grouping of dried blood smears. *Nature* 185:397–398
16. Kind SS (1960) Absorption-elution grouping of dried blood-stains on fabrics. *Nature* 187:789–790
17. Kovarik S, Davidsohn I, Stejskal R (1968) AB0 antigens in cancer: detection with the mixed cell agglutination reaction. *Arch Pathol* 86:12–21
18. Kuhlmann WD, Peschke P, Wurster K (1983) Lectin-Peroxidase conjugates in histopathology of gastrointestinal mucosa. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 398:319–328
19. Miki Y, Iki H, Inoue T, Hara M (1970) New blood grouping methods on the several human organs: Elution test and group-specific double combination method. *Kurume Med J* 17:33–38

20. Nickolls LC, Pereira M (1962) A study of modern methods of grouping dried blood stains. *Med Sci Law* 2: 172–179
21. Polak JM, van Noorden S (1983) *Immunocytochemistry*. Wright PSG, Bristol London Boston
22. Prokop O (1982) Wechselwirkungen zwischen Bakterien, Blut- und Serumgruppen. XII. Kongreß der Internationalen Akademie für Gerichtliche Medizin. *Acta Med Leg Soc [Suppl] (Liege)* 33: 1125–1131
23. Salmon Ch, Rouger Ph, Doinel Ch, Edelman L, Bach JF (1983) ABH subgroups and variants. Use of monoclonal antibodies. *Biotest Bull* 4: 300–304
24. Slavík V, Meluzín Fr (1972) Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit im System AB0 aus histologischem Material. I. Histologische Präparate der untersuchten Fälle. *Z Rechtsmed* 70: 79–88
25. Slocombe GW, Berry CL, Swettenham KV (1980) The variability of blood group antigens in gastric carcinoma as demonstrated by the immunoperoxidase technique. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 387: 289–300
26. Spielmann W, Kühnl P (1982) *Blutgruppenkunde*. Thieme, Stuttgart New York
27. Sternberger LA (1979) *Immunocytochemistry*, 2. Aufl. John Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore
28. Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315–333
29. Szulman AE (1960) The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J Exp Med* 111: 785–799
30. Szulman AE (1962) The histological distribution of blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. II. The H antigen and its relation to A and B antigens. *J Exp Med* 115: 977–996
31. Szulman AE (1964) The histological distribution of blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. III. The A, B, and H antigens in embryos and fetuses from 18 mm length. *J Exp Med* 119: 503–516
32. Tanaka N, Maeda H, Nagano T (1984) Immunohistochemische Untersuchung von Blutgruppenaktivitäten in stark verbrannten menschlichen Organ Geweben. *Arch Kriminol* 173: 165–172
33. Thorpe SJ, Abel P, Slavin G, Feizi T (1983) Blood group antigens in the normal and neoplastic bladder epithelium. *J Clin Pathol* 36: 873–882
34. Tönder O, Milgrom F, Witebsky E (1964) Mixed agglutination with tissue sections. *J Exp Med* 119: 265–274
35. Tröger HD, Jungwirth J (1975) Bestimmung der AB0-Gruppenzugehörigkeit an histologischen Präparaten. *Beitr Gerichtl Med* 33: 326–329
36. Voack D, Lowe AD, Lennox E (1983) Monoclonal antibodies: AB0 serology. *Biotest Bull* 4: 291–299
37. Wordinger RJ, Miller GW, Nicodemus DS (1983) *Manual of immunoperoxidase techniques*. Am Soc Clin Pathologists Press, Chicago

Eingegangen am 10. August 1984