

(Aus dem Senckenbergischen Pathologischen Institut der Universität
Frankfurt a. M. — Direktor: Professor Dr. *B. Fischer-Wasels*.)

Zur Methodik der serologischen Differenzierung der Untergruppen A₁ und A₂.

Von

Priv.-Doz. Dr. **H. Lehmann-Faci**us.

Mit 1 Textabbildung.

Die Versuche, innerhalb des klassischen Viergruppenschemas von *Landsteiner* zu einer noch weitgehenderen Differenzierung der individuellen menschlichen Blutstrukturen zu gelangen, haben in den letzten Jahren zu serologisch faßbaren Ergebnissen geführt. Durch *Landsteiner* sowie *Thomsen* und ihre Mitarbeiter sind auffällige Unterschiede innerhalb der Gruppeneigenschaft A nachgewiesen worden, die zu einer Teilung dieser Gruppe in die beiden Untergruppen A₁ und A₂ geführt haben.

Da ich im folgenden nur über kritische Beiträge zur Methodik sowie über neue Verfahren der Untergruppendiagnostik berichten möchte, kann ich auf eine ausführliche Beweisführung, welche die Annahme einer solchen Untergruppeneinteilung rechtfertigt, hier nicht näher eingehen, zumal dies ja bereits durch *Friedenreich* an anderer Stelle gesehen ist.

Ich möchte nur hervorheben, daß die Annahme zweier qualitativ verschiedener A-Gruppen sich im wesentlichen auf zwei Tatsachen stützt:

1. Die Erbllichkeit der die Untergruppen kennzeichnenden Eigenschaften einer „starken“ und einer „schwachen“ Agglutinabilität der jeweiligen A-Blutkörperchen (*Thomsen*).

2. Das Vorkommen eines irregulären, von *Landsteiner* als α^2 bezeichneten „Kälteagglutinins“, das durch eine elektive Wirkung auf die Blutkörperchen der Untergruppe A₂ charakterisiert ist.

Alle übrigen serologischen Phänomene, durch welche sich die beiden Teilgruppen des A-Merkmales unterscheiden lassen, können auch auf rein quantitative Differenzen in der Empfindlichkeitsstärke bzw. Bindungsfähigkeit der Blutkörperchen zurückgeführt werden (*Lattes*).

Einen weiteren Beweis dafür, daß den Untergruppen qualitativ verschiedene Strukturen zugrunde liegen, möchte ich in der spezifischen unterschiedlichen Hemmungsfähigkeit der Seren vom Typus A₁ und A₂ gegenüber der Agglutinationswirkung eines Anti-A-Serums erblicken,

wie es bereits *Thomsen* beobachtet hat. Denn stellt man sich die verschiedene Agglutinabilität der Blutkörperchen als den Ausdruck einer an die Zellen gebundenen Oberflächenwirkung vor, so kann im Gegensatz hierzu das für die Untergruppen charakteristische Gepräge der Serumflüssigkeit, d. h. ihre quantitativ verschiedene Hemmungsstärke, nur durch im Serum gelöste Receptorsubstanzen bedingt sein.

Will man also die Struktur des Gruppenmerkmals A darstellen, so wird diesen Verhältnissen am meisten die Annahme *Landsteiners* gerecht, daß neben einem beiden A-Gruppen gemeinsamen Hauptreceptor A — abgesehen von dem ebenfalls in den A-Blutkörperchen enthaltenen heterogenetischen Schaffblutanteil von *Schiff* und *Adelsberger* — noch die jeweilige Untergruppe charakterisierende Partialreceptoren A₁ bzw. A₂ vorhanden sind, was in den Symbolen AA₁ und AA₂ zum Ausdruck kommt.

Hieraus ergeben sich gewisse Schwierigkeiten für die Methodik der Untergruppendiagnose, da eben diese Teilgruppen sich nur in quantitativen Differenzen manifestieren. Dies ist besonders deshalb in Betracht zu ziehen, weil ja die praktische Anwendung einer solchen Differenzierung hauptsächlich auf gerichtlich-medizinischem Gebiet zum Zwecke der Identifizierung menschlicher Blutproben gelegen ist und deshalb die im Rahmen biologischer Methoden überhaupt mögliche Sicherheit unbedingt erreicht werden muß.

Das an sich ideal erscheinende Verfahren *Landsteiners*, das Blutkörperchen der Gruppe A₂ elektiv beeinflussende Kälteagglutinin α^2 zu verwenden, ist schon wegen der extremen Seltenheit der geeigneten Sera (in einigen Promille der Fälle) auszuschließen, abgesehen davon, daß gerade bei der thermischen Bedingtheit der Methode auf andere Blutkörperchen übergreifende Reaktionen nicht immer zu vermeiden sind und auch das Vorkommen „intermediärer Formen“ hierbei diskutabel ist.

Das von *Thomsen* ausgearbeitete quantitative Absorptionsverfahren, das eine kurvenmäßige Darstellung der Agglutininbindungsfähigkeit gestattet, ist wegen seiner umständlichen Ausführung für die Praxis wenig geeignet. Das gleiche gilt für das alte, von *v. Dungern* und *Hirszfeld* beschriebene Phänomen, daß nach der Absorption eines O-Serums mit den „schwächer bindenden“ A₂-Blutkörperchen ein nur noch auf die empfindlicheren A₁-Blutkörperchen wirkender Agglutininrest zurückbleibt, da ja auch hierbei quantitativ gestaltete Vorproben unerlässlich sind.

Eine wesentliche Vereinfachung der Methodik bedeuten deshalb die neuerdings von *Thomsen* und *Friedenreich* angegebenen *Hemmungsreaktionen*. Sie beruhen auf der Hemmungswirkung, welche die im Serum der Gruppen A bzw. AB enthaltenen Gruppenreceptoren auf die Anti-A-Agglutinine ausüben.

1. Prüfung der Blutkörpercheneigenschaften.

Wird ein Anti-A-Serum (O- oder B-Serum) statt mit Salzwasser mit einem A-Serum in fortlaufender Reihe verdünnt, so zeigt sich ein Unterschied der zugesetzten A-Blutkörperchen darin, daß die Agglutination der erheblich weniger empfindlichen A_2 -Blutkörperchen deutlich stärker gehemmt wird als die der empfindlicheren A_1 -Blutkörperchen.

2. Prüfung der Serumeigenschaft.

Wird ein Anti-A-Serum statt mit Salzwasser mit den jeweils zu prüfenden Seren der Gruppe A in fortlaufender Reihe verdünnt, so zeigt sich eine deutlich stärkere Agglutination der zugesetzten A-Blutkörperchen (besonders A_2 -Blutkörperchen, weniger bei A_1 -Blutkörperchen), wenn das Anti-A-Serum mit einem Serum der Gruppe A_2 verdünnt wurde.

Diese Versuchsanordnung bildet also gewissermaßen die spiegelbildliche Ergänzung der ersteren.

Die Anwendung der Methode I erfordert natürlich bestimmte Kautelen, wenn Blutproben der Gruppe AB geprüft werden sollen. Dann muß die Verdünnung des Anti-A-Serums — und zwar kommen in diesem Falle naturgemäß nur B-Sera in Betracht —, wie *Thomsen* vorschreibt, statt mit A-Serum mit AB-Serum erfolgen, um eine Interferenz des im A-Serum enthaltenen Anti-B-Agglutinins auszuschalten.

Obwohl ich bestätigen kann, daß sich die angegebenen Hemmungsmethoden zu fortlaufenden Untersuchungen durchaus eignen, möchte ich im folgenden zunächst über Beobachtungen berichten, die zu einer besonderen Vorsicht gerade bei der Untersuchung von AB-Fällen mittels der von *Thomsen* und *Friedenreich* angegebenen Technik mahnen*.

Die Tabellen stellen nur Teilauszüge aus den jeweiligen Versuchsprotokollen dar.

Tabelle 1.

Anti-A-Serum (Gruppe B)	Blutkörperchen	$1/1$	$1/2$	$1/4$	$1/8$	$1/16$	$1/32$
a) Verdünnt mit A-Serum . .	$\left\{ \begin{array}{l} A_1 \text{ 409} \\ A_2 \text{ 411} \end{array} \right.$	$\begin{array}{c} + + + + \\ + \end{array}$	$\begin{array}{c} + + + + \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{c} + + \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{c} + \\ . \end{array}$	$\begin{array}{c} (+) \\ . \end{array}$	$\begin{array}{c} 0 \\ . \end{array}$
b) Verdünnt mit AB-Serum .	AB 412	$+ + + +$	$+ + + +$	$+ +$	$+$	$(+)$	0

Nach den Ergebnissen der Tab. 1 wären die AB-Blutkörperchen Nr. 412 in die Untergruppe A_1B einzureihen. Im Gegensatz dazu ergibt jedoch ein Absorptionsversuch (Tab. 2), daß nach der Vorbehandlung

* Die Agglutinationsreaktionen wurden stets nach 3 Minuten langem *Zentrifugieren* (etwa 3000 Umdrehungen) abgelesen. Die Zeichen $+ + + +$ bis $+$ bedeuten verschiedene Grade der Agglutinationsstärke. 0 = keine Agglutination.

eines Anti-A-Serums mit einer angemessenen Menge der AB-Blutkörperchen Nr. 412 ein Agglutininrest zurückbleibt, der gegenüber A₁-Blutkörperchen den gleichen Titer besitzt, wie es nach Vorbehandlung mit den als Test dienenden A₂-Blutkörperchen der Fall ist.

Tabelle 2.

Anti-A-Serum	Blutkörperchen	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
a) Nicht absorb.	A ₁	++++	++++	++++	+++	+++	+	0
b) Absorb. mit 1/8 Vol. A ₁ 409		0	0
c) Absorb. mit 1/8 Vol. A ₂ 411		++++	++++	+++	++	0	.	.
d) Absorb. mit 1/8 Vol. AB 412		++++	++++	++	+	0	.	.

Diese Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse läßt sich unschwer durch die Besonderheiten des AB-Blutes erklären. Wir wissen, daß der B-Receptor eine gewisse hemmende Wirkung auf die Entwicklung sowohl von A₁ wie von A₂ ausübt. Ganz besonders schwach pflegt der A-Receptor in der Gruppe A₂B ausgebildet zu sein. *Dementsprechend verhält sich auch die Hemmungsstärke der AB-Sera, und insbesondere kann die Verdünnung des Anti-A-Serums mit A₂B-Serum bei der Untersuchung von AB-Blutkörperchen zu Fehldiagnosen führen.* Es ist also nicht gleichgültig, was für A- bzw. AB-Sera als Verdünnungsmedium bei dieser Hemmungsreaktion nach *Thomsen-Friedenreich* benutzt werden, und bei der Prüfung von AB-Blutkörperchen dürfte es sich eher empfehlen, an Stelle der AB-Sera mit B-Blutkörperchen absorbierte und so agglutininfrei gemachte A-Sera zu verwenden.

Ich möchte nochmals betonen, daß in der Regel die Prüfung der A-Blutkörperchen im Gegensatz zu denen der Gruppe AB mehr eindeutige Resultate gewährt. Immerhin ist aber zu bedenken, daß die *Thomsen-Friedenreich*-Methode auf rein quantitativen Unterschieden in der Empfindlichkeit der roten Blutzellen beruht und daß die Kombination der Reagenzien unter Umständen so ungünstig sein kann, daß die quantitativen Differenzen verwischt oder verschoben sind. Daß dies auch für die Prüfung der quantitativen Hemmungsfähigkeit der A-Sera nach *Thomsen* gilt, zeigt die folgende, in Tab. 3 wiedergegebene Beobachtung. Die beiden A-Blutproben Nr. 467 und 468 zeigen in Teil I der Tabelle bei der Prüfung der Blutkörpercheneigenschaften eine deutliche Differenz ihrer Agglutinabilität gegenüber einem Isoserum Anti-A, das in der angegebenen Weise mit steigenden Dosen A-Serum gemischt ist. Es würde demnach die Blutprobe Nr. 468 zur Untergruppe A₂ zu rechnen sein.

Führt man in dieser Annahme die zweite, von *Thomsen* angegebene diagnostische Methode aus, indem man die Hemmungsfähigkeit der einzelnen A-Seren prüft, die ja gegenüber den weniger empfindlichen A₂-Blutkörperchen besonders markant zum Ausdruck kommt, so findet sich wider Erwarten eine völlig gleiche Hemmungstärke der beiden A-Sera, und in der Tat zeigten auch mit diesen Blutproben ausgeführte Bindungsversuche (analog der Tab. 2) bei den Blutkörperchen A 468 das für die Untergruppe A₁ charakteristische Verhalten.

Tabelle 3.

Anti-A-Serum (Gruppe O)		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
1. Blutkörperchenprüfung.						
Verdünnung mit A-Serum	A 467	+++ (+)	++	+	(+)	0
	A 468	+	(+)	(+)	0	0
2. Serumprüfung mit Blutkörperchen A 468.						
Verdünnung mit den zu prüfenden Seren	A 467	++++	+++	+	0	·
	A 468	++++	+++	+	0	·
	A ₂ B 412	+++	+	(+)	0	·

Andererseits verhält sich auch das AB-Serum Nr. 412, das in dem gleichen Versuche mitläuft und das nach dem Bindungsversuch der Tab. 2 zu der Untergruppe A₂B zu gehören schien, widersprechend. Ich muß es dahingestellt sein lassen, ob die schwächere Hemmungswirkung dieses Serums etwa sekundär durch eine Interferenz in diesem Falle besonders stark ausgeprägter Serumreceptoren B bedingt ist, die mit dem Anti-B des O-Serums in Reaktion treten.

Ich habe versucht, die Methodik der Serumhemmungsreaktion dadurch zu verbessern, daß ich an Stelle der Vollsera nur die Fraktion des Serums verwendete, an der das gruppenspezifische Gepräge haftet. Ich fand, daß die durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat ausfällenden Serumglobuline nahezu quantitativ die die Untergruppen charakterisierenden Hemmungseigenschaften besitzen. Dieser Kunstgriff bietet den Vorteil, daß die in dem Globulinniederschlag enthaltenen Serumreceptoren in konzentrierter Form direkt in dem agglutinierenden Iso Serum Anti-A aufgelöst werden. Man kann den Versuch in quantitativer Anordnung ausführen derart, daß durch Ausfällung verschieden großer Serummengen die kleinste, noch einen Hemmungsunterschied hervorrufende Globulindosis bestimmt wird.

In Tab. 4 ist das nach *Thomsen* zweifelhafte Serum A 468 in einer solchen Globulinhemmungsreaktion dargestellt (es waren 0,5 ccm Serum mit 0,5 ccm Ammoniumsulfat gefällt und in 0,5 ccm zweifach verdünnten O-Serum aufgelöst worden); zugleich wurden Testsera A₁ und A₂ mituntersucht. Das Anti-A-Serum (Gruppe O) wurde sowohl nativ, wie

in Verbindung mit den Globulinen der zu prüfenden Sera gegen A₁- und A₂-Blutkörperchen titriert. Die Tab. 4 zeigt, daß das Serum A 468 wie ein A₁-Serum die Agglutinationswirkung des Anti-A-Serums unterdrückt hat. Bemerkenswert ist eine in der höchsten Dosis auftretende offenbare Überschußhemmung, die zu einer entsprechenden Titerverschiebung geführt hat.

Tabelle 4. *Agglutination von Menschenblut (0,1 Susp. 2%).*

Anti-A-Serum (O-Serum) 0,1 ccm	I.				II.			
	Untergruppe A ₁				Untergruppe A ₂			
	mit Serumglobulin			Serum nativ	mit Serumglobulin			Serum nativ
	Nr. 481 Gr. A ₁	Nr. 486 Gr. A ₂	Nr. 468		Nr. 481 Gr. A ₁	Nr. 486 Gr. A ₂	Nr. 468	
1/2	(+)	0	0	+++	0	0	0	0
1/4	(+)	+(+)	(+)	+(+)	0	0	0	0
1/8	0	+(+)	0	(+)	0	0	0	0
1/16	0	+	0	0	0	0	0	0
1/32	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 4 zeigt zugleich noch eine andere beachtenswerte Erscheinung: in dem vorliegenden Versuch waren durch das O-Serum nur die Blutkörperchen A₁ agglutiniert worden, während es sonst gerade empfehlenswert ist, den Serumhemmungsversuch nach *Thomsen* mit A₂-Blutkörperchen auszuführen. Abgesehen davon, daß diese Tatsache wieder darauf hinweist, daß durch diese Methoden eben nur quantitative Unterschiede zum Ausdruck gebracht werden, zeigt der Versuch, daß es auch nicht gleichgültig ist, welche Anti-A-Seren zur Untergruppendiagnose durch Serumhemmungsreaktionen benutzt werden; denn je nachdem die Mengenverhältnisse der in solchen Seren enthaltenen gegen A¹ und gegen A₂ bzw. den gemeinsamen A-Receptor gerichteten Agglutininfraktionen variieren, ist es geboten, die einen oder anderen A-Blutkörperchen als Test zu verwenden. Dies wird deutlich durch die Tab. 5a und 5b illustriert.

Ich möchte hierbei noch auf ein Phänomen hinweisen, das sich bei derartigen Versuchen sehr häufig gezeigt hat. Vergleicht man nämlich den Titer des nativen O-Serums gegenüber A₁- und A₂-Blut mit demjenigen nach der Bindung mit A₁- und A₂-Serumglobulin, so zeigt sich, daß nach der Behandlung des Anti-A-Serums mit A₂-Globulinen der Titer gegen A₁-Blut genau der gleiche geblieben ist wie im nativen Serum; dagegen hat der Agglutinationstiter gegen A₂-Blut hierdurch eine zwar geringe, aber doch deutliche Abnahme erfahren, was ich um so mehr bewerten möchte, als sich dies immer wieder beobachten ließ. Es wäre deshalb die Möglichkeit zu diskutieren, ob diese Erscheinung nicht einen weiteren Hinweis auf eine *qualitative* Verschiedenheit der Untergruppen darstellt.

Tabelle 5a. *Agglutination von Menschenblut der Untergruppe A₁ durch Anti-A-Serum (Gruppe O).*

Anti-A-Serum	I.				II.				III.
	Anti-A-Serum (1:2, 0,5) mit Ser.-Glob. aus 0,3 Vollserum				Anti-A-Serum (1:2, 0,5) mit Ser.-Glob. aus 0,7 Vollserum				Anti-A-Serum nativ
	a	b	c	d	a	b	c	d	
	Ser. 325 Gr. A ₁	Ser. 336 Gr. A ₁	Ser. 328 Gr. A ₂	Ser. 332 Gr. A ₂	Ser. 325 Gr. A ₁	Ser. 336 Gr. A ₁	Ser. 328 Gr. A ₂	Ser. 332 Gr. A ₂	
1/2	+++	++	++++	+++(+)	+(+)	+	++	++	++++
1/4	+	+(+)	+++(+)	++	(+)	+	+++	++	+++
1/8	(+)	(+)	+	+(+)	0	(+)	(+)	+	++
1/16	0	0	(+)	(+)	0	0	(+)	(+)	+
1/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 5b. *Agglutination von Menschenblut der Untergruppe A₂.*

1/2	0	0	++	+(+)	0	0	+(+)	+	+(+)
1/4	0	0	+	+	0	0	+	+	+(+)
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	+
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Gerade diese Möglichkeit sowie die Erwägung, daß alle bisher angeführten Methoden der Untergruppenbestimmung sich agglutinierender Seren bedienen, welche Agglutininfraktionen nicht nur gegen die die Untergruppen charakterisierenden Partialreceptoren, sondern auch gegen die allen A-Blutkörperchen gemeinsamen Qualitäten in mehr oder weniger ausgesprochenem Maße aufweisen, so daß die Differenzierung der Untergruppen nur eine relative ist, gaben den Anlaß, nach Seren zu suchen, die geeignet waren, die eine oder andere Untergruppe durch eine mehr qualitativ gerichtete agglutinatorische Wirkung zu erfassen.

Bei der Untersuchung normaler Tiersera in dieser Richtung war mir aufgefallen, daß *normale Meerschweinchensera* häufig eine hämolytische Wirkung ausübten, die sich elektiv gegen Menschenblutkörperchen der Untergruppe A₁ richtete.

Die Tab. 6 zeigt ein Beispiel einer derartigen *untergruppenspezifischen Heterohämolyse* durch normales Meerschweinchenserum.

Tabelle 6. *Hämolyse von Menschenblut durch Normal-Meerschweinchenserum.*

Serum	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Blutkörperchen:					
A ₁ 409	komplett	komplett	Spur	0	0
A ₂ 411	0	0	0	0	0
A ₂ B 412	0	0	0	0	0

Technik: Absteigende Mengen aktiven Meerschweinchensерums wurden im Volumen von 0,2 ccm mit je 0,1 ccm etwa 4—5proz. Blutsuspensionen bei 37°

digiert. Die zur Hämolyse notwendige Zeit schwankte zwischen 20 und 60 Minuten. Mitunter war nach längerem Brutschrankaufenthalt in der höchsten Serumkonzentration auch ein geringes Übergreifen auf A₂-Blut bemerkbar.

Es ist bemerkenswert, daß auch die in den Versuchen der Tab. 1 und 2 sich divergent verhaltenden AB-Blutkörperchen Nr. 412 wie A₂-Blutkörperchen verhalten. Einer praktischen Verwertung dieser Erscheinung stand jedoch entgegen, daß eine ausreichende hämolytische Kraft der Meerschweinchensera nicht konstant anzutreffen ist. Eine der Heterohämolyse entsprechende Agglutinationsfähigkeit der normalen Meerschweinchensera ist meist nur schwach ausgebildet. Allerdings kann beobachtet werden, daß die Agglutinationswirkung geeigneter Meerschweinchensera nach der Ausfällung der Euglobulinfraktion mit verdünnter Salzsäure bedeutend verstärkt war.

Ich habe auf diesen Beobachtungen die folgenden Versuche aufgebaut, um das Phänomen der elektiven Beeinflussung der Menschenblutkörperchen A₁ durch Meerschweinchenserum auch praktisch verwertbar zu machen und zugleich auf dieser Basis einen Nachweis der qualitativen Verschiedenheit der beiden Untergruppen der Blutgruppe A zu führen.

Legt man den Beziehungen zwischen dem durch die Immunisierung ausgeübten Reiz und der Antikörperbildung eine konstitutionsserologische Betrachtung zugrunde, wie es namentlich *Hirszfeld* und *Halber* getan haben, so könnte die Anwesenheit bestimmter normaler Antikörper als Ausdruck der Individualität der betreffenden Tiere derart von Bedeutung sein, daß *die Spezifität der entstehenden Antikörper direkt abhängig ist von der Existenz einer durch die präformierten Antikörper dargestellten individuellen Reaktionsbereitschaft* gegenüber dem entsprechenden Antigen. So ist es bekannt, daß Kaninchen, die bereits normalerweise bestimmte gruppenspezifische Agglutinine in ihrem Blutserum besitzen, auf die Einspritzung des entsprechenden Blutes sehr leicht mit der Bildung besonders spezifischer und reichlicher Immunagglutinine antworten, während diejenigen Tiere, denen die dem Antigen der Vorbehandlung entsprechenden Normalantikörper fehlen, in der Regel auch für eine derartige Immunisierung ungeeignet sind.

Bei der Herstellung untergruppenspezifischer Antisera muß jedoch noch ein anderes Moment berücksichtigt werden. In der Antigenstruktur des Gruppenmerkmals A bildet der heterogenetische Schafblutanteil von *Schiff* und *Adelsberger* einen wesentlichen Bestandteil, also jener Partialreceptor, der zugleich im Forssman-Antigen vorkommt und der die Entstehung von Hammelbluthämolysinen bei der Mehrzahl der mit Menschenblut A vorbehandelten Kaninchen verursacht. Ich möchte behaupten, daß *die gruppenspezifischen Anti-A-Sera, die von Kaninchen gewonnen werden, nur gruppenspezifisch in bezug auf diese Forssman-*

Komponente sind, und es ist ja bekannt, daß einerseits gerade die heterogenetischen Antigene eine ausgesprochen dominierende Funktion bei der gleichzeitigen Immunisierung mit mehreren Antigenen ausüben (Konkurrenzphänomen), und daß andererseits die Kaninchen im allgemeinen sehr leicht Forssman-Antikörper bilden.

Aus diesen konstitutionellen Gründen erscheinen Kaninchen zur biologischen Differenzierung untergruppenspezifischer Strukturen des Blutmerkmals A von vornherein ungeeignet, während bei Meerschweinchen zweierlei Voraussetzungen gegeben sind, die für eine solche Möglichkeit sprechen:

1. Die erwähnte vorzugsweise Wirkung der Meerschweinchennormalsera auf die Untergruppe A₁, die bereits auf eine entsprechende Reaktionsbereitschaft hindeutet.

2. Die Zugehörigkeit des Meerschweinchens zum Forssman-Typus, d. h. dadurch, daß das Meerschweinchen das heterogenetische Antigen bereits in seinen Organzellen besitzt, können die sonst bei der Vorbehandlung mit Menschenblut A prävalierenden Anti-Forssman-Quoten bei dieser Tierart überhaupt nicht zur Ausbildung gelangen.

Auf Grund dieser Erwägungen habe ich Meerschweinchen mit Menschenblut der Untergruppe A intraperitoneal injiziert, und zwar 3 mal in 3 tägigen Intervallen je 5 ccm einer etwa 10proz. Blutsuspension. Die Entblutung erfolgte 10—12 Tage nach der letzten Injektion. Von einer Vorprüfung der zu immunisierenden Tiere und einer Auswahl nach Maßgabe der erwähnten Heterohämolysine habe ich abgesehen, da ja die Reaktionsbereitschaft prinzipiell vorhanden sein kann, während die entsprechenden Normalantikörper noch unter der Schwelle der serologischen Nachweisbarkeit liegen.

Aus der Tab. 7 geht hervor, daß derartige MeerschweinchenimmunsERA tatsächlich ein gegenüber der Untergruppe A₁ dominierendes Gepräge besitzen. Allerdings ist der Unterschied nur ein relativer, und die beiden

Tabelle 7. *Heteroagglutination durch natives Anti-A₁-MeerschweinchenimmunsERum.*

Menschenblut- körperchen	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<i>1. Meerschweinchen Nr. 68.</i>						
Gruppe O . . .	++++	++(+)	+	0	0	0
Gruppe A ₁ . . .	++++	++++	++++	+	(+)	0
Gruppe A ₂ . . .	++++	++	(+)	0	0	0
Gruppe B . . .	++++	++	(+)	0	0	0
<i>2. Meerschweinchen Nr. 71.</i>						
Gruppe O . . .	0	0
Gruppe A ₁ . . .	++++	++++	+++	++	0	.
Gruppe A ₂ . . .	++++	+(+)	(+)	0	.	.
Gruppe B . . .	0	0

angeführten Sera scheinen auch darin verschieden zu sein, daß das Serum Nr. 68 in den höheren Konzentrationen auf das Blut sämtlicher Gruppen übergreift, während das Serum Nr. 71 außer mit A₁ nur noch in geringerem Grade mit A₂ reagiert.

Die Verschiedenheit in der Reaktionsfähigkeit der Antisera scheint darauf hinzuweisen, daß neben den untergruppenspezifischen Agglutininen einerseits zugleich artspezifische Menschenblutagglutinine, andererseits auch solche Agglutinine entstanden sind, die, zwar gruppenspezifisch, jedoch gegen gemeinsame Bestandteile des A-Merkmales gerichtet sind, wobei man vor allem an den gemeinsamen Hauptreceptor denken kann, wenn man sich die Landsteinerschen Symbole AA₁ und AA₂ vor Augen hält.

Zur Ergänzung sei erwähnt, daß sich die Meerschweinchenantisera auch im Hämolyseversuch ganz analog verhielten, wie aus der folgenden Tab. 8 zu ersehen ist.

Tabelle 8. *Hämolyse durch natives Anti-A₁-Meerschweinchenimmunsrum.*

Menschen- blutkörperchen	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	0
Gruppe O . . .	Spur	0	0	0	0	0	0
Gruppe A ₁ . . .	komplett	komplett	fast komplett	stark	Spur	0	0
Gruppe A ₂ . . .	fast ganz komplett	fast komplett	stark	0	0	0	0
Gruppe B . . .	komplett	fast ganz komplett	Spur	0	0	0	0

Technik: Fortlaufende Verdünnungen des inaktivierten Meerschweinchenantisersums wurden im Volumen von je 0,2 ccm mit je 0,1 ccm eines Komplement-Blutkörperchengemisches versetzt. Die Blutsuspensionen waren derart bereitet worden, daß zunächst mit Salzwasser Suspensionen von einer etwa 4proz. Dichte hergestellt wurden; darauf wurde zentrifugiert und das Blutsediment jeweils in dem entsprechenden Volumen einer 10fachen Verdünnung normalen Meerschweinchenserums aufgeschwemmt. Die Ablesung erfolgte nach 2stündigem Brutschrankaufenthalt.

Es war von Interesse, zu untersuchen, wie sich solche, offenbar eine Untergruppenquote gegen A₁ enthaltenden Antisera bei der Serumhemmungsreaktion verhielten. Ein derartiger Versuch ist in Tab. 9 wiedergegeben.

Tabelle 9. *Untergruppenspezifische Serumhemmungsreaktion mit Anti-A₁-Meerschweinchenimmunsrum.*

Verdünnungsmedium	I.	II.	III.	IV.	V.
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	0
Verdünnung mit Menschenserum A ₁ . .	++	+	0	0	0
Verdünnung mit Menschenserum A ₂ . .	++++	++++	++	0	0
Verdünnung mit Salzwasser	++++	+++	++	0	0

Es geht daraus hervor, daß die Verdünnung des Meerschweinchen-antiseraums mit Menschenserum A₁ tatsächlich zu einer deutlichen Hemmung der Agglutination der A₁-Blutkörperchen geführt hat, während Titer und Agglutinationsstärke des Antiserums bei der Verdünnung mit Menschenserum A₂ sich genau wie bei derjenigen mit Salzwasser verhalten.

Die folgende Tab. 10 gibt denselben Versuch insofern abgeändert wieder, als hierbei die Albuminfraktion eines Meerschweinchenantiseraums als Lösungsmittel für die Menschenserumglobuline verwendet wurde.

Tabelle 10. *Globulinhemmungsreaktion mit der Albuminfraktion des Anti-A₁-Meerschweinchenimmunsersums.*

	$\frac{1}{10}$ 0,5 ccm Meersch.-Ser.-Albumin + Globulin aus 0,5 ccm Menschen-Ser.		Ohne Zusatz
	I.	II.	
	Serum A ₁	Serum A ₂	
Blutkörperchen A ₁ . .	0	+++	+++
Blutkörperchen A ₂ . .	0	(+)	++

Zur Darstellung der Albuminfraktion waren je 0,5 ccm inaktivierten Meerschweinchensera mit 4,1 ccm $\frac{1}{250}$ -Normalsalzsäure versetzt worden. Nach 1 stündigem Stehen im Eisschrank (bei 4—5°) wurde der Niederschlag abzentrifugiert, und der Abguß durch Zusatz von 0,4 ccm $\frac{1}{25}$ -Normalnatronlauge in 10proz. Kochsalzlösung neutralisiert und besalzen.

Bei dieser Versuchsanordnung genügte die Ausführung der Probe mit je einem Röhrchen, da die Hemmungsreaktion äußerst markant zum Ausdruck kam.

Wenn es auch durch die Serumhemmungsreaktionen sehr wahrscheinlich gemacht war, daß die beschriebenen Meerschweinchenantisera eine für die Untergruppe A₁ spezifische Agglutininquote enthielten, so erforderte eine exakte Analyse jedoch unbedingt einen endgültigen Nachweis einer derartigen Antikörperkomponente auch durch die Methode der *elektiven Absorption*.

Zu diesem Zwecke wurden 0,5 ccm einer 5fachen Verdünnung des inaktivierten Meerschweinchenantiseraums mit je $\frac{1}{4}$ Volumen Menschenblutkörperchen der in der Tab. 11 angeführten Gruppen 1 Stunde bei 37° absorbiert. Darauf wurde scharf zentrifugiert und der Abguß sowie das native Serum sowohl gegen A₁- wie gegen A₂-Blutkörperchen titriert.

Der Versuch zeigt, daß ausschließlich durch die Absorption mit Menschenblut der Gruppe A₁ eine elektive und quantitative Entfernung der Anti-A₁-Agglutinine erreicht worden ist, so daß auf diese Weise die untergruppenspezifische Quote der Antisera markant zum Vorschein kommt. Menschenblut der Gruppe O hat überhaupt nicht oder in nicht nennenswertem Grade den Agglutinititer sowohl gegen A₁ wie gegen A₂ beeinflußt. Dagegen hat die Vorbehandlung mit A₂-Blut wenigstens

Tabelle 11.

Agglutination von Menschenblut durch Anti-A₁-Meerschweinchenimmunserum Nr. 71.

	I.				II.			
	Menschenblut Gruppe A ₁				Menschenblut Gruppe A ₂			
	Nach Absorption mit			Serum nativ	Nach Absorption mit			Serum nativ
	a	b	c		a	b	c	
	Me.-Bl. Gr. O	Me.-Bl. Gr. A ₁	Me.-Bl. Gr. A ₂		Me.-Bl. Gr. O	Me.-Bl. Gr. A ₁	Me.-Bl. Gr. A ₂	
1/5	++++	0	++++	++++	++++	(+)	0	++++
1/10	++++	0	++++	++++	++	0	0	++
1/20	++++	0	+	+++(+)	+	0	0	+
1/40	+++	0	0	++	0	0	0	+
1/80	+	0	0	0	0	0	0	0

Anti-A₁-Meerschweinchenimmunserum Nr. 68.

1/5	++++	++	++++	++++	++	+	+	++++
1/10	++++	0	++++	++++	0	0	0	0
1/20	+++	0	+++	++++	0	0	0	0
1/40	+	0	(+)	++	0	0	0	0
1/80	0	0	0	+	0	0	0	0

bei dem Serum Nr. 71 zu einer allerdings geringen Reduktion des Anti-A₁-Agglutiningehaltes und zu einem vollständigen Schwund der auf A₂ übergreifenden Agglutinine geführt.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die bei Tab. 7 betonte Verschiedenheit in der Reaktionsfähigkeit der nativen Antiseren auch nunmehr bei der Absorption dadurch zum Ausdruck kommt, daß die mehr artspezifisch gerichteten Nebenagglutinine des Antiserums Nr. 68 durch O-Blut ebenso wie durch A₂-Blut gleichmäßig entfernt werden, während bei dem Antiserum Nr. 71, dessen Nebenagglutinine sich vorwiegend gegen den gemeinsamen Hauptreceptor A richten, die Behandlung mit A₂-Blut infolgedessen zugleich auch den Agglutinititer gegen A₁ in geringerem Maße herabsetzt.

Die in Tab. 11 wiedergegebenen Versuche demonstrieren demnach in eindeutiger Weise, daß auf Grund der besonderen konstitutionsserologischen Bedingungen des Meerschweinchenorganismus tatsächlich eine biologische Untergruppendifferenzierung auf immunisatorischem Wege gelingt, was zur Voraussetzung hat, daß die Blutkörperchen A₁ eine qualitativ besondere Struktur besitzen müssen, die denen der Untergruppe A₂ fehlt.

Als praktische Konsequenz ergibt sich hieraus die Möglichkeit, *solche durch Immunisierung gewonnenen Sera als elektive Testsera Anti-A₁ zu verwenden.* Voraussetzung ist dabei allerdings, daß die erwähnten Nebenagglutinine durch Absorption entfernt werden. Dies gelingt deswegen

in einfacher Weise, weil die A_2 -Blutkörperchen sowohl die artspezifischen wie die gegen den gemeinsamen A-Bestandteil gerichteten Agglutininfraktionen binden.

Daß man hierbei, selbst nach Absorption mit einer Blutkörperchendosis von $\frac{1}{4}$ Vol. noch scharfe Ausschläge gegenüber A_1 -Blutkörperchen erhält, kommt in Tab. 12 deutlich zum Ausdruck.

Tabelle 12. *Agglutination von Menschenblut durch Anti- A_1 -Meerschweinchenimmunserum nach Vorbehandlung des letzteren mit Menschenblutkörperchen A_2 .*

Absteigende Menge Meersch.-Serum (absorbiert)	Blutkörperchen			
	Nr. 505 Gr. A_1	Nr. 510 Gr. A_1	Nr. 504 Gr. A_2	Nr. 499 Gr. A_2
$\frac{1}{5}$	+++	++++	0	0
$\frac{1}{10}$	+++	++(+)	0	0
$\frac{1}{20}$	+(+)	+(+)	0	0
$\frac{1}{40}$	0	0	0	0

Daß die Affinität der Agglutinine der Anti- A_1 -Meerschweinchenimmunsera tatsächlich gegenüber den Untergruppen A_1 und A_2 eine ganz verschiedene ist und eine elektive Anti- A_1 -Wirkung darstellt, kommt auch durch die quantitativ gestalteten Absorptionsversuche wieder deutlich zum Ausdruck.

Zu diesem Zwecke wurden je 0,5 ccm einer 5fachen Meerschweinchen-Antiserumverdünnung mit progressiv absteigenden Volumina Menschenblutkörperchen A_2 1 Stunde bei 37° absorbiert. Die Abgüsse wurden jeweils gegen A_1 - und A_2 -Blutkörperchen ausgewertet.

Tabelle 13.

Agglutination von Menschenblut durch Anti- A_1 -Meerschweinchenimmunserum.

Absteigende Mengen Meerschweinchen- Serum	Absorbiert mit Menschenblutkörperchen A_2				Serum nativ
	a	b	c	d	
	$\frac{1}{4}$ Vol.	$\frac{1}{8}$ Vol.	$\frac{1}{16}$ Vol.	$\frac{1}{32}$ Vol.	

1. *Menschenblut A_1 .*

$\frac{1}{5}$	++++	++++	++++	++++	++++
$\frac{1}{10}$	++	++++	+++	++++	++++
$\frac{1}{20}$	+	+	++	++	+++(+)
$\frac{1}{40}$	0	(+)	+	+(+)	++
$\frac{1}{80}$	0	0	0	0	0

2. *Menschenblut A_2 .*

$\frac{1}{5}$	0	(+)	(+)	(+)	++++
$\frac{1}{10}$	0	0	0	0	++
$\frac{1}{20}$	0	0	0	0	+
$\frac{1}{40}$	0	0	0	0	(+)
$\frac{1}{80}$	0	0	0	0	0

Aus der Tab. 13 geht hervor, daß die A₂-Blutkörperchen selbst in der konzentrierten Dosis nur zu einer geringen Abnahme der Anti-A₁-Wirkung des Meerschweinchenantisera geführt haben, während umgekehrt die auf A₂ übergreifenden Nebenagglutinine noch durch $\frac{1}{32}$ Vol. der A₂-Blutkörperchen fast quantitativ entfernt worden sind.

Tab. 14 zeigt das Verhalten desselben Meerschweinchenantisera nach der quantitativen Absorption mit A₁-Blutkörperchen. Wir sehen,

Tabelle 14. Agglutination von Menschenblut durch Anti-A₁-Meerschweinchenimmunsrum.

Absteigende Mengen Meer- schweinchen- Serum	Absorbiert mit Menschenblutkörperchen A ₁				Serum nativ
	a	b	c	d	
	$\frac{1}{8}$ Vol.	$\frac{1}{16}$ Vol.	$\frac{1}{32}$ Vol.	$\frac{1}{64}$ Vol.	

1. Menschenblut A₁.

$\frac{1}{5}$	0	(+)	+	++++	++++
$\frac{1}{10}$	0	0	(+)	+(+)	++++
$\frac{1}{20}$	0	0	0	(+)	+++(+)
$\frac{1}{40}$	0	0	0	0	++
$\frac{1}{80}$	0	0	0	0	0

2. Menschenblut A₂.

$\frac{1}{5}$	0	0	0	(+)	++++
$\frac{1}{10}$	0	0	0	0	++
$\frac{1}{20}$	0	0	0	0	+
$\frac{1}{40}$	0	0	0	0	(+)
$\frac{1}{80}$	0	0	0	0	0

daß dieselben die homologe Anti-A₁-Wirkung des Serums sogar in der kleinsten angewandten Absorptionsdosis deutlich reduziert haben. Zugleich haben die A₁-Blutkörperchen aber auch die Nebenagglutinine gegen A₂ eliminiert, was ja nicht verwunderlich ist, wenn man bei diesen letzteren keine untergruppenspezifische Qualität annimmt, sondern die Erscheinung mit einer Interferenz des allen A-Blutkörperchen gemeinsamen Hauptreceptors A erklärt.

Besonders eindrucksvoll kommen diese Verhältnisse bei einer kurvenmäßigen Darstellung der Agglutininbindungsfähigkeit nach Thomsen und Friedenreich zum Ausdruck.

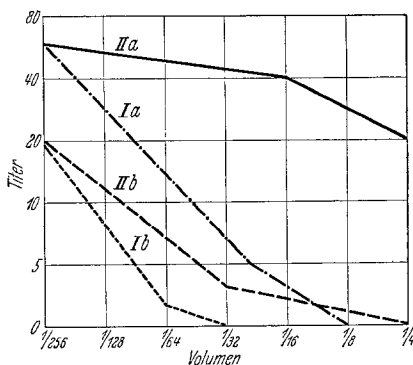


Abb. 1. Agglutininbindungsfähigkeit der Blutkörperchen A₁ und A₂. Blutkörperchen-volumina als Abszisse, Seruntiter als Ordinate. I = absorbiert mit A₁-Blut; II = absorbiert mit A₂-Blut; a = geprüft mit A₁-Blut; b = geprüft mit A₂-Blut.

Zusammenfassung.

1. Es wird gezeigt, daß die von *Thomsen* bzw. *Thomsen* und *Friedreich* angegebenen Methoden der Untergruppenbestimmung, die auf einer Hemmungsreaktion beruhen, unter gewissen Umständen zu Fehlbestimmungen führen können. Besondere Vorsicht ist bei der Untersuchung von Blutkörperchen der Gruppe AB zu gebrauchen, da das zur Verdünnung des Anti-A-Serums erforderliche AB-Serum, namentlich wenn dieses der Gruppe A₂B angehört, eine zu schwache Hemmungswirkung ausübt, so daß selbst A₂B-Blutkörperchen ebenso stark agglutiniert werden können wie die im gleichen Versuch geprüften A₁-Blutkörperchen.

2. Zur Ergänzung der von *Thomsen* namentlich zur Prüfung von Neugeborenenenserum angegebenen Serumhemmungsreaktion wird empfohlen, namentlich bei gerichtlich-medizinischen Untersuchungen, eine Globulinhemmungsreaktion auszuführen, derart, daß an Stelle der Vollsera die durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällte Serumglobulinfraktion direkt in dem Anti-A-Serum aufgelöst wird. Auch diese Methode gestattet eine quantitative Auswertung durch Bestimmung der kleinsten, noch einen deutlichen Hemmungsunterschied hervorrufenden Serumglobulindosis.

3. Es wird gezeigt, daß die Hemmungsunterschiede bei der Globulinhemmungsreaktion bei einem schwächeren Anti-A-Serum manchmal deutlicher bei Verwendung von A₁-Blutkörperchen erscheinen als bei den im allgemeinen hierzu mehr geeigneten A₂-Blutkörperchen. Reagiert das native Anti-A-Serum bereits stark mit A₂-Blut, so sind die letzteren Blutkörperchen vorzuziehen.

4. Es wurde beobachtet, daß normale Meerschweinchensera öfters elektiv auf die Untergruppe A₁ gerichtete Heterohämolysine enthalten.

5. Auf Grund dieser Erscheinung wird die Möglichkeit diskutiert, ob Meerschweinchen im Gegensatz zu Kaninchen eine prinzipielle Eigenschaft zur Bildung untergruppenspezifischer Anti-A₁-Immunagglutinine aufweisen, zumal bei Meerschweinchen keine Reaktionsfähigkeit gegenüber dem im A-Blut dominierenden heterogenetischen Teilfaktor besteht.

6. Dementsprechend zeigten Anti-A₁-Meerschweinchenimmunsera eine relative Dominanz gegenüber A₁-Blutkörperchen. Die übergreifenden Nebenagglutinine, die sowohl artspezifisch auf Menschenblutkörperchen aller Gruppen, wie auch bisweilen vorwiegend gegen A₂-Blutkörperchen wirkten, konnten durch Absorption leicht entfernt werden. Umgekehrt konnte auch durch Absorption mit A₁-Blut eine elektive Anti-A₁-Quote dadurch nachgewiesen werden, daß die Anti-A₁-Agglutinine quantitativ entfernt wurden, während der artspezifische Agglutininrest erhalten blieb.

7. Quantitative Absorptionsversuche an derartigen Meerschweinchen-antisera mit A₁- und A₂-Blutkörperchen bringen die besondere Existenz eines Partialreceptors A₁ sowie eines gemeinsamen A-Bestandteiles deutlich zum Ausdruck.

8. Bei gerichtlich-medizinischen Untergruppenbestimmungen empfiehlt sich die Ausführung mehrerer Methoden, insbesondere die Prüfung der Blutkörperchen mit absteigenden Mengen Anti-A₁-Meerschweinchen-immunserum nach Vorabsorption des letzteren mit einer angemessenen Dosis A₂-Blut, da A₂-Blut sowohl die gemeinsamen Anti-A- wie die art-spezifischen Nebenagglutinine entfernt.

Literaturverzeichnis.

- ¹ v. Dungern u. Hirszfeld, Z. Immun.forschg **8**, 526 (1911). — ² Friedenreich, Z. Immun.forschg **71**, 283 (1931). — ³ Thomsen, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **16**, H. 1 (1930). — ⁴ Thomsen, Friedenreich u. Worsaae, Klin. Wschr. **9**, 67 (1930). — ⁵ Thomsen, Friedenreich u. Worsaae, Acta path. scand. (Kobenh.) **7**, 157 (1930). — ⁶ Thomsen u. Friedenreich, C. r. Soc. Biol. Paris **103**, 1301 (1930). — ⁷ Landsteiner, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **13**, 1 (1929). — ⁸ Schiff u. Adelsberger, Z. Immun.forschg **40**, 335 (1924). — ⁹ Lattes, L'individualite du sang. Paris 1929. — ¹⁰ Lattes u. Cavazutti, J. of Immun. **9**, 407 (1924). — ¹¹ Thomsen, Z. Immun.forschg **71**, 199 (1931). — ¹² Hirszfeld u. Halber, Z. Immun.forschg **53**, 419 (1927).
-