

(Aus dem Gerichtsärztlichen Institut der Universität Breslau.
Direktor: Prof. *Karl Reuter*.)

Die Blutgruppenbestimmung an Blutflecken.

Von
Prof. Georg Strassmann.

Sieht man von den Defektgruppen mit schwach ausgebildeten Agglutininen oder wenig ausgeprägten agglutinablen Blutkörperchen-eigenschaften ab, und davon, daß im Blut des Säuglings Agglutinine nicht immer nachweisbar sind, so bereitet im allgemeinen die Blutgruppenbestimmung an dem Lebenden entnommenen Blut bzw. an frischem Leichenblut keine Schwierigkeiten. Anders ist es jedoch bei Blutflecken, die kürzere oder längere Zeit angetrocknet sind. Zunächst gelingt an Blutflecken nicht unmittelbar die direkte Feststellung der Blutkörpercheneigenschaften, weil eine Aufschwemmung von Blutkörperchen aus Blutflecken nicht herzustellen ist. Sodann macht aber auch die Feststellung der Agglutinine Schwierigkeiten.

Für die Blutfleckdiagnose, soweit es sich um die Bestimmung der Blutgruppe handelt, stehen im wesentlichen drei Methoden zur Verfügung:

1. Die Bestimmung der Serumagglutinine durch Prüfung des Blutfleckes oder Blutfleckextraktes mit Testblutkörperchen A und B.
2. Die Feststellung der agglutinablen Blutkörpercheneigenschaften durch den Absorptionsversuch.
3. Die Bestimmung der direkten Einwirkung des Blutfleckes auf Blutkörperchen einer oder mehrerer verdächtiger Personen, nämlich darauf, ob Blutkörperchen einer bestimmten Person durch den Blutfleck agglutiniert werden oder nicht.

Nachdem erstmalig *Landsteiner* und *Richter*¹ an Blutflecken für forensische Zwecke die Gruppenbestimmung vorgenommen hatten, war es besonders *Lattes*², dem erfolgreich Blutfleckbestimmungen gelangen und der dafür eine besondere Methode empfahl, durch die in konzentrierter Form die Agglutinine aus einem Blutfleck gewonnen und dargestellt werden.

Gegenüber der ursprünglich angewandten Technik, wonach ein Stück des Blutflecks herausgeschnitten oder angetrocknetes Blut abgekratzt und mit frischen Blutkörperchen A und B auf dem Objektträger

versetzt wurde, bedeutete die *Lattessche* Methode zweifellos einen Fortschritt. Dabei werden an zwei Stellen eines Objektträgers oder auf zwei Objektträgern nacheinander Tropfen des wäßrigen Blutfleckextraktes zum Antrocknen gebracht und mit einer Testblutkörperchen-aufschwemmung A bzw. B versetzt. *Lattes* selbst hat auf diese Weise sehr altes Blut noch richtig bestimmen können. Unsere eigenen Untersuchungen haben wohl bei Anwendung der *Lattes*-Methode zuweilen eine richtige Bestimmung ergeben, häufig aber mißlang die Feststellung der Gruppenzugehörigkeit, ohne daß es sich um besonders altes Blut handelte. Woran es liegt, daß die Agglutinine sich beim Antrocknen bisweilen nach kürzerer, bisweilen erst nach längerer Zeit dem Nachweis entziehen, wissen wir nicht, doch ist wohl anzunehmen, daß von vornherein schwach ausgebildete Agglutinine rascher durch das Antrocknen zerstört werden, als solche, die stark wirksam sind. So hätten wir beim Ausbleiben der Agglutination von Blutkörperchen A und B bei unseren Untersuchungen allzu häufig eine Gruppe AB aus einem Blutfleck erschließen müssen, als tatsächlich vorhanden war. Da oft in einem Serum O die Agglutinine Anti-A und Anti-B in verschiedener Stärke ausgebildet sind, wird man auch mit der Möglichkeit rechnen müssen, daß das schwächer ausgebildete Agglutinin durch Antrocknen leichter und schneller zerstört wird, als das stärkere. Dadurch würde aber ein Blutfleck O fälschlicherweise als A oder B bestimmt werden, wenn das zweite Agglutinin nicht mehr nachweisbar ist. Leider wissen wir, wenn Blutflecke forensisch untersucht werden, selten, wie stark die Agglutinine ursprünglich in diesem Blut ausgebildet waren.

Da die einwandfreie Bestimmung der Agglutinine an Blutflecken öfters mißlingt, ist zur Ergänzung die Feststellung der Blutkörperchen-eigenschaften mittels Agglutininbindung bzw. -absorption empfohlen worden (*F. Schiff*⁵ u. a.). Mit einer verfeinerten Technik hat *Holzer*³ an zahlreichen alten Blutflecken durch Agglutininbindung die Gruppenzugehörigkeit richtig bestimmen können und schließt daraus, daß die Blutkörpercheneigenschaften A und B beständiger und gegen Zerstörung durch Antrocknen widerstandsfähiger sind, als die Agglutinine. Auf die von *Holzer* benutzte und genau beschriebene Technik braucht hier nur hingewiesen zu werden. Im wesentlichen besteht die *Holzersche* Methode darin, daß quantitativ festgestellt wird, wieweit einem Serum O durch den zu untersuchenden Blutfleck das Agglutinin A oder B oder beide Agglutinine oder kein Agglutinin entzogen wird.

Wird kein Agglutinin durch den Blutfleck gebunden, so agglutiniert das Serum O nach Behandlung mit dem Blutfleck in unverminderter Stärke Blutkörperchen A und B; der Blutfleck gehört zur Gruppe O. Wird das Agglutinin Anti-A gebunden, so muß sich in dem Blutfleck die Blutkörpercheneigenschaft A befunden haben; der Blutfleck gehörte

zur Gruppe A; das Serum O enthält nachher nur noch das Agglutinin Anti-B und agglutiniert nur noch Blutkörperchen B. Gehörte der Blutfleck zur Gruppe B, so mußte die Blutkörpercheneigenschaft B das Anti-B im Serum O gebunden haben, so daß nach der Behandlung das Serum O nur noch Anti-A enthält und nur noch Blutkörperchen A agglutiniert. Gehörte der Fleck zur Gruppe AB, so müßte er die Agglutinine Anti-A und Anti-B binden, so daß nach der Behandlung das Serum O keine Agglutinine mehr enthält und weder Blutkörperchen A noch Blutkörperchen B agglutiniert.

Mit der *Holzerschen* Methode kommt es nicht immer zu einer vollständigen Bindung, sondern nur zu einer stärkeren Abschwächung des oder der Agglutinine, die in steigender Verdünnung des Serums festgestellt werden kann. Die von *Holzer* verwandten Blutmengen betragen in der Regel 10 mg Trockenblut auf 0,1 ccm Serum. Zu einer Verminderung des Agglutinins genügten aber noch geringere Mengen, wenn verdünntes Serum benutzt wurde.

Wir haben systematisch die *Holzerschen* Angaben an Blutproben nachgeprüft, die an den verschiedensten Gegenständen kürzere oder längere Zeit angetrocknet waren. Zum Teil handelte es sich um von uns bestimmtes Blut vom Lebenden oder der Leiche, das auf Instrumente, Tuch, Papier u. a. verspritzt wurde, zum Teil um unbekanntes Blut, das vorher durch Prof. *Kathe* im Medizinaluntersuchungsamt bestimmt worden war und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. An Stelle der von *Holzer* angegebenen Glasplatten benutzten wir weiße Porzellanplatten, von denen jede 12 Vertiefungen aufwies, in denen die Agglutination gut zu beobachten ist. Die Sera O wurden vorher auf ihre Stärke geprüft, und es erwies sich als zweckmäßig, nur solche zu verwenden, die bekannte und stark wirksame frische Blutkörperchen A und B in annähernd gleicher Stärke agglutinierten. Denn dann ist der Unterschied in der Abschwächung der Agglutinine besonders gut zu erkennen. Für die Untersuchung brauchbare Sera müssen noch in einer Serumverdünnung von 1 : 16 oder darüber Blutkörperchen A und B agglutinieren. Schwächere Sera wurden ausgeschaltet. Die zur Bestimmung verwandte, abgewogene Blutmenge betrug 10 mg bzw. noch weniger, da von dem blutbefleckten Stoff, wie auch *Holzer* vorschlägt, ohne Berücksichtigung des Tuch- oder Papiergeichtes stets 10 mg abgewogen wurde. Es wurde auch versucht, mit einer Menge von nur 5 mg Blut Absorptionsversuche auszuführen, wobei das Serum O auf $\frac{1}{3}$ oder $\frac{1}{4}$ verdünnt und dann in einer Menge von 0,1 ccm mit 5 mg Blut versetzt wurde. 0,1 ccm Serum ist erforderlich, da Tuch und Papier beim Stehen Flüssigkeit in sich aufsaugt und dann bei geringerer Serummenge nicht genug Flüssigkeit zur Auswertung zur Verfügung steht.

Wir benutzten später immer 10 mg Blut auf 0,15 ccm Serum, das vorher mit physiologischer Kochsalzlösung zur Hälfte verdünnt worden war. Mit 5 mg Blut erzielten wir keine so guten Resultate. Steht mehr Blut zur Verfügung, so kann auch eine größere Menge, also 20 mg Blut bzw. Blutfleck auf 0,2 ccm Serum benutzt werden. Welche Art der fortschreitenden Verdünnung des Serums, ob in Potenzen von 2 (*Holzer*) oder auch in 3facher Verdünnung fortschreitend, gewählt wird, ist schließlich gleichgültig. War das Serum O von vornherein, ehe das Trockenblut zugesetzt wurde, im Verhältnis 1 : 2 verdünnt, und wird nun nach der Behandlung und nach Ausschleudern entsprechend der *Holzerschen* Technik in steigender Verdünnung die Prüfung des Serums mit Blutkörperchen A und B vorgenommen, so beginnt die erste Ablesung der Agglutination bei einer Serumverdünnung von 1 : 4. Man kann sich damit begnügen, bis zu einer Serumverdünnung 1 : 64 die Agglutination zu prüfen, wenn im Serum O Agglutinine bis zu einer Verdünnung 1 : 64 vorhanden sind. Sonst genügen unter Umständen auch schwächere Verdünnungen. Wir nehmen auf einer Platte mit 12 Vertiefungen in den ersten 6 Vertiefungen die Prüfung mit Blutkörperchen A, in den zweiten 6 die mit B vor, d. h. in einer Serumverdünnung von $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$ bis $\frac{1}{64}$. Die Agglutination wurde unmittelbar nach der Mischung, ferner nach 5, 10, 20 und 30 Minuten abgelesen; man kann die oft sofort sich zeigende, allmählich immer stärker werdende, in den höheren Verdünnungen erst später auftretende Agglutination bei leichtem Hin- und Herbewegen der Platte auf diese Weise zeitlich genau verfolgen und eintragen. Gestört wird die Beobachtung bei alten Blutflecken dadurch, daß das Serum nach Mischung mit Trockenblut bald eine dunkelbräunliche Färbung annimmt, die allerdings in den stärkeren Verdünnungen wieder schwächer wird. Zur Kontrolle muß bei Blutflecken 0,1 ccm Serum O mit einer entsprechenden Menge (0,01 g) desselben Tuches, Papiers usw. behandelt werden, an dem sich kein Blut befindet, um unspezifische Abschwächungen auszuschließen. Auf solche unspezifische Abschwächungen der Agglutinine durch Gewebsstoffe hat schon *Holzer* und neuerdings *Zipp*⁴ hingewiesen. Auch wir fanden eine solche Abschwächung durch Leinwand und Fließpapier gelegentlich, wenn auch nicht in erheblichem Maße. Eine Kontrolle ist aber notwendig, um Fehlbestimmungen zu vermeiden. Ist in dem Serum O nach der Behandlung keine oder nur eine ganz geringfügige Abschwächung der Agglutinine Anti-A und Anti-B eingetreten, so wäre der Blutfleck als zur Gruppe O gehörig zu bezeichnen. In diesem Fall empfiehlt es sich, eine nochmalige Nachprüfung vorzunehmen, indem dem Blutfleck in dem Glasrörchen eine geringe Menge Serum O erneut zugefügt und nun nach 1—2tägigem Stehen im Eisschrank die Bestimmung der Agglutinine zum zweitenmal durch-

geführt wird. Abschwächungen um eine Stufe, z. B. von $1/_{64}$ auf $1/_{32}$, sind nicht verwertbar. Derartige Abschwächungen kommen durch unspezifische Bindung, aber auch beim Stehen des Serums vor, wie auch *Holzer* betont. Veerwertbar sind nur deutliche Abschwächungen um mindestens 2, besser um 3 oder mehr Stufen. Übrigens gelingt es auch nicht immer, bei der zweiten Prüfung eine völlige Bindung der Agglutinine zu erzielen. Auch bei der *Holzerschen* Methode können Fehlbestimmungen vorkommen, wenn eine vorhandene agglutinable Eigenschaft oder eine von zwei agglutinablen Eigenschaften sehr schwach ausgebildet war. Denn dann wird schon nach kurzer Zeit des Antrocknens so wenig Agglutinin durch diesen Receptor gebunden, daß die Abschwächung dieses Agglutinins für eine sichere Ablesung zu gering ist. Man wird aus diesem Grunde eine Gegenprobe mittels der Agglutinbestimmung nach *Lattes* stets versuchen. Für die Beobachtung der Agglutination eignet sich außer der makroskopischen Betrachtung auch die Besichtigung mit der Binokularlupe, bzw. eine ganz schwache mikroskopische Vergrößerung. Als positiv sahen wir im allgemeinen eine Agglutination jedoch dann nicht an, wenn sie nur mikroskopisch festzustellen war, da durch Anlagerung von Blutkörperchen an Zeug- oder Tuchfasern eine Agglutination mikroskopisch vorgetäuscht werden kann. Bei deutlicher starker Abschwächung eines oder zweier Agglutinine um 3 oder mehr Stufen ist eine nochmalige Untersuchung im allgemeinen nicht erforderlich. Ist aber keine Abschwächung der Agglutinine eingetreten, so muß der Versuch nochmals angesetzt werden.

Daß tatsächlich mit der *Holzerschen* Methode bessere Resultate zuweilen als mit der Agglutinbestimmung nach *Lattes* zu erzielen sind, mögen unter einer größeren Anzahl von Versuchen folgende Beispiele beweisen.

Angetrocknete Blutflecke auf Fließpapier von Prof. *Kathe* wurden 1 Monat nach dem Antrocknen geprüft.

Mit der *Lattes*-Methode: Fleck 1 und 2 wurden richtig als O und B bestimmt, bei 3 und 4 blieb die Agglutination von A- und B-Blutkörperchen aus, so daß diese Flecke als AB hätten bestimmt werden müssen. 1 Fleck davon gehörte tatsächlich der Gruppe AB an. Im Gegensatz dazu wurden nach der *Holzerschen* Methode in derselben Zeit alle 4 Flecke richtig bestimmt. Allerdings trat bei dem Fleck AB zunächst eine Abschwächung von Anti-A und Anti-B um nur 2 Stufen ein, und eine völlige Bindung der Agglutinine erfolgte auch nicht nach nochmaliger Prüfung.

Tuchflecke, die nach 14 Tagen bestimmt wurden, ergaben bei der *Lattes*-Methode bei 2 Flecken richtige Bestimmungen, bei 2 Flecken war keine richtige Bestimmung möglich. Bei der Agglutininbindung war nur an 1 Fleck die Bestimmung unsicher, die 3 anderen wurden sofort richtig bestimmt, der fragliche Fleck auch nach nochmaliger Prüfung. Nachdem diese Flecke unter den gleichen Bedingungen im Laboratorium in einem Schrank gestanden hatten, wurden sie nochmals geprüft, und zwar Papierflecke vom 23. X. 1931 am 18. III. 1932, so daß sie etwa 5 Monate angetrocknet waren. Eine direkte Prüfung der Agglutinine an

herausgeschnittenen Flecken ohne Anwendung des *Lattesschen* konzentrierten Fleckextraktes ergab nach dieser Zeit überhaupt keine verwertbaren Resultate mehr.

Papierfleck 1 agglutinierte nach der *Lattesschen* Methode Blutkörperchen A und B und wurde richtig als O bestimmt.

Papierfleck 2 agglutinierte nur Blutkörperchen B, wurde richtig als A bestimmt.

Papierfleck 3 und 4 agglutinierte weder Blutkörperchen A noch B, beide wurden als AB bestimmt. Fleck 4 war tatsächlich AB.

Nach der *Holzerschen* Methode wurde Fleck 1 gleichfalls als O bestimmt, da behandeltes Serum O A- und B-Blutkörperchen bis 1:32 agglutinierte. Bei Fleck 2 war Anti-A völlig entzogen, so daß er als A richtig bestimmt wurde.

Bei Fleck 3 war Anti-A abgeschwächt bis auf $1/16$, Anti-B bis auf $1/4$. Er wurde richtig als B bestimmt. Allerdings war auch das Anti-A abgeschwächt.

Bei Fleck 4 ergab die 1. Prüfung eine Abschwächung von Anti-A auf $1/8$, von Anti-B auf $1/16$. (Das verwandte Serum O hatte A und B deutlich bis $1/32$ agglutiniert.) Fleck 3 und 4 wurden nochmals angesetzt. Jetzt konnte Fleck 4 als AB richtig bestimmt werden, A war völlig entzogen, B bis $1/8$.

Bei Fleck 3 trat auch bei der 2. Prüfung keine völlige Bindung von Anti-B auf.

Tuchflecke vom 4. XI. 1931 wurden gleichfalls am 18. III. 1932, also nach $4\frac{1}{2}$ Monaten, nochmals geprüft. Mit der *Lattesschen* Methode konnte nur 1 Fleck, der Blutkörperchen B agglutinierte, als zur Gruppe A gehörig richtig bestimmt werden. Die 3 anderen Flecke ergaben keine Agglutination, wären also sämtlich als AB bestimmt worden, während wirklich nur 1 zur Gruppe AB gehörte.

Mit der *Holzerschen* Methode wurden 3 Flecke sofort richtig als O bzw. A und AB bestimmt. Bei dem 3. Fleck ergab sich eine fast völlige Bindung von Anti-B, aber auch eine Abschwächung von Anti-A. Eine nochmalige Prüfung ergab jedoch einen deutlichen Unterschied, da Blutkörperchen A noch bis $1/16$, Blutkörperchen B nur bis $1/4$ agglutiniert wurden. Immerhin war die Bestimmung als B etwas unsicher.

Den besten Beweis der Überlegenheit der *Holzerschen* Bindungsmethode gegenüber der Feststellung der Agglutinine nach *Lattes* ergab die Untersuchung von zwei zufällig aufgefundenen Blutproben, die ich am 14. III. 1928 zwei Leichen entnommen, als O und A bestimmt und auf Leinwand angetrocknet hatte. Die Herstellung eines konzentrierten wäßrigen Fleckextraktes und seine Prüfung mit Blutkörperchen A und B ergab keinerlei Agglutination, so daß also die Agglutinine aus beiden Flecken nach 4 Jahren verschwunden waren. Dagegen wurde von jedem Fleck am 30. III. 1932 0,01 g abgewogen und mit 1 ccm halb verdünntem Serum O versetzt. Am 31. III. wurde nach Ausschleudern das Serum geprüft. Es ergab Fleck 1 eine Agglutination von A- und B-Blutkörperchen bis zu einer Serumverdünnung 1 : 32 innerhalb 20 Minuten und wurde als O bestimmt, was auch der ursprünglichen Bestimmung entsprach.

Fleck 2 agglutinierte Blutkörperchen A nach 30 Minuten nur bis zu einer Serumverdünnung 1 : 4 schwach, Blutkörperchen B bis $1/32$, das Anti-A war somit aus dem Serum O durch den Blutfleck fast völlig gebunden. Der Fleck konnte als A richtig bestimmt werden.

Ich war an diese Bestimmung mit erheblicher Skepsis herangegangen und hatte nicht erwartet, daß nach so langer Zeit die Blutgruppenbestimmung noch gelingen würde; da aber beide Flecke gleichzeitig mit demselben Serum O und nachher dieses Serum mit den gleichen Blutkörperchen A und B geprüft wurde, war an dem deutlich sichtbaren Unterschied ein Zweifel nicht möglich, so daß tatsächlich noch nach 4 Jahren Antrocknens an den beiden Flecken die Blutgruppe richtig bestimmt werden konnte.

Zusammenfassung.

Die von *Holzer* beschriebene Technik zur Feststellung der agglutinablen Blutkörpercheneigenschaften in alten Blutflecken mittels der Agglutininbindung ergibt in der Tat nicht nur bei monate-, sondern auch bei jahrealtem angetrocknetem Blut zuweilen gute Resultate und erweist sich damit der Agglutininbestimmung an Blutflecken nach der *Lattesschen* Methode als überlegen. Zwar wird auch die Agglutininbindungsmethode gelegentlich Fehlresultate liefern, zumal wenn die agglutinablen Eigenschaften von vornherein schwach ausgebildet waren und dann nach kürzerer Zeit des Antrocknens schlecht nachweisbar sind. Es sind Kontrollen mit nicht blutbefleckten gleichartigen Stoffen notwendig und eine zweite Nachprüfung, falls der Blutfleck als zur Blutgruppe O gehörig bestimmt wird und anscheinend keine Agglutinine gebunden hatte. So sind Fehlresultate am ersten zu vermeiden. Da an angetrockneten Blutflecken mit den sonst üblichen Methoden die Gruppenbestimmung häufig mißlingt, ist in jedem Fall die Prüfung der agglutinablen Blutkörpercheneigenschaften mittels der Agglutininbindung in der von *Holzer* angegebenen Art bei alten Blutflecken angezeigt.

Anmerkung bei der Korrektur: Auf die Gruppenbestimmung durch Immunsera, siehe *Hirzfeld* u. *Amzel* dieser Zeitschrift, Bd. 19, ist absichtlich nicht eingegangen worden.

Literaturverzeichnis.

- ¹ *Landsteiner* u. *Richter*, Z. Med. beamte **1903**, 85. — ² *Lattes-Schiff*: Individualität des Blutes. Berlin 1925 — *Lattes*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **9** — Handbuch von Abderhalden, Tl. 2, H. 5. — ³ *Holzer*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **16** — Klin. Wschr. **1932**, 243. — ⁴ *Zipp*, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **18**. — ⁵ *Schiff*, *F.*, Technik. 3. Aufl. 1932.
-