

(Aus dem Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin der Universität Bonn.
Direktor: Prof. Dr. med. *F. Pietrusky*.)

Über die Untersuchungstechnik der Blutgruppeneigenschaften M und N und Mitteilung weiterer Untersuchungsergebnisse*.

Von
Dr. W. Crome.

In meinem Wiesbadener Vortrage** erwähnte ich, daß im vorliegenden Schrifttum die Untersuchungstechnik der Blutgruppeneigenschaften M und N meist recht kurz behandelt wird. Dies gilt auch von der Arbeit *Schiffs*¹: „*Die Technik der Blutgruppenuntersuchung usw.*“, worauf schon *Mayser*² in der Besprechung dieses Buches hinweist. Zustimmen kann ich diesem aber insofern nicht ganz, als er meint, daß die technisch schwierigen Untersuchungen nicht allein aus einer auch noch so ins einzelne gehenden Beschreibung erlernt werden können, vielmehr eigene Erfahrung voraussetzen, die am besten an Hand der Originalarbeiten gesammelt wird. Es empfiehlt sich vielmehr, seine theoretischen Kenntnisse durch *praktisches Unterweisenlassen* in geeigneten Instituten zu ergänzen.

Wenn ich schon damals die Frage des Bedürfnisses einer ausführlicheren Beschreibung der Technik besonders für den gerichtlichen Mediziner bejahen mußte, so wurde ich in dieser Ansicht noch bestärkt durch weitere eigene Erfahrungen bei Unterweisung einer Anzahl an der neuen Untersuchungsmethode Interessirter im hiesigen Institut.

Es liegt im Rahmen dieser Arbeit, daß wesentlich neue Gesichtspunkte zur Technik besonders für den Serologen nicht gebracht werden können. Sie richtet sich auch in erster Linie an die Vertreter der gerichtlichen Medizin, denen ja in hervorragender Weise gerade die Bearbeitung sog. Grenzgebiete naturwissenschaftlich-medizinischer Forschung obliegt. Trotz *ausdrücklicher Betonung* von Schwierigkeiten der Untersuchungstechnik sollen diese Ausführungen mit ihrer *unbe-*

* Herrn Prof. Dr. *Merkel* zu seinem 60. Geburtstage, am 7. VI. 1933, gewidmet.

** Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Gerichtliche und Soziale Medizin auf der 21. Tagung in Wiesbaden vom 27. bis 30. IX. 1932. Dtsch. Z. gerichtl. Med. **20** (1933).

rechtfertigen Überschätzung aufräumen; sie mögen weiterhin dazu beitragen, das Allgemeininteresse an der praktischen Betätigung mit dieser Untersuchungsmethode in weitesten Kreisen der gerichtlichen Medizin zu fördern, zumal durch viele Arbeiten aus gerichtlich-medizinischen Instituten einer engen Verbundenheit dieser mit der Blutgruppenforschung überhaupt wiederholt Ausdruck gegeben wurde.

Verschiedene triftige Gründe sind es, die es geradezu als notwendig erscheinen lassen, daß sich neben der Serologie, die ja ohne Zweifel die wertvollste Pionierarbeit zu leisten hat, auch die gerichtliche Medizin *praktisch* mit den Fragen der Blutgruppenfaktoren M und N zu befassen hat.

In der letzten Zeit mehren sich die Fälle, wo von den Gerichten auch die Untersuchung auf diese neuen Eigenschaften gefordert wird. Können die Untersuchungen an gerichtlich-medizinischen Instituten nicht ausgeführt werden, so würde es in Kürze dahin kommen, daß diesen Anstalten auch die Untersuchung auf die Eigenschaften A und B verlorengehen würde. Ein wichtiges Arbeitsgebiet wäre ihnen dann aus den Händen genommen. Soweit es sich hierbei lediglich um die Untersuchung in Vaterschaftssachen handelt, wäre dieser Zustand vielleicht noch erträglich. Die vorwiegend im naturwissenschaftlich-kriminalistischen Sinne geleiteten Institute würden aber hierdurch auch die Untersuchung von Gewebsflüssigkeiten und Blut in Flecken, Krusten usw. auf ihre Gruppenzugehörigkeit verlieren. Untersuchungen, die mit Erfolg nur ausführbar sind durch *dauernde praktische Tätigkeit* auf dem Gebiete der Blutgruppenforschung. Es liegt wiederum mehr in der Arbeitsrichtung des Serologen, daß er im allgemeinen weniger kriminalistisch interessiert ist als der gerichtliche Mediziner, und so ist es wohl auch kein Zufall, daß über Blutgruppenuntersuchungsbefunde an Blutflecken und -krusten gerade aus gerichtlich-medizinischen Instituten berichtet wird. Vorwegnehmend darf ich darauf hinweisen, daß eigene Untersuchungen auf M und N an derartigem Material durchaus ermutigende Resultate zeigen und weiter fortgesetzt werden.

Als sehr wesentlicher Punkt für die Notwendigkeit der Bestimmung von M und N in gerichtlich-medizinischen Instituten kommt ferner hinzu, daß es jedem erkennenden Richter im Bemühen um eine objektive Rechtsfindung sehr schwer fallen muß, sein Urteil auf naturwissenschaftlichen Untersuchungsbefunden aufzubauen, welche sich auf Methoden stützen, die angeblich so schwierig sind, daß sie von technisch geschickten Ärzten nicht gelernt und nur ganz wenigen Spezialisten anvertraut werden können. Die endgültige Anerkennung der Untersuchungsergebnisse der Blutgruppeneigenschaften M und N durch höchstrichterliche Entscheidungen als unumstößliches Beweismittel in Vaterschaftssachen kann fraglos nicht besser gefördert wer-

den als durch das mühselige Zusammentragen von Einzelergebnissen, sowohl durch Serologen wie gerichtliche Mediziner und durch das gemeinsame Empfehlen naturwissenschaftlich gesicherter Forschungsergebnisse beider Disziplinen, und zwar auf Grund eigener *praktischer Erfahrungen*.

Wenn in der Wechselrede zu den Wiesbadener Vorträgen *Seiffert**, der lediglich in seiner Eigenschaft als Serologe sprach — wobei aus dem „lediglich“ wohl entnommen werden sollte, daß er diese Untersuchungsmethode selbst nicht geübt hatte —, seine Ansicht dahingehend äußerte, daß diese Methode sehr kompliziert und schwierig sei und daher in die Hände des Spezialisten gehöre, so würde für diesen Fall die allgemeine Anerkennung der Brauchbarkeit der Methode und ihrer Ergebnisse sicherlich um Jahre hinausgezögert werden.

Vorbehaltlos ist aber all' denen zuzustimmen, die mit Recht davor warnen, durch *unsachgemäßes und kritikloses Herumantieren serologisch völlig Ungeübter* die ganze Frage von vornherein in *Mißkredit zu bringen*, ähnlich wie es vor Jahren mit den alten Blutgruppen war. Denn durch unberufene Untersucher und allerdings auch durch Fehlbestimmungen — gleichgültig ob durch Fehldiagnose oder Verwechslung —, die, worauf *Pietrusky** in Wiesbaden schon hinwies und worüber von *von Scheurlen*³ eingehend berichtet wird, keinem gerichtlich-medizinischen Institut, sondern in einem Fall einem bekannten Serologen zur Last zu legen sind, kam es zu jenem unerfreulichen Urteil des Kammergerichtes. Geraade um die Wiederholung derartiger Vorkommnisse zu verhindern, muß *daran festgehalten werden, daß jeder Untersucher mit einem gewissen Maß an serologischer Vorbildung und Kenntnissen sich eingehend in einem Institut über die Methodik und ihre Fehlerquellen auch praktisch unterrichten läßt* und hier *selbstständig* eine Reihe von Personen seiner Umgebung auf ihre Gruppenzugehörigkeit nach allen Regeln bestimmt, die ihm später als Blutspender zum Zwecke der Immunisierung, der Absorption der Rohseren oder zur Prüfung der Gebrauchsseren auf deren Spezifität, Reinheit und Titerstärke dienen sollen. Wenn *Schiff* in Wiesbaden die gegenteilige Ansicht äußerte, nämlich, daß jeder am besten allein seine Untersuchungen anfange, um an gemachten Fehlern die Fehlerquellen selbst kennenzulernen, um diese dann später besser zu vermeiden, so mag er hierfür ganz triftige Gründe haben. Eine Verallgemeinerung dieses Standpunktes würde folgerichtig und letzten Endes dazu führen, daß *jede praktische Unterweisung* Lernender sich in der Medizin überhaupt erübrigte. Für den gerichtlichen Mediziner würde es im besonderen Falle aber nur eine ungerechtfertigte Verschwendug von viel Zeit und Energie bedeuten, ohne der Sache selbst förderlich zu sein. Auch aus den Fehlern anderer lernen wir.

* Vgl. Fußnote zu S. 435.

Die *Immunisierungsmethode* von Kaninchen zur Gewinnung der rohen Anti-M- und Anti-N-Seren wurde von mir bereits in dem Wiesbadener Vortrag eingehend geschildert, so daß ich auf diese Ausführungen und auch weiterhin auf frühere Arbeiten von *Akune*⁴ und *Wolff*⁵ verweisen kann. Auch *Wolff* berichtete bei seinen Immunisierungsversuchen über ähnliche Erfahrungen, er konnte gleichfalls bei M-Kaninchen, die anfangs kein brauchbares Anti-M gebildet hatten, nach nochmaliger Behandlung derselben Tiere nunmehr zum Teil brauchbare Seren gewinnen. Jahreszeitliche Verhältnisse scheinen auch nach *Wolff* die Ergebnisse der Immunisierungsversuche zu beeinflussen, die Sommermonate sollen hierfür die geeignetsten sein.

Zum besseren Verständnis der Vorgänge bei der *elektiven Absorption* der Rohseren sei noch folgendes ausgeführt. Die mit OM- oder ON-Blut behandelten Kaninchen bilden bei der Immunisierung nicht nur die gewünschten *gruppenspezifischen* Agglutinine Anti-M oder Anti-N, wenn auch letztere bei brauchbaren Seren in stärkerem Maße, sondern auch neben *artspezifischen* Agglutininen „Anti-Mensch“ *weitere gruppenspezifische* Agglutinine besonders Anti-A, evtl. Anti-P und andere noch nicht näher identifizierte. Gleichzeitig treten im Serum eine Reihe anderer Antikörper wie Hämolsine, Präcipitine u. ä. auf. Das im Serum normalerweise enthaltene Komplement und die hitzeempfindlichen Antikörper wie Hämolsine werden durch die Inaktivierung für $1\frac{1}{2}$ Stunde bei 56° im Wasserbad zerstört. Die übrigen danach noch im Rohserum enthaltenen unerwünschten Antikörper müssen, soweit sie nicht durch eine *Serumverdünnung* schon in einen unwirksamen Verdünnungsgrad gebracht werden, durch die anschließende *Absorption* aus dem Rohserum entfernt bzw. noch weiterhin in einen Verdünnungsgrad gebracht werden, der die gruppenspezifischen M- und N-Reaktionen nicht mehr überlagert.

Dem *Absorptionsblut* muß in allen Fällen der Faktor M oder N fehlen, dessen Antikörper im Gebrauchsserum wirksam sein soll. Die Agglutinine „Anti-Mensch“ werden von den roten Blutkörperchen aller menschlicher Blutgruppen gebunden. In Rücksicht auf das meist in allen Rohseren stark enthaltene Anti-A muß vorwiegend Blut verwendet werden mit dem Faktor A. Um möglichst sicher zu gehen, auch andere erwähnte gruppenspezifische Antikörper zu binden, nehmen wir nach Möglichkeit immer Blute von verschiedenen Personen, die zur Blutgruppe A gehören und gleichzeitig auch Blute mit der Eigenschaft B und O.

Worauf schon *Akune*⁴ hinwies, gelingt es allein durch Verdünnung der Rohseren mit physiologischer Kochsalzlösung bei sehr starken Seren in Verdünnungsgraden, die sich nach eigener Beobachtung bis zu 1:32000 bewegen, in den letzten 2—3 Gläsern nur die spezifischen M- oder N-

Reaktionen zu erzielen, ohne daß diese in diesen Verdünnungen noch durch unerwünschte Reaktionen überlagert wurden. Praktisch ist diese Methode nicht verwertbar, weil die Grenze und Spanne zwischen den Verdünnungen, die noch unerwünschte Reaktionen geben und denen, wo nur noch die spezifischen M- und N-Reaktionen auftreten, zu gering und schwankend sind. Von diesen Beobachtungen ausgehend, habe ich die Rohseren in der letzten Zeit nicht mehr durchweg im Verhältnis 1:20, sondern bis 1:100 verdünnt. Abgesehen von dem geringen Vorteil, daß man hierbei weniger Rohserum verbraucht, kommt aber hinzu, daß man wesentlich geringere Blutmengen zur eigentlichen Absorption nötig hat, die unter Umständen nicht immer leicht zu beschaffen sind. Durch entsprechende Vorversuche läßt sich für jedes Serum feststellen, bei welchem Verdünnungsgrad und welcher Menge von roten Blutkörperchen durch die Absorption reine und dem Titer nach stärkste Seren zu erzielen sind. Bei Verdünnungen 1:40 oder 1:60 genügt in der Regel eine 2malige je $\frac{1}{2}$ Stunde dauernde Absorption mit je $\frac{1}{3}$ oder $\frac{1}{4}$ Volumen der 2mal gewaschenen und sedimentierten Blutkörperchen, das Volumen bemessen auf die Serummenge. Für den Anfang und vor genauerster Kenntnis der Eigenschaften eigener Rohseren wird es sich allerdings immer empfehlen, die Seren im Verhältnis 1:20 zu verdünnen und 2mal mit je $\frac{1}{2}$ Volumen roter Blutkörperchen zu absorbieren.

Die Absorption selbst erfolgt in größeren Reagensgläsern und nach Möglichkeit unter Einhaltung gewisser aseptischer Maßnahmen. Zu der abgemessenen Serumverdünnung wird tropfenweise die errechnete Blutmenge hinzugesetzt, das Gemisch bleibt stehen und wird einige Male leicht umgeschüttelt. Es erfolgt bald eine kräftige Verklumpung der roten Blutkörperchen, die sich dann nach dem anzuschließenden Zentrifugieren zu einem festen Ballen am Boden absetzen. Das Serum läßt sich ohne weiteres in ein zweites Glas abgießen, und es wird dann der zweite Teil der roten Blutkörperchen hinzugesetzt. Bei dieser zweiten Absorption kommt es in der Regel zu keiner grob sichtbaren Verklumpung mehr. Falls diese trotzdem noch auftreten sollte, sieht man daran schon, daß man eine dritte Absorption mit einer geringeren Blutmenge anschließen muß.

Zu beachten ist, daß Agglutination und Absorption zwar gleichsinnig, aber doch *quantitativ verschieden* verlaufen; es kommt noch zu einer Absorption, ohne daß Agglutination aufzutreten braucht. Man kann sich mehr bildlich vorstellen, daß bei der Absorption die Oberflächen der einzelnen Blutkörperchen mit den Antikörpern beladen werden, daß es aber erst zur Agglutination kommt, wenn dieser Vorgang ein hohes Ausmaß erreicht hat. Dies ist auch der Grund dafür, daß man, zumal bei Verwendung schwacher Seren, bei den Agglutinationsproben

keine zu dicken Blutkörperchenkochsalzaufschwemmungen, sondern solche von etwa 2,5% anwenden soll, da bei zu starken Aufschwemmungen die Antikörper zwar absorbiert werden, aber nicht mehr in genügender Menge vorhanden sind, um noch eine sichtbare Verklumpung herbeizuführen.

Nach der zweiten Absorption oder noch nachfolgenden, die sich zeitlich nicht unbedingt an die ersteren anschließen brauchen, und bei denen eine erhebliche Verklumpung der roten Blutkörperchen nicht mehr auftritt, empfiehlt es sich, nach Zentrifugieren das Serum nicht überzugießen sondern mit der Pipette abzuheben.

Die Absorption der Anti-N-Seren, die an sich schwieriger und launenhafter ist als die der Anti-M-Seren, wird von uns auch nach dem *Kopenhagener* Beispiel bei Zimmertemperatur ausgeführt. Da das Anti-N-Agglutinin labiler ist und von dem Absorptionsblut leichter unspezifisch vielleicht auch spezifisch gebunden wird, haben *Landsteiner* und *Levine*⁶ die Absorption der N-Seren bei 37° empfohlen. *Blaurock*⁷ absorbiert N-Seren $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° und 10 Minuten bei 22°. Um entsprechend seinen Angaben die Absorption für $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei 22° vor sich gehen zu lassen, habe ich die Gläser mit den Absorptionsgemischen teilweise während der Absorption in der Westentasche getragen, die im Durchschnitt eine Temperatur um 22° zeigt. Der Vergleich mit bei Zimmertemperatur absorbierten Anti-N-Seren ließ wesentliche Unterschiede in der Wirksamkeit beider Methoden nicht erkennen.

Besondere Sorgfalt und Exaktheit erfordert die *Prüfung* der absorbierten Seren und vorwiegend wieder der Anti-N-Seren auf ihre Reinheit gegenüber artspezifischen und unerwünschten gruppenspezifischen Reaktionen. Die Prüfung hat nicht nur mit der gewöhnlichen *Objektträger*-, sondern auch mit der bekannten *Zentrifugermethode* zu erfolgen.

Auf dem Objektträger bringt man je einen Tropfen des zu untersuchenden Serums mit einem Tropfen einer 2,5 proz. Blutkörperchenkochsalzaufschwemmung zusammen von Personen, die als Testblutspender ihrer Gruppenzugehörigkeit nach genauestens bekannt sind, die Eigenschaft O, A oder B haben und denen die Eigenschaften N oder M fehlen, deren Antikörper das zu prüfende Serum enthalten soll. Bevorzugen muß man Blut mit dem Faktor A von möglichst vielen Personen. Der Reaktionsverlauf wird unter leicht schaukelnden Bewegungen der Objektträger mindestens $\frac{1}{4}$ Stunde lang bei Zimmertemperatur beobachtet. Tritt nach Ablauf dieser Zeit keinerlei Verklumpung mehr auf, so kann man annehmen, daß die Seren bei Anwendung im diagnostischen Versuch unter den gleichen Versuchsbedingungen frei sind von noch wirksamen unerwünschten Agglutininen. Eine Ver-

dunstung der Tropfen läßt sich vermeiden durch Anwendung feuchter Kammern oder noch einfacher durch Hinzusetzen ganz geringer Mengen von physiologischer Kochsalzlösung vor Ablauf des Versuchs. Durch Verdunstung kann es gelegentlich zu einer gewissen „Verschmierung“ der Blutkörperchenaufschwemmungen kommen, die nach dem Zusatz von Kochsalzlösung wieder klar werden.

Die Objektträgermethode ist in allen Fällen, in denen man im diagnostischen Versuch auch mit der Zentrifugiermethode arbeiten will, zu ergänzen durch Prüfung mit der Zentrifugiermethode. Hierzu werden gleiche abgemessene Mengen Serum mit gleichen abgemessenen Mengen von Blutkörperchenkochsalzaufschwemmungen wieder von möglichst vielen Testblutspendern zusammengebracht. Die Gemische werden unter mehrmaligem Anschütteln 5 Minuten stehengelassen und dann 2 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert, wobei An- und Auslaufzeit der Zentrifuge nicht mitberechnet werden. Löst sich der Bodensatz hiernach wieder zu einer gleichmäßigen Verteilung der roten Blutkörperchen, so sind die Seren auch für die Zentrifugiermethode als genügend gereinigt anzusehen.

Hervorzuheben ist, daß Seren, die mit der Objektträgermethode geprüft, sich für diese Gebrauchsanzwendung als genügend rein zeigen, bei der Nachprüfung mit der Zentrifugiermethode zuweilen noch einen Bodensatz ergeben, der sich zwar wieder löst aber doch erst nach starkerem Beklopfen des Glases. Erklärt wird dieser Umstand dadurch, daß die Zentrifugiermethode schärfere Resultate gibt, und daß hierbei artspezifische oder auch unerwünschte gruppenspezifische besonders Anti-A-Agglutinine noch zur Wirkung kommen, wie das bei der Objektträgermethode und ihrer oben geschilderten Anwendungsart nicht mehr der Fall ist. Diese unerwünschten Agglutinine sind durch die Absorption in der Regel nicht restlos aus den Seren entfernt, sondern nur derartig verdünnt, daß sie nicht mehr wirksam sind und die spezifischen M- oder N-Reaktionen nicht stören. Es ist daher erforderlich, die Gebrauchsseren jeweils auf die im späteren diagnostischen Versuch anzuwendende Methode einzustellen, und man wird Seren, die man für die Zentrifugiermethode benutzen will, stärker absorbieren oder entsprechend mehr verdünnen müssen.

Parallel mit der Prüfung auf die Reinheit der Seren muß die Prüfung auf ihre *Titerstärke* gehen. Zu diesem Zweck stellt man sich aufsteigende Serumverdünnungen her. In das 1. Glas kommen 0,1 ccm Serum und in die folgenden 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Zu dem 2. Glas fügt man 0,1 ccm Serum hinzu, mischt Serum und Kochsalzflüssigkeit durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette gut durch und pipettiert 0,1 ccm dieses Gemisches in das 3. Glas und entsprechend in die folgenden. Aus dem letzten Glas werden 0,1 ccm des Serum-

Kochsalzgemisches entfernt. Man hat mithin in allen Gläsern 0,1 ccm Serum in aufsteigenden Verdünnungen $1/1$, $1/2$, $1/4$, $1/8$ usw. Zu diesen Serumverdünnungen werden dann je Glas 0,1 ccm einer etwa 2,5 proz. Blutkörperchenkochsalzaufschwemmung gebracht. Als Testblutkörperchen nimmt man zweckmäßig immer das gleiche OM-Blut für Anti-M-Seren und ON-Blut für Anti-N-Seren. Das Resultat wird abgelesen nach Zentrifugieren wie oben beschrieben oder nach Stehenlassen der Gläser für 2—4 Stunden bei Zimmertemperatur. Das Ablesen erfolgt mit dem bloßen Auge unter Anklopfen an den Boden des Reagensglases. Bei stark positiven Reaktionen (+++) löst sich der Bodensatz nicht in der darüberstehenden Flüssigkeit, die völlig klar bleibt. Bei noch starken Reaktionen (++) löst sich der Bodensatz in einzelnen noch größeren zusammenhängenden Flantschen, die Flüssigkeit bleibt klar. Bei noch positiven Reaktionen (+) löst sich der Bodensatz zu gerade noch makroskopisch sichtbaren einzelnen Klumpen, die Flüssigkeit wird durch sich verteilende rote Blutkörperchen undurchsichtig. Bei negativen Reaktionen (—) sieht man beim Anklopfen, wie sich die am Boden befindliche Schicht roter Blutkörperchen wirbelartig in der darüberstehenden Flüssigkeit verteilt, so daß es wieder eine gleichmäßige Aufschwemmung der roten Blutkörperchen gibt. Die Feststellung der Grenze zwischen noch positiven und schon negativen Reaktionen ist natürlich gleitend, sie hängt jeweils von dem subjektiven Ermessen des Untersuchers ab; es empfiehlt sich aber, die Resultate immer gleichmäßig nach bestimmt festgelegten eigenen Normen zu bezeichnen.

Die Austitrierung der Seren läßt sich auch auf Objektträgern ausführen, indem man durch tropfenweises Überpipettieren der Gemische von einem Tropfen zum anderen sich in der gleichen Weise aufsteigende Serumverdünnungen herstellt. Wenn man nach etwa $1/4$ ständigem Warten die Resultate dieser Objektträgermethode mit den Resultaten der Zentrifugiermethode vergleicht, so ergibt die erstere immer etwas niedrigere Werte, z. B. tritt bei der Objektträgermethode bis zu einer Verdünnung von 1:16 noch eine deutliche Verklumpung auf, während bei der Zentrifugiermethode mit dem gleichen Untersuchungsmaterial noch deutlich positive Resultate bei 1:32 und evtl. noch höher erkennbar sind. Die Seren sind nach beiden Methoden nicht nur gegen M- oder N-Blut, sondern auch gegen MN-Blut auszutitrieren. Auch hierbei fällt bei beiden Methoden die Reaktion für das heterozygote MN-Blut um die Hälfte schwächer aus. Die Austitrierung mit MN-Blut nach der Objektträgermethode empfiehlt sich immer bei den Anti-N-Seren, die stets einen wesentlich niedrigeren Titer haben als die Anti-M-Seren, um bei zu schwachen Seren, z. B. bei Anwendung der diagnostischen Objektträgermethode, zu vermeiden, ein MN-Blut fälschlich

für ein M-Blut anzusehen, eine Gefahr, die aber vermeidbar ist, wenn man zu schwache Seren, auf diese Weise geprüft, von vornherein ausscheidet.

Vor endgültiger Ingebrauchnahme so geprüfter Seren untersuche ich die Reaktion dieser Seren noch im Serienobjektträgerverfahren gegen etwa 50—100 Wassermannblute und sehe dann aus dem gefundenen prozentualen Anteil der Blute zur Blutgruppe MN, M und N, der sich schon bei diesen relativ kleinen Zahlen hier konstant um 50, 30 und 20 bewegt, daß die Seren gebrauchsfähig sind. Diese Eigenkontrolle kann auch sonst für den Anfänger in der neuen Untersuchungsmethode zur eigenen Übung wärmstens empfohlen werden.

Es ist selbstverständlich, daß sich die Prüfung der Seren auf Reinheit und Titerstärke schon für den gewöhnlichen Gebrauch sehr *häufig wiederholen* muß, besonders natürlich ist sie Vorbedingung vor jeder Untersuchung für gerichtliche Zwecke.

Was die Titerstärke der Gebrauchsseren anbetrifft, so fordert Schiff¹, daß ein Immunserum für forensische Zwecke kräftig genug ist, wenn es noch mindestens 10 Agglutinindosen enthält, d. h. wenn $\frac{1}{10}$ der im Versuch verwendeten Immunserummenge ebenfalls noch kräftig agglutiniert. Für Anti-M-Seren gelingt es meist ohne Schwierigkeiten reine Gebrauchsseren herzustellen, die nach der Zentrifugiermethode und gegenüber OM-Blut bemessen noch in einer Verdünnung bis 1:256 wirksam sind. In bezug auf die immer wesentlich schwächeren Anti-N-Seren bedarf die Angabe des Titers von 1:10 einer genaueren Fassung. Ich beziehe den Verdünnungsgrad auf die Menge von 0,1 ccm Serum und nicht auf die Gesamtmenge von 0,2 ccm, nämlich 0,1 ccm Serum + 0,1 ccm Blutkörperchenkochsalzaufschwemmung, die im Versuch zur Anwendung kommt. Danach spreche ich vom ersten Glas als von einer Verdünnung 1:1, vom zweiten 1:2, vom dritten 1:4 usw., wie aus der Tab. 2 ersichtlich ist. Meine für forensische Zwecke gebrauchten absorbierten Anti-N-Seren geben bei Austitrierung gegen ON-Blut mit der Zentrifugiermethode noch eine deutliche positive Reaktion bis über 1:16 bzw. 1:32 (5. bis 6. Glas), entsprechend bei Austitrierung mit MN-Blut bis 1:16 (5. Glas) und bei der Objektträgermethode mit MN-Blut bis 1:8 (4. Tropfen). Diese Forderung der Titerstärke muß man als hinreichend ansehen, und sie wird etwa dem entsprechen, was Schiff verlangt.

Die Seren werden im *Eisschrank* aufbewahrt. Wir haben zu diesem Zwecke einen gewöhnlichen elektrischen und sich selbst einschaltenden Haushaltskülschrank einrichten lassen durch Vergrößerung des eigentlichen Kühlkessels. Hierin herrscht eine ziemlich gleichbleibende *Minustemperatur* um 10°. Er dient zur Aufbewahrung der Kaninchentrophseren, die in kleinen Reagensgläschen mit Gummistopfen ver-

schlossen hier dauernd im gefrorenen Zustand gehalten werden, und zwar in Mengen, die über viele Jahre ausreichen würden. Während der jetzt $\frac{3}{4}$ Jahre dauernden Beobachtungszeit konnte eine Abschwächung dieser so behandelten Rohseren nicht beobachtet werden. In dem größeren eigentlichen Kühlraum herrschen am Boden Temperaturen um den 0-Punkt herum, hier werden die für den täglichen Gebrauch bestimmten Seren aufbewahrt. In den oberen Teilen des Kühlraumes liegen die Temperaturen um 1—2°, so daß sich hier das Blut aufbewahren läßt, ohne daß man Hämolyse durch Kälteeinwirkung zu befürchten hätte. Die Haltbarkeit der im großen Kühlraum aufgehobenen und nicht eingefrorenen Gebrauchsseren ist schwankend. Ein Teil derselben hatte schon nach $\frac{1}{2}$ Jahr die Wirksamkeit vollständig verloren, diese Seren rochen ziemlich stark nach Schwefelwasserstoff und waren durch bakterielle Vorgänge zersetzt. Andere wiederum hatten bei Prüfung zur gleichen Zeit nur unwesentlich an Stärke verloren; keimtötende Zusätze wurden in keinem Falle hinzugesetzt.

Die Stärke der *Agglutinogene M* und *N* scheint nach den bisher gemachten Beobachtungen gleichen Seren gegenüber nur wenig zu schwanken. Sie nimmt von Tag zu Tag ab, wenn man die roten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung auch im Eisschrank aufhebt, weniger wenn man sie in ihrem eigenen Serum beläßt, ein Vorgang, der von den alten Blutgruppen her bekannt ist.

Der diagnostische Versuch zur Untersuchung von Einzelpersonen, Mutter — Kind — Paaren, bei Familienuntersuchungen und von Wassermannbluten erfolgte serienmäßig mit der gewöhnlichen Objektträgermethode. Abhängig von der jeweiligen Stärke der Gebrauchsseren müssen hierbei positive Resultate schon nach einer halben bis einer Minute deutlich auftreten, und die Blutkörperchen müssen vollständig verklumpt werden. Negative Resultate dürfen auch bei Kontrolle nach mindestens $\frac{1}{4}$ Stunde keine Verklumpung zeigen; sollte diese gelegentlich unter dem Einfluß der Verdunstung spurenweise auftreten, so läßt sich die Diagnose trotzdem einmal am zeitlichen Ablauf der Reaktion stellen, anders bewirkt Zusatz von geringen Mengen physiologischer Kochsalzlösung zu dem Tropfen beim negativen Resultat wieder eine gleichmäßige Verteilung der roten Blutkörperchen, während bei positiven und fraglichen Reaktionen der Zusatz eine fragliche Verklumpung eher noch deutlicher und makroskopisch sichtbar macht. Bei derartigen gelegentlichen Zweifelsfällen ist nochmalige Nachprüfung mit demselben oder besser noch mit anderen Seren, evtl. auch mit der Zentrifugiermethode erforderlich.

Meine Zusammenstellung des Endresultates zeigt, daß schon diese einfache Untersuchungsmethode bei entsprechender Übung für *serienweise* Untersuchungen zuverlässige Resultate gibt. *Hingegen kann gar*

nicht bestimmt genug darauf hingewiesen werden, daß für gerichtliche Zwecke diese Objektträgermethode nur allgemein orientierenden Charakter haben kann, und daß sie durch weitere Untersuchungsmethoden ergänzt werden muß.

Wir gehen hier für alle gerichtlichen Untersuchungen so vor, daß gleichzeitig mit der Untersuchung auf die Zugehörigkeit zu den alten Blutgruppen genau wie bei diesen sowohl die Objektträger- wie die Zentrifugiermethode angewendet wird (vgl. Tab. I).

Tabelle I. Schema für Blutgruppenuntersuchung nach Objektträger- und Zentrifugiermethode.

Name: Gertrud Müller.

Bonn, den 3. III. 1933.

	Objekt- träger- methode	Zentri- fugier- methode		Objekt- träger- methode	Zentri- fugier- methode
Blutkörperchen- aufschwemmung	X + Ser. A = +	+	... + Anti-M-Ser. = +	+	+
	X + Ser. B = -	-	... + Anti-N-Ser. = -	-	-
	X + Ser. O = +	+	.	.	.
Ser. X + Testblutkörperchen- aufschwemmung	A := +	+	.	.	.
Ser. X + desgl.	B = -	-	Blutgruppe: B M.		

Als erste Kontrolle des hierdurch ermittelten vorläufigen Untersuchungsergebnisse titrieren wir nunmehr in der wie oben geschilderten Weise das zu untersuchende Blut quantitativ gegen Anti-M- und Anti-N-Seren aus (Vergleich 1, Tab. 2). Hierbei verwenden wir in der Regel die Zentrifugiermethode. Es empfiehlt sich sowohl für die Objektträger wie die Zentrifugiermethode und die Austitrierung jeweils verschiedene Seren zu nehmen, um auch schon so mögliche Fehlerquellen auszuscheiden.

Die wichtigste und unverlässliche Kontrolle hat durch den Absorptionsversuch zu erfolgen.

Als Vorversuch zu dem eigentlichen Absorptionsversuch müssen die Anti-M- und Anti-N-Seren, die später im eigentlichen Hauptversuch mit dem zu untersuchenden Blute absorbiert werden sollen, austitriert werden. Hierzu stellt man sich wieder steigende Serumverdünnungen her, und fügt zu diesen je die gleiche Menge 0,1 ccm 2,5 proz. Kochsalzblutkörperchenaufschwemmung von bekannten M- und N-haltigen Testblutspendern hinzu. Die Ablesung geschieht nach dem Zentrifugieren in der bekannten Weise. Um Serum zu sparen, braucht man die beiden ersten Gläser nicht einzuschalten (X) (Vergleich II, Tab. 2).

Für den eigentlichen Absorptionsversuch werden von den gleichen und im Vorversuch austitrierten Anti-M- und Anti-N-Seren je 0,3 ccm

Tabelle 2. Schema des Absorptionsversuchs für forensische Zwecke.
Name: Gertrud Müller.
Bonn, den

Name: Gertrud Müller.
Bonn, den 3. III. 1933.

I.		Zentrifugiert									
		1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512
Anti-M-Serum K. 106. 23. II. 1933 Blutkörperchenaufschwemmung von G. Müller : 0,1 ccm	Glas	x	++ +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anti-N-Serum K. 203. 28. I. 1933 Blutkörperchenaufschwemmung von G. Müller : 0,1 ccm	Glas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
II.		Zentrifugiert									
		1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512
Anti-M-Serum K. 104. 15. II. 1933 Testblutkörperchenaufschwemmung von Ö M 10 : 0,1 ccm	Glas	x	++ +	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anti-N-Serum K. 207. 24. I. 1933 Testblutkörperchenaufschwemmung von Ö N 71 : 0,1 ccm	Glas	x	++ +	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
III.		Zentrifugiert									
		1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512
a) Anti-M-Serum K. 104. 16. II. 1933 Blutkörperchen von Gertrud Müller		0,3 ccm
					0,1 ccm
b) Anti-N-Serum K. 207. 24. I. 1933 Blutkörperchen von Gertrud Müller		0,3 ccm
					0,05 ccm
IV.		Zentrifugiert									
		1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512
Abguß a) Testblutkörperchenaufschwemmung von Ö M 10 : 0,1 ccm	Glas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Abguß b) Testblutkörperchenaufschwemmung von Ö N 71 : 0,1 ccm	Glas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

verwendet. Das zu untersuchende Blut wird 2 mal gewaschen, das Waschwasser muß hiernach möglichst vollständig abgehebert werden, um eine Verdünnung des Serums durch verbleibendes Kochsalzwasser zu vermeiden.

Zu dem Anti-M-Serum wird $\frac{1}{3}$ Volumen dieser sedimentierten roten Blutkörperchen, also 0,1 ccm, und zu dem Anti-N-Serum $\frac{1}{6}$ Volumen, also 0,05 ccm hinzugesetzt.

Die Serumblutgemische werden für $\frac{1}{2}$ Stunde unter häufigerem Anschütteln stehen gelassen. Man kann hier eine deutliche Verklumpung der roten Blutkörperchen beobachten in den Fällen, wo diese den Faktor M oder N haben und dessen Antikörper jeweils in den betreffenden Seren enthalten sind, während beim Fehlen des betreffenden Faktors die Blutkörperchenserummischung völlig gleichmäßig verteilt bleibt. Nach Ablauf einer halben Stunde wird zentrifugiert. Wo Agglutination aufgetreten war, kann man das Serum einfach abgießen, im anderen Falle empfiehlt es sich, mit der Pipette abzuheben. Hieran schließt sich für eine halbe Stunde die zweite Absorption mit der gleichen angegebenen Menge Blutes. Nach Zentrifugieren wird dann das Serum abgehebert (Vergleich III der Tab. 2).

Von den 2 mal absorbierten Abgüssen werden nun wieder von 0,1 ccm ausgehend steigende Serumverdünnungen hergestellt. Während man aus Sparsamkeitsgründen im Vorversuch die ersten Gläser ausspielen konnte, muß man hier besonders in den Fällen, wo es zu einer Bindung der Agglutinine gekommen war, das erste Glas wieder einschieben. Zu diesen Verdünnungen wird dann je von den gleichen M- und N-enthaltenden Testblutkörperchenaufschwemmungen, wie im Vorversuch benutzt, 0,1 ccm hinzugesetzt. Das Resultat wird nach Zentrifugieren abgelesen (Vgl. IV, Tab. 2).

Bei Verwendung von 2 mal $\frac{1}{3}$ Volumen roter Blutkörperchen gegenüber Anti-M-Seren wird das Agglutinin bei Agglutininbindung in der Regel völlig aus dem Serum absorbiert. Bei negativer Reaktion tritt meist eine Abschwächung um ein Glas auf. Bei Verwendung von 2 mal $\frac{1}{6}$ Volumen Absorptionsblut gegenüber Anti-N-Seren gilt dasselbe, bei negativem Verlauf der Reaktion darf die Abschwächung des Titers 1—2 Gläser betragen. Die Absorptionsversuche werden bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Bei der Austitrierung der 2 mal absorbierten Abgüsse werden je 0,2 ccm Serum verbraucht, die 0,1 ccm restlichen Mengen lassen sich im Objekträgerverfahren und zur weiteren Sicherung der Diagnose noch gegen bekanntes MN-Testblut untersuchen.

Bei Erwachsenen läßt sich meist ohne Schwierigkeiten aus der Armvene die nötige Blutmenge erhalten, die man für diese Versuchs-

anordnungen gebraucht; sie muß mindestens 1—2 ccm betragen. Bei Kindern, wo die Venenpunktion meist nicht vorgenommen wird, zumal bei Einsendung des Blutes von auswärts, wird man kaum jemals diese nötigen Blutmengen erhalten.

Zahlreiche Vorversuche an vorher nach der geschilderten Methode absorbierten Blutproben haben gezeigt, daß man auch mit wesentlich geringeren Blutmengen den Absorptionsversuch durchführen kann, wobei sich das hierfür oben angegebene Mengenverhältnis zwischen Serum und Blutkörperchen genau einhalten läßt.

Bei Blutentnahmen von Kindern im Institut selbst benutzen wir Zwerkgreagengläschchen, geben 1 Tropfen 3 proz. Natriumcitratlösung hinein und füllen 4 Gläser mit Capillaren etwa bis zur Hälfte mit Blut, das sich am bequemsten aus der Großzehe entnehmen läßt. Das Serum wird abzentrifugiert und die Blutkörperchen werden in den Gläschchen 2mal gewaschen. Zu den gewaschenen und sedimentierten Blutkörperchen wird dann jeweils mit der Capillare tropfenweise Anti-M- und Anti-N-Serum zugesetzt, so daß die Blutkörperchenmenge bei dem Anti-M-Serum wieder $\frac{1}{3}$ und bei dem Anti-N-Serum $\frac{1}{6}$ des Serumvolumens ausmacht. Nach der ersten $\frac{1}{2}$ stündigen Absorption wird das Serum dann mit Capillaren auf die zweiten Gläser übertragen, die wieder $\frac{1}{3}$ bzw. $\frac{1}{6}$ Volumen roter Blutkörperchen enthalten. Die Austitrierung der 2mal absorbierten Seren erfolgt in der gleichen oben geschilderten Weise, indem man sich entweder in kleinen Reagensgläsern oder auf Objektträgern tropfenweise Serumverdünnungen herstellt, und zu diesen wieder tropfenweise gleiche Mengen der Testblutkörperchenkochsalzaufschwemmungen zusetzt. Um gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, muß man im Vorversuch in der gleichen Weise austitrieren wie nach der Absorption. Die so erhaltenen Untersuchungsergebnisse stehen bei exakter Handhabung der Methode den mit größeren Serum- und Blutmengen angesetzten Versuchen nicht nach.

Wo Blut auswärts von Ärzten zu entnehmen ist, lassen wir dieses in etwa 15 Capillaren einschmelzen und blasen das Blut dann zur Absorption in 4 Zwerkgreagengläschchen aus. Beim Waschen muß man für diesen Fall auf die völlige Beseitigung der Fibringerinnsel verzichten. Diesem Umstand Rechnung tragend, pflegen wir Anti-M- und Anti-N-Seren dann 2mal mit je $\frac{1}{3}$ Volumen zu absorbieren.

Aus Gründen der Selbstkontrolle und um späteren Nachuntersuchern die Möglichkeit zu geben, sich über unsere Untersuchungsmethoden zu orientieren, halten wir es für erforderlich, genaue Angaben über Nummer des Serums, Tag der Absorption, Bezeichnung der Testblutkörperchenspender und über die Untersuchungsergebnisse zu machen, die wir den Gerichtsakten beilegen (Vergleich, Tab. 2).

Untersuchungsergebnisse.

Einschließlich der in Wiesbaden* mitgeteilten Befunde belaufen sich unsere Untersuchungen bislang auf 3800 Einzelfälle. Hiervon entstammen 2500 Blutproben Wassermannbluten, der Rest Einzeluntersuchungen von Ortsansässigen, Studenten, Leichenbluten, Familienuntersuchungen, Mutter-Kind-Paaren und Vaterschaftssachen.

Das gleichzeitige Fehlen beider Eigenschaften M und N wurde niemals beobachtet.

Die prozentuale Verteilung der neuen Blutgruppen, auf die Gesamtmenge berechnet beträgt 49,6% MN, 30,8% M und 19,6% N.

Da bei allen Fällen auch die alten Blutgruppen einschließlich der Serumprüfung mit untersucht wurden, können wir die *Kombination* der alten und neuen Blutgruppen prozentual angeben. Sie beträgt

19,0% O MN,	12,7% O M,	8,0% O N,
23,9% A MN,	14,3% A M,	9,0% A N,
5,0% B MN,	2,4% B M,	2,2% B N,
1,7% AB MN,	1,4% AB M,	0,4% AB N.

Hieraus ergeben sich für die Blutgruppe O = 39,7%, A = 47,2%, B = 9,6% und AB = 3,5%.

Der Erbgang wurde an 32 Familien mit 82 Kindern untersucht, das Ergebnis ist in Tab. 3 festgelegt.

Tabelle 3. Befunde an 32 Familien mit 82 Kindern.

	Zahl der untersuchten Eltern-paare	Zahl der untersuchten Kinder	Kinder		
			M	N	M N
M × M	5	16	16	—	—
N × N	1	3	—	3	—
M × N	4	11	—	—	11
MN × MN	9	18	4	4	10
MN × M	9	27	13	—	14
MN × N	4	7	—	1	6
	32	82	33	8	41

Fernerhin wurde der Erbgang untersucht an 486 Mutter-Kind-Paaren mit 498 Kindern. Das Material setzt sich zusammen aus 415 Müttern mit 416 Neugeborenen, deren Nabelschnurblut untersucht wurde. Der Rest stammt von Vaterschaftsfällen und einzelnen Mutter-Kind-Paaren. Von den 486 Müttern gehörten 136 zur Blutgruppe M und 91 zur Blutgruppe N. In *keinem Falle wurde bei diesen homozygoten Müttern ein entgegengesetzt homozygotes Kind beobachtet*.

* Vgl. Fußnote S. 435.

4 eineige Zwilling spaare hatten die gleiche Blutgruppe.

Von *46 Vaterschaftssachen* konnten wir auf Grund der Untersuchung auf M und N 3 Fälle angeblicher Vaterschaft ausschließen.

Literaturverzeichnis.

- ¹ *Schiff*, Die Technik der Blutgruppenuntersuchung für Kliniker und Gerichtsärzte. Berlin: Julius Springer 1932. — ² *Mayer*, Ref. Dtsch. Z. gerichtl. Med. **20**, H. 1, 52 (1933). — ³ *v. Scheurlen*, Münch. med. Wschr. **46**, Nr 20, 847 (1929). — ⁴ *Akune*, Z. Immun.forsch. **41**, 147 (1931). — ⁵ *Wolff*, Z. Rassenphysiol. **5**, H. 4, 159 (1932). — ⁶ *Landsteiner u. Levine*, J. of exper. Med. **47**, 757; **48**, 731 (1928). — ⁷ *Blaurock*, Münch. med. Wschr. **79**, Nr 39, 1552 (1932).
-