

(Aus dem Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin der Universität Halle a. d. S.
Direktor: Professor Dr. Walcher.)

Der Nachweis von Agglutininen schwächster Wirksamkeit¹. (Eine Methode zur Bestimmung der Agglutinine im Serum von Säuglingen in den ersten Lebensmonaten.)

Von

Dr. A. Ponsold,

Assistent am Institut.

Mit 2 Textabbildungen.

Schrifttumsübersicht.

I. Säuglingseigenagglutinine und die Beimischung von Agglutininen der Mutter.

Eigene Serumeigenschaften des Kindes gelten bei der Geburt als noch nicht nachweisbar. Sie kommen in den ersten Lebensmonaten, spätestens in den ersten 2 Lebensjahren zur deutlichen Entwicklung (*Schiff*). Sind jedoch Agglutinine vor dieser Zeit nachzuweisen, so kann es sich um solche handeln, die von der Mutter übergetreten sind, denn nur in ganz seltenen Fällen sollen sich die Eigenagglutinine vor der Geburt entwickeln. Das von der Mutter übergetretene Agglutinin bleibt im Blute des Säuglings einige Tage (*Morville*), Wochen oder auch $\frac{1}{2}$ Jahr lang (*Thomsen*) nach der Geburt erhalten, ohne bei Gruppenfremdheit zwischen Mutter und Kind einen schädigenden Einfluß auf den Säugling ausüben zu können (*Rupp, Liedberg*).

II. Das Zwischenstadium nach Ausscheidung der Agglutinine der Mutter und vor der Bildung der Agglutinine des Säuglings.

Sind nun die von der Mutter übergetretenen Agglutinine ausgeschieden und die Eigenagglutinine des Säuglings noch nicht zur völligen Reife gelangt, so tritt ein Stadium ein, in dem *keine Agglutinine nachweisbar* sind. Dieses Stadium kann sich über das 1. Vierteljahr oder auch noch länger erstrecken.

Ist innerhalb dieser Zeit eine Blutgruppenuntersuchung vorzunehmen, so kann mit den üblichen Methoden die Blutgruppenzugehörigkeit zumeist lediglich an den Eigenschaften der Blutkörperchen festgestellt werden, wobei dem Grundsatz, eine Blutgruppenbestimmung erst dann als gesichert anzusehen, wenn sowohl an den Blutkörperchen als auch am Serum die Eigenschaften bestimmt sind, nicht entsprochen werden kann.

In einem zu erstattenden Gutachten wird dann darauf hingewiesen, daß die Blutgruppenbestimmung nicht auch am Blutwasser durchgeführt werden konnte, weil die serologische Reifung noch nicht eingesetzt hatte oder die Abgabe des Gutachtens wird zurückgestellt, da für gerichtliche Zwecke ein solches nur auf

¹ Vorgetragen auf der 22. Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin in Hannover, September 1934.

Grund eines vollständig durchgeführten Kreuzversuches abgegeben werden darf. In jedem Falle, wo die Serumeigenschaften noch nicht zu bestimmen sind, muß die Untersuchung in gewissen Zeitabständen wiederholt werden, bis ein einwandfreies Ergebnis zutage tritt (*Raestrup*).

Bei der Transfusion im Säuglingsalter kommt es im *Empfängerserum* nur auf die *Agglutinine* an (*Bürkle de la Camp*). Da diese nicht immer ausgebildet sind, so wird man unter Umständen bei Neugeborenen eine Transfusion machen können, obwohl nach der Gruppenbestimmung, welche nur die Agglutinogene bestimmt, eine solche nicht zulässig wäre. Man wird aber trotzdem immer gut daran tun, in solchen Fällen nicht auf den Nachweis der Agglutinine im Empfängerserum zu verzichten (*Beck*), denn das Neugeborene darf nicht als Allgemeinpfeiler betrachtet werden; der Transfusion muß eine serologische Vorprobe auch am Empfängerserum vorausgehen (*Breitner*).

Die Methode.

I. Grundsätzliches: Quantitative Gesichtspunkte.

Beim Nachweis von Agglutininen bei Erwachsenen wird für gewöhnlich im Verhältnis zu dem zu untersuchenden Serum doppelt, zu gleichen Mengen, oder halb so viel Testmaterial (einer 1—10proz. Aufschwemmung) hinzugesetzt. Dieses Verhältnis von Testkörperchen zu Serum erscheint uns für den Nachweis von Agglutininen schwächster Wirksamkeit nicht als günstig, weil hierbei eine Unmenge von Blutkörperchen von einer ganz geringen Menge von Agglutininen zusammengeballt werden soll. Wir modifizieren daher die übliche Technik dahin, daß wir das zu untersuchende Serum in einem anderen Verhältnis mit Testmaterial, nämlich 100 (*Serum*): 1 (*Blutkörperchen*) — *hundert zu eins* — versetzen und zwar mit einer 1proz. Testkörperchenaufschwemmung. Hierbei werden dem Serum nicht mehr Blutkörperchen zugesetzt, als die Agglutinine zu agglutinieren imstande sind.

Mit diesem Zusatz von ganz geringen Mengen Testmaterial (etwa 1 mg) wird auch eine *Verdünnung der Agglutinine* durch das Aufschwemmungsmittel der Testblutkörperchen *vermieden*, worauf es ebenso sehr ankommt, wie auf die geringe Menge bzw. Konzentration der Blutkörperchen.

II. Die Ausführung der Methode im Capillarröhrchen.

Den Säuglingen wird das Blut aus der Ferse in einem U-förmig gebogenen Capillarröhrchen (*Neissersches U-Röhrchen*) entnommen und in diesem Röhrchen auch zentrifugiert. Hierbei sammeln sich die Blutkörperchen zur Krümmung hin an, während das Serum die beiden Schenkel einnimmt. Durch Abfeilen werden die Blutkörperchen vom Serum abgetrennt.

Der die Blutkörperchen enthaltende gebogene Teil wird in ein Zwergreagensgläschen getan, wobei das Capillarröhrchen in der Krümmung zu durchbrechen ist, damit sich der Blutkuchen herauslösen kann. Danach werden einige Tropfen physiologische Kochsalzlösung dem noch im Capillarröhrchen befindlichen Blutkuchen zugesetzt und das Zwergreagensgläschen zur Aufschwemmung der Blutkörperchen geschüttelt.

A. Der Zusatz von Testblutkörperchen.

1. Die Menge.

Der Inhalt der beiden Schenkel (= das Serum) wird je in ein Glascapillarröhrchen (10 cm lang, 0,5 mm weit, möglichst dünnwandig), die etwa bis zur Hälfte anzufüllen sind, übertragen.

Nun läßt man die Serumsäule an das eine Ende des Capillarröhrchens fließen, so daß der Rand des Meniscus der Flüssigkeit mit der Öffnung des Röhrchens abschließt. Das andere Ende des Röhrchens wird mit dem Finger zugehalten. Jetzt wird 1 Tropfen Testblutkörperchenaufschwemmung (1proz.) an die Öffnung des Capillarröhrchens bzw. an das Ende der Serumsäule herangehalten, bis Blutkörperchen 1—2 mm tief (= etwa 1 mg) in das Serum eindringen. Danach wird der herangehaltene Tropfen entfernt und der zuhaltende Finger vom anderen Ende weggenommen. Diese Maßnahme zum Zusetzen von Testblutkörperchen kann 3—4 mal wiederholt werden, ohne daß ein übermäßiger Zusatz von Blutkörperchen zu befürchten ist.

2. Die Anhäufung auf einen beschränkten Bezirk.

Die Menge der auf diese Weise zugesetzten Testblutkörperchen erscheint sehr gering. Sie ist jedoch ausreichend, wenn die Testblutkörperchen nicht über die ganze Serummengge verteilt, sondern nur an einer Stelle der Serumsäule angesammelt belassen werden, wobei die Agglutinine trotzdem zur Wirkung gelangen. Würde man die Testblutkörperchen mit dem Serum mischen und sie gleichmäßig verstreuen, dann würden sie so weit auseinander zu liegen kommen, daß eine Agglutination kaum eintreten bzw. wahrgenommen werden könnte. Damit die Blutkörperchen aber zusammenbleiben, ist ein Mischen zu vermeiden, und zwar wird das durch Verschließen (Zuschmelzen über der Flamme) des Endes des Capillarröhrchens erreicht, an dem die Blutkörperchen zugesetzt wurden. Vor dem Zuschmelzen wird durch Senken des anderen Endes die Serumsäule auf 2—3 cm von dem Ende des Röhrchens entfernt.

Durch dieses Verschließen wird auch ein Verdunsten an der Serumsäule, besonders da, wo sich die Blutkörperchen befinden, für die Dauer der Reaktionszeit vermieden. Wenn die Blutkörperchen nicht an dem *Ende* der Serumsäule zugesetzt worden wären, würde die Verdunstung — wie das sonst bei der Capillarmethode der Fall ist — überhaupt keinen Einfluß ausüben können.

Die Capillare wird jetzt in horizontale Lage gebracht, wobei die zugesetzten Testblutkörperchen sich allmählich über einen kurzen Abschnitt des Capillarröhrchens an dem Ende der Serumsäule gleichmäßig in einer dünnen Schicht ausbreiten, ohne dabei den „Zusammenhang“ untereinander zu verlieren.

Das Capillarröhrchen bleibt nun während der Reaktionsdauer (1—4 Stunden) bis zur Auswirkung der Agglutinine horizontal liegen. Hierzu kann es in einen Capillarröhrchenständer¹ gesteckt werden.

¹ Zu beziehen durch die Firma Kaempff & Co., Halle a. d. S., Gr. Steinstraße 85.

*B. Das Ablesen der Resultate (= das Erkennen von Agglutinen).***1. Die Apparatur (Mikroskop).**

Für gewöhnlich beginnt die Wirksamkeit der Agglutinine schon innerhalb der ersten $\frac{1}{2}$ Stunde in Erscheinung zu treten. Bei einer *Untersuchung* nach einer längeren Reaktionsdauer (*nach etwa 4 Stunden*) ist jedoch der Ausfall der Reaktion leichter zu erkennen.

Für die Feststellung von Agglutinen dieser Art ist die Beobachtung unter dem Mikroskop erforderlich (obgleich die Capillarmethode an sich, wie wir sie ursprünglich beschrieben¹ haben, eine makroskopische Methode ist), denn es handelt sich ja hierbei um Reaktionen an einer sehr kleinen Menge von Blutkörperchen.

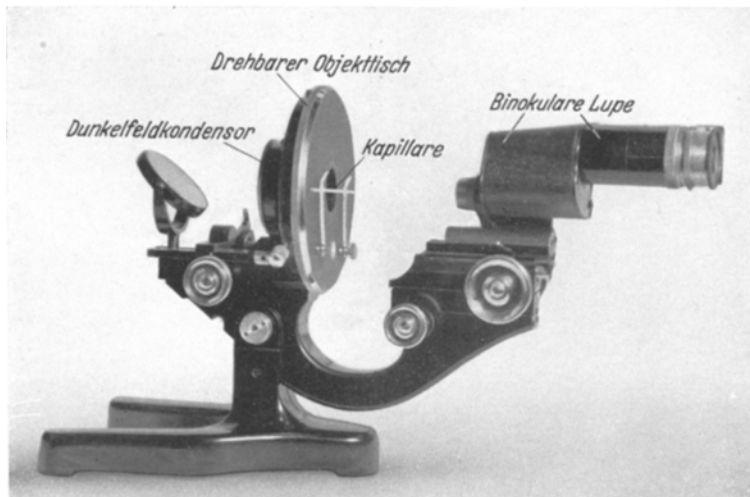


Abb. 1. Stellung des Mikroskopes zur mikroskopischen Betrachtung des Capillarröhrchens. Der Dunkelfeldkondensor sowie die binokulare Lupe sind nicht unbedingt erforderlich. Das Capillarröhrchen ist so einzuklemmen, daß es um seine Längsachse gedreht werden kann.

Zur Beobachtung wird das Capillarröhrchen — nach sorgfältiger äußerer Säuberung — wie ein Objektträger auf den Objektisch gelegt und vorsichtig angeklemt. Ein drehbarer Objektisch und ein Kreutztisch, wodurch das Capillarröhrchen in jede beliebige Lage gebracht werden kann, erleichtern die Untersuchung erheblich, ebenso wie die Verwendung des Dunkelfeldes (Abb. 1).

Wir empfehlen hierzu den sog. *Plankton-Kondensor*, einen Trockenkondensor mit besonders langer Brennweite (Apertur 0,5—0,8), denn die üblichen Kondensoren sind infolge ihrer kurzen Brennweite nicht geeignet, ein genügend großes Feld auszuleuchten. Mittels dieses Kondensors wird ein praktisch reflexfreies, dabei sehr kontrastreiches Bild erzielt. Die Untersuchung erfolgt bei mittlerer Vergrößerung, nur wenn es auf die Differenzierung von Pseudoagglutinen, insbesondere auf die Feststellung von Geldrollenbildung, ankommt, wird eine stärkere Vergrößerung (evtl. Ölimmersion) angewandt.

¹ Ponsold, Die Capillarmethode. Münch. med. Wschr. 1933, Nr 41, 1594.

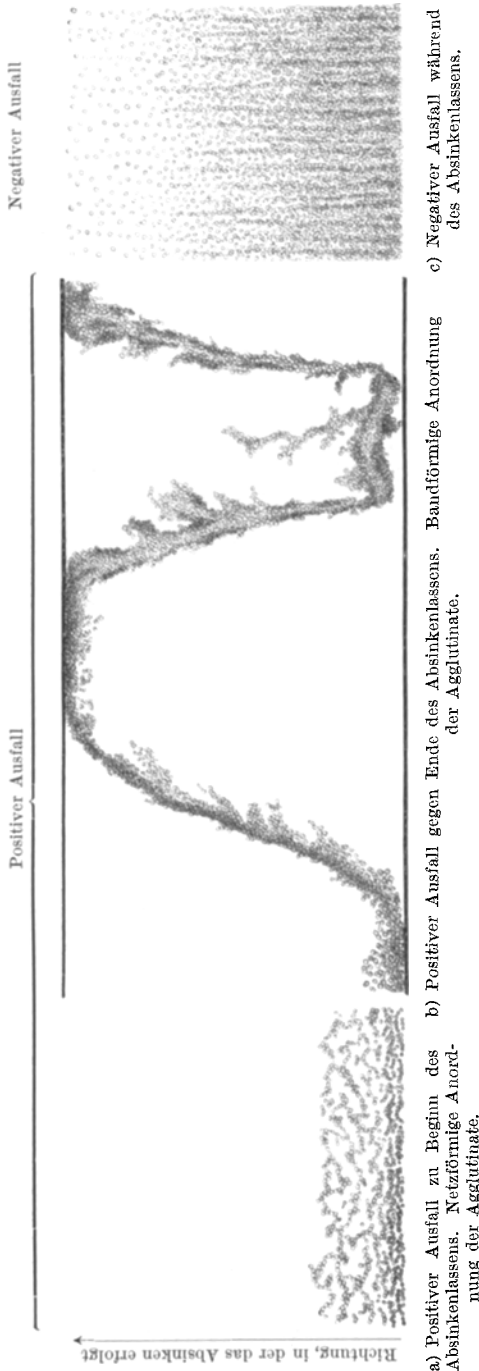


Abb. 2. Im mikroskopischen Bilde sinken die Blutkörperchen innerhalb des Capillarröhrchens in der Richtung von unten nach oben ab (wie dargestellt).

Die beste Übersicht wird erreicht, wenn an Stelle des Tubus die *binokulare Lupe* (Abb. 1) verwendet wird.

2. Das Untersuchen während des Sedimentierenlassens.

Um die Blutkörperchen absinken lassen zu können, wird das Capillarröhrchen so um seine Längsachse gedreht, daß sie nun in den oberen Teil des Röhrchens zu liegen kommen (d. h. im mikroskopischen Bild nach unten). Das Sedimentieren erfolgt in Querrichtung zur Längsachse des Röhrchens von Wandung zu Wandung *bei waagerechter Lage des Capillarröhrchens* und horizontal gestelltem Tubus des Mikroskopes.

Der Gegensatz zwischen positivem und negativem Ausfall der Reaktion ist am stärksten ausgesprochen *zu Beginn des Absinkens* der Blutkörperchen nach dem Ablauf einer längeren Reaktionszeit, denn im späteren Verlaufe der Beobachtung verteilen sich die nicht-agglutinierten Blutkörperchen so über das Serum, daß sie sich dem Blick fast entziehen.

a) Bei positivem Ausfall.

Ist die Agglutination besonders stark ausgefallen, so sinken die *Agglutinate* nicht im einzelnen, sondern *als zusammenhängendes Ganzes, als ein Bandstreifen* ab (Abb. 2b). Hierbei läßt sich beobachten, wie sich einzelne Teile dieses

Streifens früher von der Wandung lösen, andere daran länger haften bleiben. Durch dieses ungleichmäßige Ablösen gewinnt der Blutkörperchenstreifen in seiner Gesamtheit ein arkadenförmiges Aussehen. Diese Anordnung der noch zusammenhängenden Agglutinate fällt bei der Beobachtung besonders in die Augen und läßt keinen Zweifel mehr darüber bestehen, daß eine Agglutination eingetreten ist. Allerdings dürfen nicht zu wenig Blutkörperchen zugesetzt sein, denn dann bilden sie keinen kontinuierlichen Streifen, sondern nicht-zusammenhängende Gruppen.

b) Bei negativem Ausfall.

Ist eine Agglutination nicht eingetreten, so lösen sich die Blutkörperchen einzeln aus dem Sediment heraus und beginnen abzusinken (Abb. 2c). Sie lösen sich jedoch *nicht von Anfang an als einzelne Blutkörperchen* heraus, sondern sinken zunächst noch in Gruppen ab. Darauf ist besonders zu achten, denn sonst können Agglomerate für Agglutinate gehalten werden. Es handelt sich jedoch hierbei nur um vorläufig noch bestehenbleibende Verklumpungen zufälliger Art, nämlich um solche durch das längere Zusammenliegen der Blutkörperchen während der Reaktionszeit. Im Verlaufe der Beobachtung teilen sich diese völlig auf. Bei echter Agglutination hingegen lösen sich zu Beginn des Sedimentierens (Abb. 2a) keine Gruppen aus dem Zusammenhang.

Bei dem negativen Ausfall der Reaktion ist noch auf eine besondere Art von Pseudoagglutinaten, auf die Geldrollenbildung zu achten. Um sie nicht zu übersehen, ist mit der starken Vergrößerung (evtl. Ölimmersion) jedes Agglutinat einzeln zu betrachten.

Auf diese Geldrollenbildung ist besonders deswegen zu achten, weil nichtgruppenspezifische Verklumpungen („irreguläre, paradoxe“) *nur* in einer solchen Form in Erscheinung treten.

III. Die Untersuchungsergebnisse.

Die den Receptoren entsprechenden Agglutinine ließen sich mittels der Capillarmethode im frühen Säuglingsalter, seien es Tage, Wochen oder Monate, bei jedem der von uns untersuchten Säuglinge (etwa 150 Fälle) nachweisen. Mit den sonst üblichen Methoden gelingt *der Nachweis* zwar auch dann und wann — je nach dem Grade der „serologischen Reifung“ —, *mit der Capillarmethode gelingt er jedoch ausnahmslos*. Wir haben in dieser Richtung nicht ein einziges Mal ein Mißlingen der Untersuchung zu verzeichnen, auch nicht bei frühgeborenen oder marantischen Säuglingen.

IV. Die Beurteilung der festgestellten Serumeigenschaften.

Die Blutgruppenzugehörigkeit von Säuglingen in den ersten Lebensmonaten kann an den Serumeigenschaften, insbesondere beim Vorliegen der Gruppe „O“, ebenso festgestellt werden wie an den Blutkörpercheneigenschaften.

Die Möglichkeit einer stattgehabten *Beimengung maternaler Agglutinine* spielt dabei *keine Rolle*, denn bei Gruppengleichheit von Mutter und Kind ist die Herkunft der Agglutinine von der Mutter ohnehin nicht zu erfassen; und da, wo nichtentsprechende (paradoxe, irreguläre) Verklumpungen auftreten, sind diese von entsprechenden Agglutinaten durch die Geldrollenbildung zu unterscheiden.

Auf diese Geldrollenbildung ist besonders zu achten, denn sie ist die *Hauptquelle etwaiger Fehlbestimmungen*. Würde diese Geldrollenbildung nicht mitunter eintreten, so würde die Feststellung eines positiven oder negativen Ausfalles der Reaktionen kaum Schwierigkeiten machen.

V. Die praktische Bedeutung der Methode.

A. Die forensische Bedeutung.

In der Blutgruppenlehre gilt der Grundsatz, eine Blutgruppenbestimmung erst dann als gesichert anzusehen, wenn die Eigenschaften nicht nur an den Blutkörperchen, sondern auch am Serum festgestellt sind. Diese Forderung konnte in der gerichtsärztlichen Praxis bisher nicht in jedem Falle erfüllt werden. Da nun aber die Möglichkeit besteht, die Agglutinine im Säuglingsalter nachzuweisen, braucht also eine in diese Zeit fallende Begutachtung weder hinausgeschoben noch auf Grund einer unvollständig durchgeführten Blutprobe abgehen zu werden.

B. Die klinische Bedeutung (Transfusion).

Da die Blutgruppenbestimmung mittels der Capillarmethode nun bei Neugeborenen und bei Säuglingen in den ersten Lebensmonaten auch am Serum durchgeführt werden kann, braucht bei der Transfusion auf den Nachweis der Agglutinine nicht mehr verzichtet zu werden, sondern es kann jeder Transfusion eine serologische Vorprobe vorausgehen.

Zusammenfassung.

1. Die Blutgruppenzugehörigkeit kann an Neugeborenen und bei Säuglingen im frühesten Lebensalter an Hand der Serumeigenschaften

ebenso bestimmt werden wie bisher allein auf Grund der Blutkörpereigenschaften.

2. Für den Nachweis von Säuglingsagglutininen ist

a) der Zusatz einer zu großen Menge von Testblutkörperchen zu vermeiden,

b) eine Verteilung der Testblutkörperchen über das Serum zu verhindern, und zwar dadurch, daß die Testblutkörperchen auf einen bestimmten (begrenzten) Abschnitt innerhalb des Serums angehäuft werden, und

c) eine Verdünnung der Agglutinine durch die Aufschwemmungsflüssigkeit der Testblutkörperchen zu vermeiden.

3. Die Möglichkeit einer Beimengung von Agglutininen seitens der Mutter spielt bei der Bestimmung der Blutgruppenzugehörigkeit keine Rolle, da entsprechende Agglutinate die Bestimmung bestätigen und nichtentsprechende Zusammenballungen stets als Geldrollenbildungen auftreten.

Literaturverzeichnis.

- Berardi, A., Atti Congr. pediatr. ital. **1928**, H. 1, 465—468. — Björum, A., u. T. Kemp, Acta path. scand. (Kopenh.) **1929**, 218—235. — Breinert, B., Die Bluttransfusion. Wien: Julius Springer 1926. — Bürkle de la Camp, H., Die Bluttransfusion. Handbuch der Blutgruppenkunde von Steffan. München: Lehmanns Verlag 1932. — Chavass, F. B., Brit. med. J. **1921** I, 641. — Deilmann, G., Blutgruppenbestimmung bei 150 Müttern und ihren Neugeborenen. Inaug.-Diss. Göttingen 1929. — Z. Geburtsh. **96**, 102—121 (1929). — Dychno, M. A., u. G. D. Derischinsky, Arch. Gynäk. **142**, 741—749 (1930). — Edgecombe, J. of Path. **33**, 963 bis 979 (1930). — Friedenreich, V., Z. Immun.forsch. **7**, 314—330 (1931). — Fujitaka Chigeaki, Mitt. med. Ges. Tokio **43**, 1237—1260, dtsh. Zusammenfassung 1237 bis 1238 (1929). — Halban, Wien. klin. Wschr. **1900**, 545. — Hamburger, Chr., Z. Rassenphysiol. **3**, H. 2, 67—70 (1930). — Hamburger, Maurice, L'iso-agglutination. Groupes sanguins du nouveau-né et du nourrisson. Paris: Louis Arnette 1927. — Happ u. Zeiler, J. amer. med. Assoc. **82**, 227 (1924). — Hara u. Wakao, Jb. Kinderheilk. **1926**, 313. — Hess, R., Dtsch. med. Wschr. **1921**, 241—242. — Hirszfeld, Erg. Hyg. **8**, 367. — Konstitutionsserologie. Berlin: Julius Springer 1928. — Hirszfeld u. Zborowski, Klin. Wschr. **1925**, Nr 24, 1152. — Holzer, Josef, Klin. Wschr. **1929** II, 2427. — Jacobs, Grete, Untersuchungen über den Übertritt der Blutgruppenagglutinine von der Mutter auf die Frucht. Inaug.-Diss. Köln 1932. — Jones, Amer. J. Dis. Childr. **22**, 586—597 (1921). — Kaboth, Arch. Gynäk. **137**, 727—730 (1929). — Kemp, P., Acta Path. et Microbiol. Scand. **7**, Nr 1/2, 146—156 (1930). — Koller, Th., Schweiz. med. Wschr. **58**, Nr 11, 299—300 (1928). — Arch. d. Julius-Klaus-Stift. f. Vererbungsforsch. Soziol., anthropol. u. Rassenhyg. **2**, H. 3/4, 247—272 (1926). — Koller, Th., u. U. M. Meier, Arch. Klaus-Stiftg **3**, H. 3/4, 219—238 (1928). — Landsteiner, K., u. Philip Levin, J. of Immun. **17**, 1—28 (1929). — Liedberg, N., Acta Path. et Microbiol. Scand. **6**, Nr 1, 1—38 (1929). — MacQuarrie, J., Bull. Hopkins Hosp. **34**, 51—59 (1923). — von Oettingen u. Witebsky, Münch. med. Wschr. **1928**, 385. — Oku, Magoshiro, Jap. J. Obstetr. **13**, 472—523 (1930). — Ponsold, A., Münch. med. Wschr. **1933**, Nr 41, 1594. —

Ponsold, A., Dtsch. Z. gerichtl. Med. **22** (1934). — *Puikonen, T.*, Acta Path. et Microbiol. Scand. Suppl. **5**, 64—65 (1930). — *Raestrup, G.*, Die Blutgruppenkunde in der gerichtlichen Medizin. Handbuch der Blutgruppenkunde von Steffan. München: Lehmanns Verlag 1932. — *Rech u. Wöhlisch, Z.* Biol. **84**, 515 (1926). — *Rooks, G.*, Eesti Arch. **10**, 473—483 u. dtsh. Zusammenfassung S. 483 (1931). — *Rupp, H.*, Arch. Gynäk. **134**, Nr 1, 80—145 (1930). — *Semzowa, O. M.*, u. *A. A. Terechowa*, Klin. Wschr. **1929 I**, 206—209. — *Schiff, F.*, Klin. Wschr. **7**, Nr 28, 1317—1320 (1928). — *Thomsen, Oluf*, Finska Läk.sällsk. Hdl. **71**, 786 bis 803 (1929) — Z. Rassenphysiol. **5**, 122—129 (1932). — *Werkgartner, A.*, Wien. klin. Wschr. **41**, Nr 8, 291 (1928).
