

Absättigungsversuch und Mischagglutination

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis der Ausscheidereigenschaft

Ernst Schulz

Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg (BRD)

Eingegangen am 15. Oktober 1973

Absorption Method and Mixed Agglutination

Comparative Studies on the Secretor Status

Summary. Through the absorption test it is possible differentiate between the secretions of a secretor or non-secretor. The mixed agglutination method, on the other hand, is not suitable for establishing the secretor characteristic. A and B group substances corresponding with the blood group can be found regularly by this method even in the saliva, sperm and vaginal secretion of non-secretors. The AB0 (H) substances, which can be determined through hemagglutination inhibition in the absorption test, i.e. the secretor characteristic (Se), is based on a secretion process dependant on active cell performance. Specific antigen positive mixed cell reactions in secretion of non-secretors are caused by group substances in low quantities transgressing into the secretion independent of any specific antigen secretion mechanism.

Secretors secrete H substances independent of the AB0 blood group and members of the groups A, B and AB additional antigens corresponding with the blood group. We found exceptions to this rule in vaginal secretion and sweat.

Zusammenfassung. Die Unterscheidung, ob es sich um Sekret eines Ausscheiders oder Nichtausscheiders handelt, ist durch den Absorptionsversuch (Absättigungsversuch) möglich. Die Mischagglutinationsmethode eignet sich hingegen nicht zur Feststellung der Ausscheidereigenschaft. Mit ihr sind regelmäßig auch im Speichel, Sperma und Vaginalsekret von Nichtausscheidern A- und B-Gruppen-Substanzen entsprechend der Blutgruppe nachweisbar. Den AB0(H)-Substanzen, die durch Hämagglutinationshemmung im Absorptionsversuch nachweisbar sind, also der Sekretor(Se)-Eigenschaft, liegt ein Sekretionsvorgang im Sinne einer aktiven Zelleistung zugrunde. Spezifische Antigen-positive Mischzellreaktionen an Sekreten von Nichtausscheidern beruhen darauf, daß Gruppensubstanzen in geringen Mengen auch unabhängig von einer besonderen Antigen-Sekretionsleistung in die Sekrete übertreten.

Sekretoren scheiden unabhängig von der AB0-Blutgruppe H-Substanz aus, Angehörige der Gruppen A, B und AB darüber hinaus das der Blutgruppe entsprechende Antigen. Ausnahmen von dieser Regel fanden wir im Vaginalsekret und Schweiß.

Key words: Absorptionsversuch — Ausscheidereigenschaft — Blutgruppen, Ausscheidereigenschaft — Mischagglutination.

Über die von Schiff u. Sasaki im Jahre 1932 entdeckte Ausscheidereigenschaft, also die Fähigkeit oder Unfähigkeit einer Person, AB0(H)-Antigene entsprechend der Blutgruppe in Sekreten auszusecheiden, werden auch gegenwärtig noch widerstreitende Meinungen geäußert. Insbesondere ist strittig, ob es sich bei dieser Eigenschaft um ein den Mendelschen Gesetzen unterliegendes System handelt

und ob die Einordnung einer Person in ein solches System in jedem Falle möglich ist.

Die Beobachtung sogenannter „Übergangstypen“ (Holzer, 1937; Matsunaga u. Suzuki, 1958; Morganti *et al.*, 1959) wurde als Argument gegen die Existenz des Ausscheidersystems ins Feld geführt. Da aber auch darauf hingewiesen wurde, daß es von der Untersuchungsmethode allein abhängen könne, ob ein Mensch als Ausscheider oder Nichtausscheider in Erscheinung tritt, muß das Vorkommen von „Übergangstypen“ wiederum als zweifelhaft und unbewiesen erscheinen. Die Widersprüche hatten zur Folge, daß das Ausscheidersystem sich bei der Klärung strittiger Vaterschaftsverhältnisse nicht durchsetzen konnte.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen einer weiteren Klärung der aufgezeigten Fragen dienen, darüber hinaus aber auch methodische Probleme beim Nachweis von Substanzen des AB0-Systems außerhalb des Blutes behandeln.

Methodik und Material

AB0(H)-Substanzen sind im Speichel und anderen Sekreten nicht an corpusculäre Elemente gebunden. Ihr Nachweis ist demzufolge nicht direkt durch Agglutination wie bei den Erythrocyten möglich, sondern über den Umweg der spezifischen Absorption zugeführter Agglutinine. Wenn Blutgruppensubstanzen im Sekret vorhanden sind, werden entsprechende Agglutinine gebunden. Dies ist an einer Titerenkung oder einem Ausbleiben der Agglutination zu erkennen, wenn Testblutkörperchen hinzugefügt werden, die mit dem Antiserum reagieren müßten.

Bei der Untersuchung von Speichel, Sperma, Vaginalsekret, Harn und Schweiß auf AB0 (H)-Substanzen fanden folgende Methoden Anwendung:

a) Agglutininbindungs- bzw. Absättigungsversuch (Schiff, 1926; Prokop, 1963): Den Verdünnungsstufen des Antiserums (Anti-A, Anti-B, Anti-H bzw. Lectin-H) werden gleiche Mengen des zu untersuchenden Substrats zugesetzt. Wenn im Speichel die dem Antiserum entsprechende Gruppensubstanz vorhanden ist (z. B. Antigen A—Anti-A), so reagiert sie mit den von Stufe zu Stufe geringer werdenden Antikörpern. Von einer bestimmten Verdünnungsstufe an werden die Antikörper in einem Maße gebunden, daß bei Zugabe homologer Testerythrocyten eine Agglutination ausbleibt. Das Ausmaß der Agglutinationshemmung kann als quantitatives Maß des Antigengehaltes des Speichels gewertet werden.

b) „Screening“-Test mit Lectin-H (Extrakt aus Samen des europäischen Stechginsters): Lectin-H von der Firma Dade, Miami, USA, wird 1:6 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Zu 1 Tropfen der Verdünnung wird in kleine Teströhrchen 1 Tropfen des zu untersuchenden Speichels gebracht und durchmischt. Nach 10minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur werden frische 0-Blutkörperchen (2%ig) hinzugegeben. Nach weiteren 5 min wird zentrifugiert (1 min, 1000 U/min).

Die Beurteilung auf Agglutination erfolgt makroskopisch:

1. Keine Agglutination: Ausscheider, weil Lectin-H durch die H-Substanz des Speichels gebunden wurde.

2. Agglutination: Nichtausscheider. Eine Agglutininbindung durch den Speichel hat nicht stattgefunden.

c) Mischagglutination mit nichtvorbehandelten Blutkörperchen: Das trockene sekretbenetzte Fasermaterial wird in zarte Fibrillen zerspleißt und auf hydrophobierte Röhrchen, entsprechend der Zahl der Antiseren, verteilt. Die Inkubation mit jeweils 2—3 Tropfen Antiserum erfolgt über 12 Std bei 4°C. Anschließend wird das Spurensubstrat mehrmals mit kleinen Mengen physiologischer Kochsalzlösung zur Entfernung freier Antikörper gewaschen. 2—3 Tropfen 1%ige Aufschwemmung frischer Testerythrocyten werden hinzugegeben. Nach 10 min ist das Spurensubstrat vorsichtig auf einen Objektträger zu übertragen, mit einem Deckgläschen zu bedecken und mikroskopisch zu beurteilen. Blutkörperchenagglutinate werden als positive Reaktion gewertet.

d) Mischagglutination im „unterschwelligen Antikörpermilieu“ (Schulz, 1970):

1. Das sekretgetränkte oder oberflächlich mit Sekret benetzte Textilgewebe, das eine Größe von 1×1 mm nicht zu übersteigen braucht, wird fein zerzupft. Blutspuren sind vorher 10 min lang in Methanol zu fixieren.

2. Die Stoffasern werden in kleine Röhrchen, die einen Durchmesser von 6–8 mm haben und nicht hydrophobiert sein müssen, gebracht. Dann wird jeweils 1 Tropfen Antiserum (Immunserum) zugegeben. Die Einwirkungsdauer muß mindestens 30 min bei 4°C betragen.

3. Die nichtgebundenen Antikörper lassen sich durch 3–5maliges Waschen mit jeweils ca. 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung entfernen. Die Waschflüssigkeit ist mit einer Glas-capillare, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, abzusaugen. Selbstverständlich muß vermieden werden, daß Untersuchungsmaterial mit abgesaugt wird. Als Beweis dafür, daß alle nichtgebundenen Antikörper entfernt sind, darf die letzte Waschlösung zu keiner Agglutination mit homologen Erythrocyten führen.

4. Nach dem letzten Absaugen werden 2–3 Tropfen einer Erythrocytenaufschwemmung (0,1–0,5%ig) im unterschwelligen Antikörpermilieu hinzugegeben. Es wird kurz aufgeschüttelt und 20 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Antikörpermilieu wird auf folgende Weise hergestellt:

Zunächst wird mit entsprechenden Testblutkörperchen das verwendete Antiserum titriert. Für den Versuch wird dann eine Antikörperverdünnung gewählt, die um zwei Stufen über dem Titer des Serums liegt.

Hat das Antiserum also einen Titer von 1:128, wird für die Aufschwemmung der Test-erythrocyten eine Verdünnung des Antiserums von 1:512 verwendet. Da bei dieser Antikörperverdünnung eine Agglutination nicht eintritt, sprechen wir von einem „unterschwelligen Antikörpermilieu“. Eine Agglutination tritt erst ein, wenn weitere homologe Antikörper hinzukommen, bei der Mischagglutination also diejenigen, welche am antigenhaltigen Substrat gebunden sind.

5. Das Spurensubstrat wird vorsichtig mit einem feinen Metallhaken mit etwas Flüssigkeit auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt. Es besteht auch die Möglichkeit, die Fasern an die Wand des Gläschens zu bringen, so daß sie dort haften und direkt im Gläschen mikroskopisch beurteilt werden können.

Speichel wurde von männlichen und weiblichen Personen im Alter von 7–63 Jahren gewonnen. Es wurden von diesen Personen 2–10 ml Speichel mit Hilfe von Plastikhalmen direkt in Gläschen gebracht. Der Speichel wurde entweder sofort oder nach längstens 24 Std Aufbewahrung bei 4°C zentrifugiert (3000 U/min, 5 min), filtriert und untersucht. Es wurde darauf geachtet, daß die Speichelspender 30 min vor der Speichelgewinnung weder gegessen noch getrunken hatten. Die Sekretproben wurden im *Absättigungsversuch* mit Anti-A- und Anti-B-Immunseren sowie mit Lectin-H unter Verwendung einer 0,1–0,5%igen Test-erythrocytenaufschwemmung auf Tüpfelplatten in geometrischer Verdünnung des verwendeten Serums untersucht. Zur Bestimmung der A- und B-Antigene wurde eine Speichelverdünnung von 1:100 in physiologischer NaCl-Lösung gewählt. Die H-Wirksamkeit wurde bei einer Speichelverdünnung von 1:50 ermittelt (Beispiel einer Gruppenbestimmung im Speichel einer A₁-Person s. Tabelle 1). Diese Verdünnungen haben sich als optimal erwiesen. Unspezifische Agglutininbindungen, die nach Prokop (1963) durch unverdünnten Speichel auftreten können, sind nicht mehr zu befürchten. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei Zimmertemperatur in der feuchten Kammer. Nach Zugabe der Testerythrocyten wurden die Tüpfelplatten auf einer langsam und gleichmäßig sich bewegenden Platte belassen, die Beurteilung erfolgte makroskopisch nach 20 min.

Bei der *Mischagglutination* wurde als Trägermaterial des Speichels wie bei allen weiteren Versuchen zur Darstellung von Gruppensubstanzen in Sekreten weißes Leinen oder Watte verwendet. 5 × 5 mm große Stückchen eines Leinengewebes oder etwas ausgezupfte Watte wurden mit Speichel getränkt, indem sie 5 min lang in unverdünnten, jedoch vorher zentrifugierten und filtrierten Speichel gebracht und dann getrocknet wurden.

Die *Spermaproben* wurden teils gleich nach der Verflüssigung untersucht, teils bis zu 20 Tagen bei –20°C im tiefgefrorenen Zustand aufbewahrt. Im *Absättigungsversuch* wurde Spermplasma in einer Verdünnung von 1:5 verwandt. Zur Trennung von Spermplasma und Spermatozoen wurde das Ejaculat zentrifugiert (3000 U/min, 10 min). Beim *Absättigungs-*

Tabelle 1. Agglutininbindung (Absättigungseffekt) eines A-Sekretor-Speichels. Verdünnung des Speichels bei Anti-A und Anti-B 1:100, bei Lectin-H 1:50. Kontrollen mit physiologischer NaCl-Lösung. Im vorliegenden Falle Agglutininbindung von Anti-A und Lectin-H

	2	4	8	16	32	64	128
Anti-A-Verdünnungsreihe, zu jeder Stufe 2 Tropfen A ₁ -Speichel 1:100 verdünnt	+++	++	—	—	—	—	—
Anti-A-Verdünnungsreihe, zu jeder Stufe 2 Tropfen physiologischer NaCl-Lösung (Kontrolle)	+++	+++	+++	+++	++	+	—
Anti-B-Verdünnungsreihe, zu jeder Stufe 2 Tropfen A ₁ -Speichel 1:100 verdünnt	+++	+++	+++	+++	++	+	—
Anti-B-Verdünnungsreihe, zu jeder Stufe 2 Tropfen physiologischer NaCl-Lösung (Kontrolle)	+++	+++	+++	+++	++	+	—
Lectin-H-Verdünnungsreihe, zu jeder Stufe 2 Tropfen A ₁ -Speichel 1:50 verdünnt	++	+	—	—	—	—	—
Lectin-H-Verdünnungsreihe, zu jeder Stufe 2 Tropfen physiologischer NaCl-Lösung (Kontrolle)	+++	+++	++	+	+	—	—

versuch beschränkten wir uns auf Spermaplasma, da dieses das gruppenserologische Verhalten von Spermaspuren bestimmt.

Vaginalsekretabstriche wurden uns von der Poliklinik der Universitäts-Frauenklinik Würzburg zur Verfügung gestellt¹. Die Scheidenabstriche stammten von Frauen, bei denen weder krankhafte Prozesse der Vagina und Cervix noch Genitalblutungen vorlagen.

Das Sekret wurde mit Wattestiel tupfern bei Speculumuntersuchungen im hinteren Drittel der Vagina entnommen, anschließend 12 Std an der Luft getrocknet und meist am gleichen Tage oder längstens nach 4 Tagen auf Gruppensubstanzen untersucht. Zur Durchführung des *Absättigungsversuchs* wurden von einem Abstrichtupfer 3mal je ca. 5 mg sekrethaltige Watte fein zerzupft und in 3 Glasröhrchen gegeben. Zum Inhalt der Röhrchen wurden jeweils 2 Tropfen Antiserum (Anti-A-Immunserum Titer: 1:128, Anti-B-Immunserum Titer: 1:128, Lectin-H) hinzugegeben. — Inkubationszeit 12 Std bei 4°C, Titerbestimmungen auf Tüpfelplatten, Kontrollen mit nichtsekrethaltiger Watte.

Die Ausscheidereigenschaft ermittelten wir im Absorptionsversuch an Filterpapierstreifen, die mit Speichel getränkt worden waren.

Bei der *Mischagglutination* benutzten wir die sekrethaltige Watte der Tupfer.

Der für die Untersuchungen benötigte *Schweiß* wurde auf folgende Weise gewonnen: 29 Personen, in kleine Gruppen aufgeteilt, hielten sich in einem Raum mit einer Temperatur von 36°C auf. Der Schweißausbruch wurde durch Trinken von heißem Lindenblütentee beschleunigt. Die austretenden Schweißtropfen wurden, um Verunreinigungen durch Epithelzellen möglichst zu vermeiden, mit Capillaren aufgefangen. Innerhalb von 45—90 min konnten auf diese Weise meist ca. 2 ml Schweiß gesammelt werden. Das Sekret wurde anschließend im kochenden Wasserbad 20 min lang erhitzt, dann bis zur Verwendung maximal 6 Tage lang bei 4°C aufbewahrt. Vor der Untersuchung wurde der Schweiß bei 5000 U/min 5 min lang zentrifugiert.

1 Die Untersuchungen von Vaginalsekret wurden gemeinsam mit R. Sobotka, die Schweißuntersuchungen mit H. M. Mayer durchgeführt.

Der Absorptionsversuch mit dem flüssigen Schweiß wurde in üblicher Weise mit Anti-A-Immunserum (Titer 1:256), Anti-B-Immunserum (Titer 1:256) und Lectin-H durchgeführt. Jeder Versuch wurde doppelt angesetzt. — Kontrollen mit physiologischer NaCl-Lösung, Inkubationszeit 48 Std, Testerythrocyten 0,1—0,5%ig.

Während des Schwitzens wurden beiderseits in den Achselhöhlen der Versuchspersonen Leinenläppchen völlig durchfeuchtet. Der Absorptionsversuch und die Mischagglutination wurden an dem vorher 20 min lang bei 80—90°C erhitzten Stoff vorgenommen.

Die AB0(H)-Ausscheidung im *Harn* von Sekretoren kann als gesichert gelten. Sie wurde durch Agglutininbindung im Absorptionsversuch nachgewiesen (Kirk *et al.*, 1951; Schaidt, 1958; Rackwitz u. Stichnoth, 1959; Gibb, 1965).

Die eigenen Untersuchungen beschränken sich auf die Anwendbarkeit der Mischagglutinationstechnik im Antikörpermilieu zur Feststellung der AB0-Gruppe in Urinflecken.

Ergebnisse

Speichel

Im Speichel von 305 Personen wurde die Sekretoreigenschaft im *Absättigungsversuch* und im „*Screening*“-*Test* mit Lectin-H bestimmt. Die Zuordnung zum Se- oder se-Typ war in jedem Falle eindeutig möglich. Beide Methoden führten zu analogen Ergebnissen.

Ausscheider der Gruppen A, B und AB besaßen ohne Ausnahme H-Substanz und das der Blutgruppe entsprechende Antigen A, B oder A + B.

Das Ausmaß der Agglutininbindung war unterschiedlich. Bei der in Tabelle 1 dargestellten Technik betrug der Absättigungseffekt durch A- und B-Substanz 3—6 Titrationsstufen, der durch H-Substanz 2—4 Stufen.

Von 305 Personen waren 255 (83,6%) als Ausscheider, 50 (16,4%) als Nichtausscheider einzuordnen.

Die *Mischagglutination* mit nichtvorbehandelten Testerythrocyten ergab an Textilfasern, die mit Sekretorspeichel benetzt waren, intensive Reaktionen. Entsprechend dem hohen Antigengehalt des Speichels fanden sich zahlreiche Agglutinate und reihenförmige Anlagerungen der Blutkörperchen. Aber auch bei Nonsekretoren waren mit diesem Verfahren spezifische Reaktionen allerdings recht unterschiedlicher Intensität zu erzielen. Im Gegensatz zu dem Bild der Mischagglutination, wie wir es regelmäßig am Sekretorspeichel beobachten, fanden sich bei Nichtausscheidern häufig zahlreiche freie, nicht an den Fasern haftende Agglutinate. Schwache Reaktionen waren durch Anwendung der Mischagglutination im Antikörpermilieu regelmäßig zu verstärken.

Bei der Mischagglutination am 0-Nichtausscheiderspeichel mit Lectin-H traten ebenso wie am 0-Ausscheiderspeichel Agglutinate auf. Die Reaktion kann jedoch nicht als spezifisch für die Blutgruppe 0 gewertet werden, da gleiche Befunde auch am Speichel von Trägern anderer Gruppen zu beobachten sind.

Sperma

Bei 47 Männern im Alter von 20 bis 45 Jahren mit einer Normospermie konnten wir die Gruppenbestimmung sowohl am Sperma als auch am Speichel vornehmen und mit der im Blut ermittelten AB0-Gruppe vergleichen. Bei weiteren 45 Proben (27 waren in ihrem Zellanteil pathologisch verändert), die aus der Universitäts-Hautklinik stammten, bestand diese Möglichkeit nicht. Zur Durchführung der

Mischagglutination wurde Sperma (Gesamtsperma) in gleicher Weise wie Speichel an Fasern angetrocknet.

Die im Absättigungsversuch am Spermaplasma erhobenen Befunde lassen ohne Ausnahme die Feststellung zu, ob A-, B- oder H-Substanz ausgeschieden wurde oder nicht.

In den Fällen 1—47 entsprachen die im Sperma und Speichel beobachteten Agglutininbindungen einander und stimmten überein mit der im Blut ermittelten AB0-Eigenschaft.

Mit Hilfe der *Mischagglutination* ließ sich auch im Sperma von Nichtausscheidern die AB0-Gruppe erkennen. In allen Fällen, in denen Vergleiche mit Speichel und Blut nicht angestellt werden konnten, waren eindeutige spezifische Agglutininbindungen und Mischagglutinationsreaktion zu beobachten, so daß nach unseren Erfahrungen mit den Fällen 1—47 die Blutgruppe und die Ausscheidereigenschaft abgeleitet werden konnten. Bei den Spermaproben mit pathologisch verändertem Zellanteil ergab sich kein Anhalt für eine Störung der AB0(H)-Ausscheidung.

Geringe Titerensenkungen im Absättigungsversuch fanden sich wiederholt bei Nichtausscheidern oder waren nicht der Blutgruppe entsprechend. Da es sich jedoch nur um Titerreduktionen von 1 Stufe handelte, wurden sie nicht als Ausdruck einer sicheren Agglutininbindung angesehen.

Vaginalsekret

Das Vaginalsekret von 86 Frauen wurde im Absorptionsversuch auf seine Anti-H-Bindungsfähigkeit untersucht und mit dem am Speichel ermittelten Sekretorstatus verglichen. Eine sichere Anti-H-Bindung wurde bei einer Titerreduktion des Lectin-H von mindestens 2 Stufen angenommen. Speichel und Vaginalsekret aller 86 Frauen zeigten mit 2 Ausnahmen bei Frauen der Blutgruppe A im Absorptionsversuch ein gleichsinniges Verhalten ihres H-Bindungsvermögens. Bei den beiden Ausnahmen war zwar reichlich A-Substanz vorhanden, doch fehlte in einem Falle H-Substanz vollständig, im anderen Falle wurde nur in geringem Maße Anti-H gebunden.

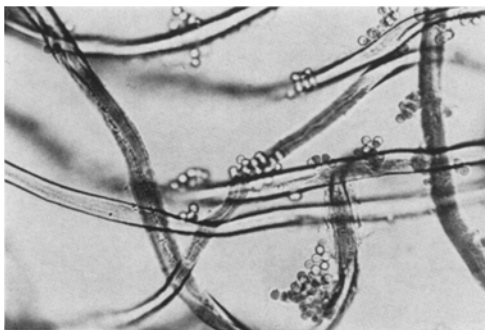


Abb. 1. Mischagglutination an einer Sperma-„Spur“. Spermatozoen finden sich nicht an den Fasern, da sie durch das wiederholte Waschen vor Zugabe der Testerythrocyten entfernt wurden

Tabelle 2

Darstellung von 4 Fällen mit ungewöhnlichem serologischen Verhalten des Vaginalsekrets

Blutgruppe Se/se- Eigenschaft	Titerreduktion in Verdünnungsstufen		
	Anti-A	Anti-B	Lectin-H
A Se	5	0	0
A Se	5	0	1
AB Se	0	3	3
B Se	0	1	4

Abweichungen von der Regel, daß die Ausscheidungsverhältnisse im Vaginalsekret denen des Speichels entsprechen, fanden sich auf andere Weise in 2 weiteren Fällen: Das Vaginalsekret einer Frau der Gruppe AB hemmte zwar Anti-H und Anti-B, jedoch nicht Anti-A, wäre also als Sekret einer B-Person angesehen worden. Eine B-Sekretorin zeigte nur eine geringe Anti-B-Bindung bei intensiver Anti-H-Bindung. Diese 4 von der Norm abweichenden Fälle sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Mit der *Mischagglutination* waren sowohl bei Sekretoren als auch bei Nonsekretoren (Einstufung nach dem Speichelbefund) der Gruppen A, B und AB regelmäßig die Blutgruppe entsprechenden Antigene zu erfassen. Die Reaktionen waren überwiegend sehr intensiv. Auch die Nonsekretoren zeigten eine starke Agglutination bzw. Anlagerung der Erythrocyten an das mit Sekret benetzte Fasermaterial. Eine schwache positive Reaktion, die nicht der Blutgruppe entsprach, fand sich bei je einem Sekret der Blutgruppen A und B.

Schweiß

Die Ergebnisse der Schweißuntersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

In 27 von 29 Fällen wurde eine Übereinstimmung der Absorptionsreaktionen am flüssigen Schweiß mit Blutgruppe und Ausscheidereigenschaft gefunden. Da auch geringe Titerreduktionen von 1 oder 2 Stufen (Doppelbestimmungen) spezifisch waren, wurden sie als positives Ergebnis gewertet.

2mal trat bei Trägern der Gruppe A₁ (Proben 10 und 11) eine spezifische Anti-A-Bindung auf (3 Stufen), dagegen fehlte eine Bindung von Lectin-H.

In einem Fall (Probe 23) erwies sich ein Ausscheider der Blutgruppe 0 bei der Schweißuntersuchung als „Nichtausscheider“. Eine Person der Blutgruppe 0 (Probe 22) zeigte durch ihren Schweiß eine starke Lectin-H-Absorption, es wurde jedoch in mehreren Untersuchungen auch Anti-A gehemmt. Der Speichel der gleichen Person fiel dadurch auf, daß sich eine ausgesprochene Zyklusabhängigkeit in der Ausscheidung von Anti-A und Anti-B zeigte. Bei einer früheren Schwangerschaftsuntersuchung waren Anti-A-Immunantikörper gefunden worden.

Absorptionsreaktionen mit schweißgetränkten Leinenlappchen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bei 3 Personen (A₁Se) ergaben sich in den doppelt angelegten Versuchen gleichbleibende Titerenkungen von 2 Stufen, bei weiteren 8 Personen Reduzierungen von nur 1 Stufe. Diese Agglutininhemmungen waren der Blutgruppe entsprechend. In allen anderen Fällen kam es nicht zu einer Agglutininhemmung. In 15 von 18 Fällen der Blutgruppen A Se und B Se zeigte

Tabelle 3. Titerreduktionen von Anti-A, Anti-B und Lectin-H durch flüssigen Schweiß (die Zahlen geben die Ergebnisse der Doppelansätze wieder). Vergleich mit den Befunden der Mischagglutination an schweißgetränktem Textilmaterial derselben Personen

Person Nr.	Blutgruppe Se/se	Titerreduktion in Verdünnungsstufen			Mischagglutination	
		Anti-A	Anti-B	Lectin-H	Anti-A	Anti-B
1	A Se	2,3	—	1,1	+	—
2	A Se	3,3	—	2,2	—	—
3	A Se	4,4	—	3,3	—	—
4	A Se	5,6	—	3,3	+	—
5	A Se	4,4	—	2,2	++	(+)
6	A Se	4,5	—	2,2	+	—
7	A Se	5,5	—	3,2	+	—
8	A Se	4,4	—	3,3	++	—
9	A Se	4,4	—	2,2	+	—
10	A Se	3,3	—	—	+	—
11	A Se	3,3	—	—	—	—
12	A Se	1,1	—	1,1	+	—
13	A Se	2,2	—	2,2	++	—
14	A Se	1,2	—	2,3	+	—
15	A Se	1,2	—	1,2	+	—
16	A Se	1,1	—	2,2	+	—
17	A Se	5,5	—	3,2	+++	—
18	B Se	—	3,4	2,2	—	++
19	O Se	—	—	3,3	—	—
20	O Se	—	—	1,1	—	—
21	O Se	—	—	1,1	—	—
22	O Se	2,3	—	3,3	—	—
23	O Se	—	—	—	—	—
24	O se	—	—	—	—	—
25	O se	—	—	—	—	—
26	O se	—	—	—	—	—
27	O se	—	—	—	—	—
28	A se	—	—	—	+	—
29	B se	—	—	—	+	—

die Mischagglutination ein der Blutgruppe und der im Speichel ermittelten Ausscheidereigenschaft entsprechendes Ergebnis, ebenso bei den beiden Nichtausscheidern der Gruppen A und B (Proben 28 und 29).

Harn

Das Ergebnis der Gruppenbestimmungen soll hier nur zusammengefaßt mitgeteilt werden: Harnproben von 26 Sekretoren der Gruppen A und B wiesen spezifische, der Blutgruppe entsprechende Mischzellreaktionen auf. Die Intensität der Mischagglutination war unterschiedlich. Teils fanden sich nur geringgradige, wenn auch sicher zu beurteilende Agglutinatbildungen, teils waren diese so ausgeprägt wie beim Speichel.

An den Harnflecken aller 5 untersuchten Nichtausscheider fiel die Mischagglutination negativ aus.

Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen, daß als Sekretoren nur solche Personen zu bezeichnen sind, durch deren Speichel Anti-H im Hämagglutinationshemmversuch

(Absättigungsversuch) gebunden wird. Speichelproben von Sekretoren der Gruppen A, B und AB adsorbieren bei Anwendung der gleichen Untersuchungstechnik darüber hinaus die Blutgruppe homologen Antikörper, also Anti-A, Anti-B oder Anti-A + Anti-B.

Besonders zu beachten ist, daß die Agglutininbindung als Ausdruck des Ausscheiderstatus' sich im Hämagglutinationshemmversuch zeigen muß. Positive Befunde mit der Mischagglutinationstechnik beruhen ebenfalls auf der Agglutininbindung durch Antigene des zu untersuchenden Substrats. Doch sind die Ergebnisse mit dieser Methode zur Typisierung in Ausscheider und Nichtausscheider nicht brauchbar, weil auch im Speichel von Nichtausscheidern A- und B-Antigene entsprechend der Blutgruppe ohne Ausnahme nachweisbar sind.

Maresch u. Wehrschütz (1964) leiteten aus der Beobachtung, daß der Speichel eines Teiles der Nichtausscheider im Mischagglutinationsversuch positiv reagiert, ab, es sei wahrscheinlich, „daß es überhaupt keine scharfe Trennung in Ausscheider und Nichtausscheider gibt“. Zu dieser Schlußfolgerung nahmen Prokop u. Gibb (1965) Stellung mit dem Hinweis, die Mischagglutination sei zu empfindlich und liefere an speichelbenetzten Filterpapierstückchen unsichere Resultate, jedoch erlaube die Methode der Absättigung quantitative Aussagen und damit die Feststellung der Ausscheidereigenschaft.

Durch unsere Untersuchungen lassen sich diese unterschiedlichen Auffassungen in folgender Weise erklären: Durch die Mischagglutinationstechnik sind nicht nur bei einem Teil der Nonsekretoren im Speichel spezifische, der Blutgruppe entsprechende Reaktionen auszulösen, sondern dies ist bei allen Nonsekretoren der Gruppen A, B und AB möglich. An Sekreten von O-Personen sind entsprechende Untersuchungen nicht verwertbar, da Reaktionen mit Anti-H bei allen Blutgruppen vorkommen. Das gleiche ist, wie noch eingehender behandelt wird, im Sperma und Vaginalsekret und auch im Schweiß festzustellen. In diesem Sinne ist also eine Unterteilung der Menschen in solche, die Gruppensubstanzen in Sekreten besitzen, und andere, bei denen dies nicht der Fall ist, nicht gerechtfertigt. Der Schluß, daß es demzufolge überhaupt keine scharfe Trennung in Ausscheider und Nichtausscheider als phänotypischen Ausdruck eines genetischen Systems gibt, ist jedoch dadurch nicht begründet.

Die geeignete Methode, Antigene des AB0(H)-Systems in Körperflüssigkeiten grob quantitativ zu erfassen, ist, wie schon erwähnt, die Hämagglutinationshemmung im Absättigungsversuch. Bei der Gruppенаusscheidung, die durch diese Technik nachweisbar ist, handelt es sich um einen Sekretionsvorgang im Sinne einer aktiven Zelleistung. Hierfür spricht erstens die Feststellung von Kabat (1956), daß nur mucöse Elemente der Speicheldrüsen von Sekretoren antigenhaltigen Speichel produzieren, und zweitens die Abhängigkeit der Gruppенаusscheidung von der Funktionstüchtigkeit der Niere (Jarosch, 1968).

Spezifische Antigen-positive Mischzellreaktionen an Nonsekretorspeichel sind folglich darauf zurückzuführen, daß Gruppensubstanzen unabhängig von einer besonderen Antigen-Sekretionsleistung in die Sekrete übertreten. Aus zahlreichen Untersuchungen (Witebsky u. Okabe; Kritschewski u. Schwarzmann; Yosida; Hirszfeld *et al.*; Glynn u. Holborow; Szulman) ist zu folgern, daß der größte Teil aller Körperstrukturen, darunter auch die Zellen exokriner Drüsen, unabhängig von der Sekretoreigenschaft, gruppengeprägt ist. Da schon durch einfache mero-

krine Sekretion Zellbestandteile in die Sekrete übertreten, wird ein spezifischer Antigennachweis durch die empfindliche Mischagglutinationstechnik auch bei Nichtausscheidern verständlich.

Spermplasma und damit auch Gesamtsperma verhält sich im Absättigungsversuch wie Speichel. Die Darstellung von A- und B-Antigen an Spermaspuren mit der Mischagglutination, sei es nach der Methode von Coombs u. Dodd oder nach der von uns modifizierten Technik (Aufschwemmung der Testerythrocyten im Antikörpermilieu), bereitet keine Schwierigkeiten.

Diese unsere Feststellung steht im Widerspruch zu den schlechten Erfahrungen, über die Leonhard (1968) berichtet. Stellen wir unsere Versuchstechnik der von Leonhard gegenüber, so fällt auf, daß dieser, im Vergleich zu uns, mit einer 10mal so konzentrierten Aufschwemmung der Testerythrocyten (5%ig) arbeitete. Wir haben zwar deutlichere Befunde bei Verwendung 0,1—0,5%iger Aufschwemmung als bei 5%igen Erythrocytensuspensionen gesehen, können uns aber dennoch nicht erklären, daß die Mischagglutinationsmethode von Leonhard als vollständig unbrauchbar bezeichnet wird.

Die Mischagglutination liefert außer an Speichel auch an Sperma und Vaginalsekret sichere Resultate. Die Reaktionen an Ausscheidersekreten waren regelmäßig intensiv, sie waren auch stets an Nichtausscheidersekreten zu beobachten, jedoch von wechselnder Stärke.

Eine aberrierende Sekretion („aberrant secretion“ nach McNeil *et al.* und Clarke *et al.*) haben wir weder im Sperma noch im Speichel gesehen. Jedoch fielen bei Ausscheidern der Gruppen A, B und AB die schon wiederholt beschriebenen Unterschiede im Ausmaß der Agglutininbindung von Anti-A bzw. Anti-B einerseits und Lectin-H andererseits auf. Ein vollständiges Fehlen entweder von H-Substanz oder von A- oder B-Substanz bei Nachweisbarkeit von H haben wir niemals beobachtet.

Anders liegen die Verhältnisse im Vaginalsekret und Schweiß. 2 von 30 Sekretorfrauen der Blutgruppe A schieden im Vaginalsekret zwar reichlich A aus, aber kaum oder gar nicht H-Substanz. Das gleiche trat im Schweiß von 2 anderen Personen der Gruppe A (von insgesamt 17) bei normaler Antigenausscheidung im Speichel zutage. Ob es sich bei diesen Beobachtungen um eine echte aberrierende Sekretion handelt, ist jedoch fraglich. Zumindest beim Vaginalsekret liegt es nahe, die Abweichung von der Norm auf die Zusammensetzung des Vaginalsekrets zurückzuführen. Dieses wird ja nicht nur von Drüsen gebildet, sondern zum Teil auf dem Wege der Transsudation durch die Schleimhaut abgegeben. Da unsere Befunde einer von der Norm abweichenden Sekretion von Gruppensubstanzen im Vaginalsekret und Schweiß mit normalen Sekretionsverhältnissen im Speichel einhergehen, sind sie nicht geeignet, die These, daß die „aberrant secretion“ Ausdruck eines besonderen Genotyps sei (McNeil *et al.*; Clarke *et al.*), zu stützen.

In einem Fall ermittelten wir im Vaginalsekret nicht die richtige Blutgruppe. Diese Diskrepanz zwischen im Blut ermittelter AB0-Gruppe und der im Vaginalsekret war jedoch durch den Nachweis von Sperma im Vaginalsekret aufzuklären. Diese Beobachtung ist für die medizinische Kriminalistik insofern bedeutungsvoll, als durch Untersuchung von spermahaltigem Vaginalsekret bei geeigneter Blutgruppenkonstellation z. B. eine der Vergewaltigung verdächtige Person ausgeschlossen oder der Verdacht auf eine bestimmte Person erhärtet werden kann.

Die Gruppenbestimmungen am Schweiß boten folgende weitere Besonderheiten:

Von einem Sekretor der Gruppe 0 wurde Schweiß gewonnen, der sich wie Sekret eines Nichtausscheiders verhielt.

Eine 26jährige Frau, ebenfalls der Gruppe 0, zeigte in ihrem Schweiß neben einer starken Lectin-H-Absorption in wiederholten Untersuchungen auch eine starke Anti-A-Bindung. Wir dachten an die Möglichkeit, es könnte ein schwaches A vorliegen, das bei der Gruppenbestimmung im Blut nicht erfaßt worden war. Gegen diese Erklärung sprach jedoch, daß eine A-Ausscheidung im Speichel fehlte. Davon vor 4 Jahren bei dieser Frau während einer Schwangerschaft Immunität-Antikörper festgestellt worden waren, hat offensichtlich eine Immunisierung stattgefunden.

Unsere Untersuchungen am flüssigen Schweiß und am schweißgetränkten Textilgewebe lassen trotz der beschriebenen Abweichungen den Schluß zu, daß grundsätzlich Gruppensubstanzen auch im Schweiß entsprechend der Blutgruppe ausgeschieden werden und der Schweiß auch dem Se/se-System unterliegt. Damit haben die bisherigen Angaben, die lediglich auf Untersuchungen schweißgetränkter Textilgewebe beruhen, eine notwendige Ergänzung erfahren. Die bisherige mangelhafte Kenntnis des gruppenserologischen Verhaltens des Schweißes dürfte in erster Linie durch die schwierige Gewinnung des Sekrets bedingt gewesen sein. Jirka (1969) konnte bei Erwachsenen lediglich 50—500 mg Schweiß gewinnen. Unsere Methode, die Versuchspersonen durch hohe Temperatur und große Mengen Tee zu starker Schweißproduktion zu veranlassen, kann zwar nicht jedermann zugemutet werden, doch lassen sich auf diese Weise bis zu 5 ml Sekret gewinnen.

Die Feststellung von spezifischen Agglutininbindungen durch schweißgetränktes Textilgewebe weist auf Fehlermöglichkeiten gruppenserologischer Spurentests an getragenen Kleidungsstücken hin. Bei der Gruppenbestimmung eines Blutflecks der Gruppe 0 auf einem schweißgetränkten Teil eines Kleidungsstücks z. B. einer A-Person kann das Blut fälschlich einer A-Person zugeordnet werden, also in diesem Fall Fremdblut für Blut des Trägers des Kleidungsstückes gehalten werden. Solche Fehlbestimmungen können durch Kontrolluntersuchungen von Textilgewebe aus der unmittelbaren Nachbarschaft der „Spur“ weitgehend ausgeschaltet werden. In gleicher Weise ist auch an Harn als ein gruppenthaltiges Substrat zu denken. Er kann ebenfalls bei nicht exakter Untersuchungstechnik spurenkundliche Befunde verfälschen, kann aber auch selbst „Spur“ sein.

Literatur

- Clarke, C. A., McConnell, R. B., Sheppard, P. M.: A genetical study of the variation in ABH secretion. *Ann. hum. Genet.* **24**, 295—307 (1960)
- Coombs, R. R. A., Dodd, B.: Possible application of the principle of mixed agglutination in the identification of the blood stains. *Med. Sci. Law* **1**, 359—377 (1960/61)
- Gibb, B.: Vergleichende Untersuchungen zur Ausscheidung gruppengeprägter Substanzen des AB0(H)-Systems im Speichel und Urin (eine Revision der Putkonenschen Daten). *Z. ärztl. Fortbild.* **59**, 185—189 (1965)
- Glynn, L. E., Holborow, E. J.: Distribution of blood group substances in human tissues. *Brit. med. Bull.* **15**, 150—153 (1959)
- Hirsfeld, L., Halber, W., Laskowski, J.: Untersuchungen über die serologischen Eigenschaften der Gewebe. I. Mitteilung. Über gruppenspezifische Differenzierung der Normal- und Krebsgewebe. *Z. Immun.-Forsch.* **64**, 61 (1929)

- Holzer, F. J.: Untersuchungen über die gerichtlich-medizinische Verwertbarkeit der Ausscheidung von Blutgruppensubstanzen. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **28**, 234—248 (1937)
- Jarosch, K.: Blutgruppensubstanzausscheidung im Harn bei Nierenkrankheiten. *Folia haemat. (Frankfurt)* **89**, 337—343 (1968)
- Jirka, M.: Technique of sweat collection in localised sweating by pilocarpine iontophoresis. *Clin. chim. Acta* **11**, 78—81 (1969)
- Kabat, E. A.: Blood group substances. New York: Academic Press 1956
- Kirk, P. L., Roth, H. L., Clayton, W. R.: Separation of blood stain and other soluble materials by capillary action. *J. Crim. Law, Criminol. and Police Sc.* **42**, 392 (1951)
- Kritschewski, J. L., Schwarzmann, L. A.: Die gruppenspezifische Differenzierung der menschlichen Organe. *Klin. Wschr.* **6**, 2081—2086 (1927)
- Leonhardt, H. H.: Untersuchungen über optimale Verfahren zum Nachweis von Blut- und Serumgruppenmerkmalen in Spermaflecken. Diss., Marburg 1968
- Maresch, W., Wehrschütz, E.: Untersuchungen über die Ausscheidereigenschaft. *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **55**, 228—232 (1964)
- Matsunaga, E., Suzuki, T.: Beitrag zur Unterscheidung von Ausscheidern und Nichtausscheidern mittels Agglutinationshemmungsversuchs unter besonderer Berücksichtigung der Vererbung. *Jap. J. hum. Genet.* **3**, 1—8 (1958)
- Mayer, H. M.: Der Einfluß des Spurenträgers auf die Agglutininbindungsreaktion. Gruppenserologische Untersuchungen an menschlichem Schweiß. Inaugural-Diss., Würzburg 1969
- McNeil, C., Trentelman, E. F., Kreutzer, V. O., Fullmer, C. D.: Aberrant secretion of salivary A, B and H group substances in human beings. *Amer. J. clin. Path.* **28**, 145—151 (1957)
- Morganti, G., Cresseri, A., Serra, A., Beolchini, P. E., Barbaini, S., Gianotti, G. A.: Comparative studies on the A, B, O(H) blood substances in the saliva and the milk. *Vox Sang. (Basel)* **4**, 267—277 (1959)
- Prokop, O.: Die menschlichen Blut- und Serumgruppen. In: Prokop, O., Genetik; Grundlagen und Probleme in Einzeldarstellungen. Jena: Fischer 1963
- Prokop, O., Gibb, B.: Ergänzende Bemerkungen zu der Arbeit von Maresch und Wehrschütz über die Ausscheidereigenschaft. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **56**, 221—225 (1965)
- Rackwitz, A., Stichnoth, E.: Blutgruppenbestimmung im Urin. Schriftenreihe der Dtsch. Volkspolizei **33**, 4 (1959)
- Schaidt, G.: Auswertung von Blutspuren in Flüssigkeiten und Verfahren zur Blutgruppenbestimmung in Urin und Kot. *Arch. Kriminol.* **122**, 66—68 (1958)
- Schiff, F.: Die Technik der Blutgruppenuntersuchung für Kliniker und Gerichtsärzte. Berlin: Springer 1926
- Schiff, F., Sasaki, H.: Der Ausscheidungstypus, ein auf serologischem Wege nachweisbares mangelndes Merkmal. *Klin. Wschr.* **11**, 1426—1449 (1932)
- Schulz, E.: Ein Beitrag zur Durchführung der Mischagglutination in der Spurendiagnostik. *Arch. Kriminol.* **146**, 95—98 (1970)
- Sobotka, R.: Spurenkundliche Untersuchungen am Vaginalsekret. Inaugural-Diss., Würzburg 1972
- Szulman, A. E.: The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J. exp. Med.* **111**, 785—799 (1960)
- Szulman, A. E.: The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. *J. exp. Med.* **115**, 977—995 (1962)
- Szulman, A. E.: The histological distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. *J. exp. Med.* **119**, 503—515 (1964)
- Witebsky, E., Okabe, K.: Über den Nachweis von Gruppenmerkmalen in den Organen des Menschen. *Z. Immun.-Forsch.* **52**, 359—369 (1964)
- Yosida, K. J.: Über die gruppenspezifischen Unterschiede der Transsudate, Exsudate, Sekrete, Exkrete, Organextrakte und Organzellen des Menschen und ihre rechtsmedizinische Anwendung. *Z. ges. exp. Med.* **63**, 331—339 (1928)

Priv.-Doz. Dr. Ernst Schulz
 Akademischer Rat
 Institut für Rechtsmedizin
 der Universität
 D-8700 Würzburg, Versbacher Landstraße 3
 Bundesrepublik Deutschland