

(Aus dem Institut für Gerichtliche und Soziale Medizin der Universität zu Königsberg i. Pr. — Direktor: Prof. Dr. *Nippe*.)

## Zur Technik des Spermanachweises.

Von

**Dr. Berthold Mueller,**

Assistent am Institut.

Der forensische Nachweis von Sperma gehört trotz der vielfachen Methoden, die hierfür angegeben sind, immer noch zu den schwierigsten und undankbarsten Aufgaben in der gerichtlichen Medizin. An der Hand eines Falles möchte ich hier auf die bisher angegebenen Methoden eingehen, unsere Erfahrungen mit ihnen darlegen und auch auf einige neue Gesichtspunkte hinweisen.

Das Institut erhielt aus einer Provinzstadt zum Spermanachweis 2 Leinenlappen, ein weibliches Hemd, 2 Streifen von der Innenseite einer weiblichen, dunkelgrauen Hose aus Flanell und ein Bündel Moos. Das Material stammte von einer weiblichen Leiche, die man in einem Wäldchen aufgefunden hatte. Die Leiche lag auf dem Rücken mit gespreizten Beinen; die Kleider waren nicht zerrissen, die Röcke waren bis über die Knie hochgeschlagen. In der Scheide steckte, tief hineingestopft, ein Moospfropfen. Am Halse ließen sich Würgespuren nachweisen. Es bestand der Verdacht des Lustmordes. Bei der Obduktion, die 3 Tage später stattfand, wurde die Scheide mit den eingeschickten Lappen ausgetupft.

Bei makroskopischer Betrachtung fand man auf den Leinenlappen Flecke, die wie eingetrocknetes Sperma aussahen, am Moos Schleim- und Schmutzreste, am Hemd Kot-, Urin- und Blutflecke. Den Flanellstücken aus der Hose war außer Blut nichts Charakteristisches anzusehen.

Es wurden aus allen fraglichen Stellen zahlreiche Stückchen ausgeschnitten und nach den üblichen Methoden untersucht. Nirgends konnten *Florensesche* oder *Barberiosche* Krystalle erzeugt werden. Auch in mit Aqua destillata und Pepsin-Salzsäure-Gemischen zerzupften Zeug- und Moosstückchen ließen sich Spermien nicht nachweisen. Die Färbung nach *Baecchi* ergab gleichfalls überall ein negatives Resultat. Als besonders schwierig erwies sich diese Färbung an den Flanellstücken

wegen der Dicke des Stoffes; sie blieb erfolglos, ebenso die Untersuchung an ungefärbten Präparaten nach Zerzupfen und kurzer Maceration.

Um ganz sicher zu gehen, wurde schließlich auf Veranlassung von Herrn Professor *Nippe* noch folgende Untersuchung vorgenommen: Die Lappen aus der Hose wurden in ihrer Gesamtheit klein zerschnitten und in etwa 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung 24 Stunden maceriert. Während alle Untersuchungen vorher negativ ausgefallen waren, wurden nunmehr nach Ausdrücken der Zeugfetzen in dem trüben Macerat vereinzelte einwandfreie gut erhaltene Spermatozoen gefunden. Nach Zentrifugieren der Flüssigkeit waren die Spermien viel reichlicher, aber vielfach zerrissen, so daß sie neben den vielen Schmutzteilen nur schlecht zu erkennen waren. Die mit dem Macerat angestellte *Florencesche* Reaktion fiel negativ aus. Bei der Färbung des lufttrockenen Präparates nach *May-Grünwald* traten die Spermien gut hervor. Der vordere Teil des Kopfes war hellblau, der hintere dunkelblau, das Mittelstück gelblich und der Schwanz zartblau gefärbt. Die Zeugfetzen färbten sich mit, störten aber nicht sonderlich.

In derselben Weise wurden jetzt auch die anderen Objekte, besonders das Moos, untersucht, Spermien wurden an diesen jedoch nicht mehr gefunden.

Demnach wurde folgendes Gutachten erstattet: „An den beiden Schrittteilen der derben Hose der Ermordeten haben sich vereinzelte Samenfäden und damit Samen überhaupt nachweisen lassen. Bei der Verwertung dieses Befundes wird darauf hingewiesen, daß er nach der ganzen Sachlage kaum beweiskräftig ist. Derartige derbe Hosen werden von der ländlichen weiblichen Bevölkerung erfahrungsgemäß monatelang getragen, ohne gereinigt zu werden, und daß dann bei einer verheirateten Frau sich immerhin etwas männlicher Samen im Schritt der Hose finden kann, ist nicht weiter verwunderlich. Dieser Samen braucht daher nicht von einem Notzuchtsattentat herzurühren, sondern kann von früheren Geschlechtsakten stammen.“

Eine bald darauf einlaufende Mitteilung der betreffenden Staatsanwaltschaft besagte, der mutmaßliche Mörder habe den Mord eingestanden, der Lustmord sei nur vorgetäuscht gewesen. Der Befund von Samenresten an der Innenseite der Hose war somit geklärt; er stammte von früheren Beiwohnungen her, ein Beweis, wie vorsichtig derartige Samenbefunde zu bewerten sind, wie das im Gutachten hervorgehoben war.

Dieser überraschende Spermabefund gab den Anlaß, die Macerationsmethodik nachzuprüfen und gegebenenfalls weiter auszubauen.

Nach der Literatur hat sich *Gasis* am meisten mit den Macerationsmethoden beschäftigt: er gab zu frischem Sperma destilliertes Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Säuren und Alkalien und eine 1 prom.,

mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuerte Sublimatlösung. Bei Zusatz von Säure und Alkali war schon nach 1 Tag an den Spermien eine Trennung von Kopf und Schwanz zu bemerken; bei Zusatz von destilliertem Wasser und Kochsalzlösung quollen die Samenfäden auf, bei Sublimatzusatz war an ihnen auch nach 8 Tagen keine Veränderung wahrzunehmen; sie ballten sich nur zusammen. *Gasis* gibt fernerhin an, daß im Gegensatz zu den bisherigen Annahmen die Spermaflecke *in der Peripherie viel mehr Spermien* enthalten als im Zentrum. Er empfiehlt demnach zum Spermanachweis folgendes Verfahren: Aus der *Peripherie* des Fleckes werden kleine Stückchen ausgeschnitten und in der oben angegebenen Sublimatlösung 3—5 Minuten oder länger maceriert; das Macerat wird dann nach Trocknen über der Flamme mit Eosin gefärbt und mit einer 1 proz. Jodkalilösung differenziert; es sollen dann nur die Samenfäden gefärbt bleiben.

*Bohne* empfiehlt, Stücke aus dem fraglichen Spermafleck in Wasserstoffsuperoxyd  $\frac{1}{2}$  Stunde zu erweichen; dabei entsteht eine lebhafte Gasentwicklung, in der Gasschicht könne man die Spermien leicht mikroskopisch im frischen Präparat nachweisen.

Bei meinen Untersuchungen bestand der Grundgedanke, in den Fällen, bei denen alle anderen Methoden (chemische Vorproben, kurzes Macerieren und Untersuchen von kleinen Stücken, Färbungen im Stoff) angestellt und erfolglos geblieben sind, möglichst alle Spermien *auf einmal* zu erfassen, die sich doch noch in der verdächtigen Partie des Stückes befinden könnten. Dies wird vielfach der Fall sein, wenn es sich um flauschige, dicke Stoffe handelt und wenn Flecke nicht zu erkennen sind.

Das Wasserstoffsuperoxyd erwies sich mir zum Macerieren großer Stoffteile als nicht geeignet; der Schaum enthielt so viel Schmutz, daß das Auffinden der Spermien sehr erschwert wurde; dagegen war die Methode brauchbar zur Untersuchung kleinerer und dünnerer Zeugstückchen.

Um die geeignetste Macerationsflüssigkeit zu finden, mußten als erstes die Voruntersuchungen von *Gasis* nachgeprüft werden. Zunächst wurden zu frischem Sperma gleiche Teile von 1 prom. Sublimatlösung, 5 proz. Formalinlösung, destilliertem Wasser, 2 proz. Kalilauge, 2 proz. Salzsäure und 70 proz. Alkohol zugesetzt; diese Mischungen blieben bei Zimmertemperatur stehen. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Flüssigkeiten ungefärbt untersucht und nach Trocknen in der Luft nach *May-Grünwald* gefärbt. Da auch die *Florensesche* Reaktion bei der Untersuchung des Macerats angewendet werden sollte, wurde gleichzeitig festgestellt, bei welcher Verdünnung mit der jeweiligen Zusatzflüssigkeit sie noch positiv ausfällt. Das Ergebnis ist in nachfolgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1. *Zu frischem Sperma:*

Die gleiche Menge von	Untersuchung im ungefärbten Präparat bei 15°		Gefärbtes Präparat (May-Grünwald) nach 48 Std.	Florence'sche Krystalle
	nach 24 Std.	nach 48 Std.		
Aqua dest.	Unverändert	Spermien leicht gequollen, viel Bakterien	Gut	Positiv bis zur Verdünnung von 1 : 35 bis 1 : 40
Formalin 5 proz. (der käuflichen 40 proz. Lösung)	„	Spermien leicht geschrumpft	Unbrauchbar	Positiv bis zur Verdünnung von 1 : 6
HgCl <sub>2</sub> 1 promill.	„	Unverändert	„	Positiv bis zur Verdünnung von 1 : 30 bis 1 : 35
KOH 2 proz.	„	Bei Spermien vielfach Trennung von Kopf u. Schwanz	Schlecht	Negativ
HCl 2 proz.	„	Bei Spermien vielfach Trennung von Kopf u. Schwanz	„	Ohne Verdünnung positiv
Alkohol 70 proz.	Verklumpt	Verklumpt	Gut	Ohne Verdünnung positiv

Die Tabelle ist aufgestellt auf Grund von drei verschiedenen Untersuchungsreihen. Erheblichere Verschiedenheiten ergaben sich nur bei der Untersuchung der *Florence'schen* Reaktion. Sie scheint *individuell* verschieden auszufallen. Wesentliche Abweichungen von den Befunden von *Gasis* sind nicht vorhanden.

Eine Fehlerquelle ist aber bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt worden; auch *Gasis* hat sie nicht ausgeschaltet: Beim Macerieren von Spermaflecken handelt es sich um eingetrocknete, bereits fixierte Samenfäden, die sich in Zusatzflüssigkeiten und bei Färbungen sicherlich anders verhalten als frische Spermien. Die schlechten Färbeergebnisse, die in der Tabelle angegeben sind, kann man daher nicht sonderlich schwer bewerten. Um diesen Fehler auszuschalten, ließ ich fein verstrichenes, frisches Sperma auf Objektträgern lufttrocknen werden, setzte dann die einzelnen Flüssigkeiten hinzu, beobachtete nach 1, 2 und 3 Tagen und färbte nach *May-Grünwald*. Um rasches Eintrocknen zu verhindern, wurden die mit den verschiedenen Flüssigkeiten begossenen Objektträger im Eisschrank aufbewahrt, und die Flüssigkeiten nach Bedarf erneuert. Das Ergebnis veranschaulicht Tabelle 2.

Diese Tabelle besagt, daß bei einem bereits durch Eintrocknung fixierten Samenfaden Zusatzflüssigkeiten keine oder nur unwesentliche Veränderungen hervorrufen, und daß die Färbbarkeit in jedem Falle eine gute ist. Eine Ablösung der am Objektträger fixierten Samenfäden wurde nur durch Wasser und Kochsalzlösung erreicht. Man muß

Tabelle 2. Zu auf Objektträgern angetrocknetem Sperma:

Flüssigkeit	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen	Färbung (May-Grünwald)
Aqua dest.	Spermien unverändert, fest am Glas haftend	Spermien leicht gequollen, teilweise schwimmend	Gut
NaCl 0,9 proz.	Spermien unverändert, fest am Glas haftend	Spermien leicht gequollen, teilweise schwimmend	„
HgCl <sub>2</sub> 1 promill.	Spermien unverändert, fest am Glas haftend	Spermien unverändert, fest am Glas haftend	„
Formalin 5 proz. (wie in Tab. 1)	Spermien unverändert, fest am Glas haftend	Spermien unverändert, fest am Glas haftend	„

also hiernach *destilliertes Wasser* und *physiologische Kochsalzlösung* als die *besten Macerationsmittel* bezeichnen.

Das so gewonnene Resultat wurde noch einmal am Stoff selbst kontrolliert; es mußte dazu eine Reihe möglichst gleichartiger Spermaflecke hergestellt werden. Die Samenflüssigkeit verschiedener Individuen von einem Tage wurde in einem Reagensglas gesammelt und gemischt; von diesen in bekannter Weise flüssig gewordenen Samenmengen wurden je 2 cem auf Leinenläppchen gleicher Art gegossen. Auf diese Weise wurde erreicht, daß alle so hergestellten Flecke die ungefähr die gleiche Anzahl Spermien enthielten. Um zu beobachten, wie viel Samenfäden nach Maceration noch im Stoff zurückgeblieben waren, fertigte ich vor und nach der Maceration Färbepreparate an.

Es wurde gefärbt nach *Baecchi* und nach *Joesten*, es wurde auch die Kombination der *Baecchi*-Färbung mit der Gramfärbung nach der Angabe von *G. Strassmann* angewendet. Im Gegensatz zu anderen Autoren, insbesondere von *F. Strassmann* machten wir mit der *Baecchi*-Färbung schlechte Erfahrungen. Trotz langer Differenzierung färbten sich die im Stoff enthaltenen Schmutzteile so stark mit, daß bei etwas geringerer Spermienzahl die Samenfäden nicht mit Sicherheit oder häufig gar nicht zu erkennen waren; die Kombination der *Baecchi*-Färbung mit der Gramfärbung verbesserte das Resultat in keiner Weise. Recht brauchbar, wenn auch etwas umständlicher, erwies sich die Färbung nach *Joesten*. Gerade bei vergleichenden Untersuchungen, bei denen es auf die Menge der Spermatozoen ankam, war sie hervorragend zu brauchen; sie ist sehr *elektiv*, d. h. nur Spermien färben sich, Schmutz und andere Partikel bleiben fast ungefärbt.

Um zunächst die Stellen zu finden, an denen die Spermien am reichlichsten sind, wurden bei 7 Flecken aus den verschiedensten Gegenden Stoffstückchen ausgeschnitten und nach *Joesten* gefärbt. Aus dem Vergleich der Präparate ergab sich einwandfrei, daß im Gegensatz zu

der Angabe von *Gasis* in den *zentralen Teilen* des Fleckes die *meisten Samenfäden* zu finden sind. Die Nachprüfung an natürlichen Spermaflecken hatte dasselbe Ergebnis. Auch die theoretische Überlegung stützt dies Resultat; denn es ist anzunehmen, daß bei Weiterausbreitung des auf eine Stelle eines Stoffes ergossenen Samens in die Umgebung immer mehr Spermatozoen in den Maschen des Gewebes abfiltriert und nur wenige bis zu den Randpartien des Fleckes mitgeschwemmt werden.

Auf Grund dieser Feststellungen wurden daher bei allen weiteren Untersuchungen aus dem *Zentrum* der vorbereiteten Flecke Stoffteile zur Kontrollfärbung entnommen und gefärbt. Der Fleck wurde sodann klein zerschnitten und auf Eis in 4 ccm Flüssigkeit in kleinen Flaschen maceriert. Nach 24 Stunden wurden die Zeugfetzen ausgedrückt, und ein Zeugstückchen aus dem Zentrum, das vorher bezeichnet war, zur Färbung beiseite gelegt. Die Macerationsflüssigkeit wurde zunächst frisch untersucht und dabei die *Florencesche* Reaktion angestellt. Bereits hierbei waren die mit Jod braun gefärbten Spermien gut zu erkennen; zum Schluß ließ ich einige Tropfen des Macerates auf dem Objektträger eintrocknen und färbte nach *May-Grünwald*. Der Rest des Macerats wurde zentrifugiert und wiederum nach *May-Grünwald* gefärbt. Das Ergebnis der Untersuchungen ist aus folgender Tabelle zu ersehen.

Tabelle 3.

*Zerschnittener Spermafleck, maceriert 24 Stunden bei rund + 7° in 4 ccm von:*

Flüssigkeit	Florence mit Macerat	Macerat (May-Grünwald)	Zentrifugat (May-Grünwald)	Kontrollpräparat des Stoffes nach Maceration (Joesten)
Aqua dest.	+	Reichlich Spermien, viel Bakterien	Spermien vielfach zerissen	Viel weniger Spermien als vor der Maceration
NaCl 0,9 proz.	+	Reichlich Spermien, viel Bakterien	Spermien vielfach zerrissen	Viel weniger Spermien als vor der Maceration
HgCl <sub>2</sub> 1 promill. angesäuert	+	Wenig Spermien, weniger Bakterien	Spermien besser erhalten	Kaum weniger als vor der Maceration
Formalin 5 proz. (wie in Tab. 1)	—	Wenig Spermien, weniger Bakterien	Spermien besser erhalten	Kaum weniger als vor der Maceration
KOH 2 proz.	—	Keine Spermien, keine Bakterien	Keine Spermien	Spermien selten, zerissen u. verklumpt
Essigsäure 2 proz.	+	Keine Spermien, keine Bakterien	Keine Spermien	Spermien selten, zerissen u. verklumpt

Nach diesen Untersuchungen kommen also, wie die Tabelle zeigt, als Macerationsflüssigkeiten nur destilliertes Wasser und physiologische Kochsalzlösung in Betracht. Die Verwendung von Kochsalzlösung war allerdings deshalb un bequem, weil sich bei zu schnellem Eintrocknen

des Macerates über der Flamme auf dem Objektträger Kochsalzkrystalle bildeten, die bei der Färbung störten.

Störend war ferner bei Maceration in Kochsalz und Wasser die Bakterienflora; sie ließ sich leicht auf ein geringes Maß zurückführen, wenn man nach 4 stündigem Macerieren 1 cem 10 proz. Formalinlösung oder 1 prom. Sublimatlösung zusetzte. Sublimat ist vorzuziehen, weil es im Gegensatz zu Formalin (siehe Tab. 1) die *Florencesche* Reaktion nicht nennenswert hemmt. Die Loslösung der Spermien vom Stoff wurde nach meinen Erfahrungen durch den *späteren* Zusatz der bactericiden Flüssigkeit nicht gestört. Der Zusatz dieser Flüssigkeiten macht fernerhin die Spermien widerstandsfähiger (Tab. 3), so daß sie bei späterem Zentrifugieren nicht so leicht zerbrechen.

Die so ausgearbeitete Methode wurde nunmehr bei im Institut vorhandenen, 8 alten Spermaflecken erprobt; sie führte immer zum Erfolg, obwohl der älteste Fleck 5 Jahre alt war. Bei einem verdächtigen Fleck, bei dem alle anderen Methoden einschließlich der Färbungen im Stück versagten, ließen sich im zentrifugierten Macerat der ganzen verdächtigen Partie noch Spermien nachweisen.

Außer mit May-Grünwald-Lösung wurden die Macerate noch gefärbt nach *Gasis* (Färben mit Eosin, Differenzieren mit 1 proz. Jodkali-lösung), mit Methylenblau, mit Säurefuchsin nach *Baecchi*; es wurde ferner angewendet die von *G. Strassmann* angegebene Kombination der *Baecchi*-Färbung mit der Gramfärbung und eine Kombination der *Joestenschen* Färbung (Einlegen in Resorcin 5 Minuten, dann Eisenhämatoxylin, mit einigen Tropfen Jodkali versetzt, 1 Stunde ohne Erwärmen, nach kurzem Abspülen Differenzieren in der von *Joesten* angegebenen Lösung: konzentrierte wäßrige Lösung von Oxalsäure 10 cem, konzentrierte wäßrige Lösung von Acidum picronitricum 1 cem, 1 proz. alkoholische Taninnlösung ad 100 cem).

Die Färbung mit Eosin nach *Gasis* erwies sich deshalb als ungünstig, weil die Schwänze der Spermien sich auch bei Maceration in der vorgeschriebenen Sublimatlösung nicht färbten. Sie war auch nicht elektiv. Einigermaßen günstige Resultate ergab die Färbung nach *May-Grünwald* und die Färbung nach *G. Strassmann*. Beide Färbungen sind für diesen Zweck etwa gleichwertig, elektiv sind beide aber auch nicht. Da die *May-Grünwald*-Färbung technisch einfacher ist, wurde sie vorgezogen. Etwas mehr elektiv war die Färbung mit Eisenhämatoxylin. Sie ist aber recht umständlich, und die Vorteile sind nicht so groß, daß man sie anwenden muß. Methylenblau und Säurefuchsin färbten die Stoffasern und die Schmutzteile so stark mit, daß die Erkennung der Spermien sehr erschwert wurde.

Alles in allem läßt sich sagen, daß eine ideale elektive Färbung für Macerate von Spermaflecken nicht gefunden wurde. Brauchbar ist die

*May-Grünwaldsche*, die *G. Strassmannsche* Färbung und die angegebene Modifikation der *Joestenschen* Färbung.

Die Nachuntersuchung der macerierten Zeugfetzen nach dem Verfahren nach *Marique* mit konzentrierter Schwefelsäure ergab, daß die Erfolge mäßig waren; mitunter ließen sich Spermien nicht auffinden, auch wenn bei der Färbung nach *Joesten* noch zahlreiche zu sehen waren.

Es wurden also die wesentlichen Methoden des Spermanachweises ausführlich nachuntersucht; ferner wurde eine Macerationstechnik ausgearbeitet, die versuchsweise bei einem praktischen Fall mit Erfolg angewendet wurde. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden noch einmal im folgenden zusammengefaßt:

1. Im Gegensatz zu der Angabe von *Gasis* liegen im Zentrum eines Spermaflecks viel mehr Spermien als in der Peripherie.

2. Auch nach unseren Erfahrungen kommt man in vielen Fällen mit kurzem Macerieren kleiner Zeugstückchen in Wasser oder Pepsinsalzsäuregemischen aus. Diese Methode ist stets zuerst zu versuchen.

3. Von den Färbemethoden im Stoff ist nach unseren Erfahrungen am besten, wenn auch etwas umständlich, die von *Joesten*.

4. Bei Versagen der Färbemethoden (dicker Stoff) oder bei ihrem negativen Ausfall empfiehlt es sich, die verdächtigen Stoffpartien völlig zu zerschneiden und 24 Stunden in destilliertem Wasser kalt zu macerieren. Um allzu starke Bakterienwucherung im Macerat zu verhindern und die Spermien widerstandsfähiger zu machen, ist es zweckmäßig, nach vierstündiger Maceration 1 prom. Sublimatlösung zuzugießen; auf 4 Teile Macerationsflüssigkeit kommt zweckmäßig 1 Teil 1 prom. Sublimatlösung. Das Macerat kann sodann zentrifugiert, und das Zentrifugat noch einmal untersucht werden.

5. Die *Florencesche* Reaktion fällt noch bei einer wäßrigen Verdünnung von 1 : 35 positiv aus, kann also am Macerat versucht werden. Sublimatzusatz hindert die Reaktion nicht wesentlich, Formalinzusatz hebt sie gewöhnlich auf.

6. Das lufttrockene Macerat kann gefärbt werden nach *May-Grünwald*, nach *G. Strassmann* und mit Eisenhämatoxylin. Am besten ist nach unseren Erfahrungen die Färbung mit Eisenhämatoxylin, am einfachsten und doch brauchbar die nach *May-Grünwald*.

#### Literaturverzeichnis.

- 1) *Lochte*, Gerichtsärztliche und polizeiärztliche Technik (*P. Fraenckel*). —  
 2) *Haberda*, Lehrb. d. gerichtl. Med. — 3) *Gasis*, Dtsch. med. Wochenschr. 1910, S. 1367. — 4) *Joesten*, Münch. med. Wochenschr. 1911, S. 1817. — 5) *Bohne*, Ztschr. f. Med.-Beamte 1912, S. 919. — 6) *Strassmann, G.*, Ärztl. Sachv.-Ztg. 1921, S. 127. — 7) *Strassmann, F.*, Der menschliche Samen in der gerichtlichen Medizin. Bonn 1922.