

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. med. BERTHOLD MUELLER)

Störungen der Blutart-Bestimmungen durch Eigenheiten des Substrates und deren Vermeidung

Von

I. KLOSE

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Juni 1961)

Nachdem in letzter Zeit BURGER und SCHOENHERR über Störungen der Präcipitinreaktion durch moderne Waschmittel und Verhinderung dieser Störungen berichtet haben, tauchte die Frage auf, wieweit die anderen Methoden zur Eiweißart-Differenzierung durch Eigenheiten des Substrates gestört werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, herauszufinden — wieweit die mit modernen Waschmitteln gewaschenen Textilien, auf denen sich zu untersuchende Blutflecke befinden, die von JUNGWIRTH auf Grund einer Anregung von WIENER angegebene „Schnellmethode zur artspezifischen Differenzierung menschlichen Blutes“ beeinflussen können. Das weitere Ziel war, eine Methode zur Vermeidung eventuell auftretender Störungen zu finden.

Die Methode hat den Vorteil, daß sie schnell durchzuführen ist und nur wenig Testserum verbraucht. — Dabei handelt es sich um folgendes Prinzip:

Notwendig sind zwei bekannte Größen:

a) eingestelltes Antiglobulin-Serum (optimale Gebrauchsverdünnung wie für Rh-Antikörper);

b) Testantigen. Dieses wird gewonnen durch Inkubation gewaschener Rh-pos. Blutkörperchen bei 37° C, 30 min mit einem starken inkompletten Rh-Serum. Anschließend Waschen des Gemisches zur Entfernung freien Serumeiweißes.

Vermischt man das Antiglobulin-Serum mit gelöstem Bluteiweiß, so verbinden sich die Antiglobulinmoleküle mit den freien Globulinmolekülen und werden neutralisiert. Nach Hinzufügen des Testantigens darf bei Vorliegen von Menschenblut keine Agglutination auftreten, während bei Vorliegen von Tierblut eine Agglutination zu erkennen ist.

Die Untersuchungen wurden mit insgesamt 15 Wasch- und Reinigungsmitteln vorgenommen, und zwar: Flam, Pre, Persil, Sunil, Fewa, Dixan, Suwa, Perwoll, Imi, Sil, Omo, Dor, Henko, Spüli und Rei.

Um herauszufinden, ob diese Reinigungsmittel die Antiglobulin-Methode überhaupt stören und wenn ja — in welchen Konzentrationen — wurden in unseren ersten Versuchen anstatt zu testender Lösungen von extrahierten Blutflecken

zunächst nur reine Waschmittel-Verdünnungen verwendet. Wir arbeiteten mit den Konzentrationen 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:3000. Die von den jeweiligen Herstellerfirmen angegebenen „Gebrauchslösungen“ haben sämtliche Konzentrationen, die im Mittel zwischen 1:200 und 1:500 liegen.

Unsere Ergebnisse waren folgende: Alle aufgeführten Waschmittel störten in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:500 die Antiglobulin-Methode. Die Reaktionen verliefen bei Zusatz der Reinigungsmittel-Lösungen (ohne Zugabe von menschlichem oder tierischem Blut) so, wie sie bei Anwesenheit von Menschenblut ablaufen. — Die mitlaufenden Kontrollen (Leerkontrolle und Kontrolle mit Menschen- bzw. Tierserum) verliefen regelrecht und erwartungsgemäß.

Bei Verdünnungen der angegebenen Reinigungsmittel von 1:1000 wurden keine ins Gewicht fallenden Störungen — nur in einigen Fällen eine geringe Abschwächung der Reaktion — beobachtet.

Bei den folgenden Untersuchungen wurden Textilien in Seifenlösung eingeweicht bzw. gewaschen, um den Verhältnissen des praktischen Lebens näherzukommen. Wir verwendeten Baumwoll-, Leinen- und Woll-Gewebe. Von jedem Stoff wurden Proben in je eine der nachstehend aufgeführten Verdünnungen von jedem der 15 untersuchten Reinigungsmittel für 3 Std bei Zimmertemperatur eingeweicht. Während dieser Zeit wurden die Textilien mehrmals darin herumgeschwenkt und ausgedrückt. Von jedem Reinigungsmittel setzten wir Verdünnungen in den Konzentrationen 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:3000 an. — Die Stoffe wurden — ohne vorheriges Spülen — bei Zimmertemperatur getrocknet und dann jede Stoffprobe der insgesamt 180 Ansätze an verschiedenen Stellen mit Rattenblut, Kaninchenblut und mit Menschenblut befleckt. Nach abermaligem Trocknen bei Zimmertemperatur (48 Std) wurden die blutbefleckten Textilstücke in physiologischer NaCl-Lösung extrahiert und die Antiglobulin-Methode — wie angegeben — durchgeführt. Zur Kontrolle wurden für jeden Ansatz auch Stoffproben, die zwar in Reinigungslösungen gelegen hatten — aber nicht mit Blut befleckt worden waren — extrahiert und auch Reaktionen mit physiologischer NaCl-Lösung sowie Menschen- und Tierserum (Ratte und Kaninchen) angestellt.

Als weitere Kontrollen wurden gewaschene aber unbefleckte Stoffe und ungewaschene aber befleckte Stoffe den gleichen Bedingungen ausgesetzt.

Wir kamen zu folgendem Ergebnis: Wollstoffe, die in Reinigungsmittel-Lösungen von Konzentrationen 1:500 und 1:100 aller 15 Waschmittel gewaschen worden waren, störten den Nachweis der Blutart: Die Extrakte, die aus den Rattenblutflecken gewonnen waren, ergaben die gleichen Reaktionen wie die Extrakte aus Menschenblutflecken. Auch die Extrakte aus den zwar gewaschenen — aber unbefleckten — Wollstoffen störten die Reaktionen.

Wollstoffe, die in Reinigungsmittelkonzentrationen von 1:1000 und 1:3000 gewaschen waren, störten die Reaktionen nicht mehr. Die übrigen Kontrollen fielen regelrecht und erwartungsgemäß aus.

Leinen- und Baumwollgewebe verhielten sich folgendermaßen: Nach Waschen in Lösungen von 1:100 und 1:500 der folgenden Reinigungsmittel waren die Reaktionen gestört, d. h. die Extrakte von Rattenblutflecken verhielten sich wie solche aus Menschenblutflecken. Störun-

gen verursachten: Pre, Persil, Sunil, Fewa, Suwa, Sil, Dor, Henko, Spüli und Rei. — Die in Flam, Dixan, Perwoll, Imi, Omo gewaschenen Stoffe der gleichen Konzentration verursachten keine Störung bei der Antiglobulin-Methode. — Leinen- und Baumwollgewebe, die in Lösungen von 1:1000 und noch stärkeren Verdünnungen gewaschen worden waren, störten den richtigen Ausfall der Reaktionen nicht mehr.

Sämtliche Stoffe, die als Träger der Blutflecken (und auch unbefleckt als Substratkontrolle) den ordnungsgemäßen Ausfall der Antiglobulin-Methode gestört hatten, wurden nun nach dem Waschen in den entsprechenden störenden Lösungen zunächst gespült und dann getrocknet. Nach Blutbefleckung und erneuter Trocknung wurden wieder die Blutartbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse waren folgende:

Ein- oder mehrmaliges Spülen in Leitungswasser von Zimmer-temperatur beseitigte die vorstehend beschriebenen Störungen nicht.

Nach viermaligem gründlichem Spülen in Leitungswasser von 50 bis 60° C und jedesmaligem anschließendem guten Auswinden vor der Blutbefleckung waren in Leinen- und Baumwollstoffen die Störungen beseitigt.

Wollstoffe (die nur handwarm behandelt werden dürfen) zeigten nach dreimaligem Spülen in Leitungswasser von 30° C und anschließender Blutbefleckung noch die gleichen Störungen des Substrates wie vorstehend beschrieben.

Daraus ergibt sich, daß trotz vorschriftsmäßigen Spülens von Textilien noch störende Waschmittelsubstanzen in diesen enthalten sein können. — Da in der Praxis nicht nur blutbefleckte Stoffe zur Untersuchung gelangen, die in den von den Waschmittelfirmen angegebenen Gebrauchslösungs-Verdünnungen gewaschen und anschließend jedesmal als zur vollständigen Entfernung der Reinigungsmittel gespült worden sind — dagegen gerade nach begangenen Straftaten oft versucht wird, mit möglichst konzentrierter Lösung eines Waschmittels eventuell entstandene Blutflecken zu entfernen — mußte die Frage untersucht werden, wieweit und mit welchen Methoden diese Störungen beseitigt werden können.

Zunächst gibt bei Untersuchung von unbekanntem Blutflecken auf unbekanntem Stoffen die bei jeder Reaktion mitlaufende Substratkontrolle (in unseren Untersuchungen: Extrakt aus unbefleckten Stoffen) darüber Auskunft, ob eine Störung der Reaktion dem Substrat zuzuschreiben ist.

Wir gingen nun folgendermaßen vor: Die blutbefleckten Stoffe, die als Substrate störten, wurden vor der Extraktion nach der von BÜRGER angegebenen Methode behandelt:

Danach werden in Seifenpulver gewaschene und blutbefleckte Gewebestückchen in einem Lösungsmittelgemisch (gleiche Teile von Methylalkohol, Äthylalkohol, Amylalkohol zusammen mit Trichloräthylen) 3 Std digeriert.

Nachdem wir aus den so vorbehandelten Textilien die Blutflecken mit Kochsalzlösung extrahiert hatten, zeigten die angestellten Antiglobulin-Reaktionen die gleichen Störungen wie vor dem Digerieren. — Stoffe, die vor dem Digerieren *nicht* als Substrat gestört hatten, wurden jedoch durch die Behandlung mit dem Lösungsmittel nicht in dem Sinn verändert, daß sie nunmehr auch den ordnungsgemäßen Ablauf der Reaktionen beeinflussten. — Wir stellten bei diesen Versuchen vor und nach dem Digerieren die Uhlenhuthsche Präcipitinreaktionen an und kamen zu dem gleichen Ergebnis wie BURGER: Extrakte von mit Waschmitteln vorbehandelten Textilien ergaben einen unspezifischen Ring an der Berührungsstelle. Nach dem vorgeschriebenen Aufenthalt der Stoffe in dem Lösungsmittelgemisch waren die unspezifischen Präcipitin-Reaktionen verschwunden.

Daraus ist zu schließen, daß die alkoholischen Lösungsmittel zwar die die Präcipitin-Reaktionen störenden Substanzen entfernen. Die Agglutination der bei der Antiglobulin-Methode zugesetzten Erythrocyten — die für den richtigen Ausfall der Reaktionen erforderlich ist — war jedoch auch nach dem Digerieren der Stoffe aufgehoben oder zumindest stark eingeschränkt.

So suchten wir nach einer schonenderen Methode, die störenden Substanzen des Substrates — unter Erhaltung der Agglutinabilität der Blutkörperchen bzw. der Agglutinogene des Serums — zu entfernen. Anregung dazu gaben uns die Untersuchungen von MARCINKOWSKI über die Modifizierung der Lattes-Methode:

Dabei werden nicht die Blutkrüstchen direkt oder ihre Auszüge mit A- und B-Blutkörperchen-Aufschwemmungen versetzt, sondern die Auszüge werden zunächst von Filtrierpapier-Streifen aufgesogen. Dann wird das obere Ende dieser Streifen, das mit Isoagglutininen stark angereichert ist, abgeschnitten und auf Objektträgern unter dem Deckglas mit A-, B- und 0-Blutkörperchen-Aufschwemmungen versetzt.

In Anlehnung an diese Methode extrahierten wir jeweils 1 cm² tier- bzw. menschenblutbefleckten Stoff 12 Std in 3 cm³ physiologischer Kochsalzlösung. Unbefleckte Stoffe mit Waschmittelsubstanz und befleckte Stoffe ohne Waschmittelsubstanz wurden als Kontrollen den gleichen Bedingungen unterworfen. Wir schnitten aus Filtrierpapier „Schleicher und Schüll, Nr. 2043“ Streifen von 0,25 × 6,0 cm Größe und hängten je einen Filtrierpapierstreifen in je ein Reagensglas mit der Extraktionsflüssigkeit. Nach einem Aufenthalt von 22 Std im Eisschrank wurden die Filtrierpapierstreifen herausgenommen (Abb. 1). Nach dem Trocknen wurden 2 cm vom oberen Ende des Filtrierpapierstreifens abgeschnitten, zerkleinert und in 0,5 cm³ physiologischer NaCl-Lösung 12 Std im Eisschrank extrahiert.

Mit diesen so gewonnenen Extraktionsflüssigkeiten wurden die Antiglobulin-Reaktionen angestellt. Sie fielen nunmehr — auch bei vorher mit konzentrierter Seifenlösung behandelten Stoffen — vollkommen störungsfrei und spezifisch aus. — Die mitlaufenden Kontrollen reagierten ebenfalls erwartungsgemäß.

Auf Papier oder Textilien gebrachte Lösungen der modernen Waschmittel leuchten unter der UV-Lampe hellgrün-weißlich fluoreszierend

auf. — Wir legten nun die vorstehend beschriebenen Filtrierpapierstreifen — nachdem sie sich mit dem Extrakt vollgesogen hatten und getrocknet waren — unter die UV-Lampe und beobachteten, daß sie in einer Höhe von etwa 1,5—2 cm vom unteren Ende an gerechnet fluorescierten. Das Aufleuchten nahm nach oben zu an Helligkeit ab. Vier Streifen wurden unter der UV-Lampe abgezeichnet und schematisch in Abb. 2 wiedergegeben. — Zur Kontrolle wurden Filtrierpapierstreifen, die sich mit Extrakten aus blutbefleckten — aber vorher nicht gewasche-

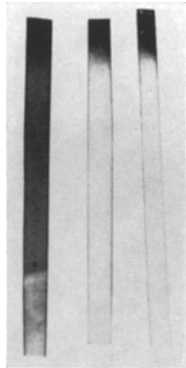


Abb. 1

Abb. 1. Einige der zur Entfernung der störenden Bestandteile benutzten Filtrierpapierstreifen

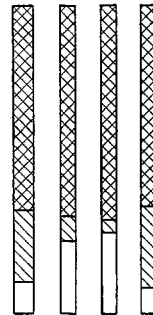


Abb. 2

Abb. 2. Ausmaß der Fluorescenz der in Abb. 1 gezeigten Filtrierpapierstreifen unter der UV-Lampe. □ Ganz helles Aufleuchten. ▨ Abnehmen der Helligkeit des Aufleuchtens mit ziemlich scharfrandiger Begrenzung nach oben

nen — Stoffen vollgesogen hatten, sowie gänzlich unbenutzte Filtrierpapierstreifen ebenfalls unter der UV-Lampe betrachtet. Die Kontrollstreifen zeigten keine Fluorescenz.

Zusammenfassung

1. Die von JUNGWIRTH ausgearbeitete Antiglobulin-Methode zur artspezifischen Differenzierung menschlichen Blutes wird durch folgende Reinigungsmittel in Konzentrationen von 1:500 und stärker gestört: Flam, Pre, Persil, Sunil, Fewa, Dixan, Suwa, Perwoll, Imi, Sil, Omo, Dor, Henko, Spüli und Rei.

2. Wäscht man Textilien (die später blutbefleckt wurden) in Waschmittellösungen von 1:500 oder stärkeren Konzentrationen, entstehen bei der Blutartdifferenzierung nach der Antiglobulin-Methode Fehlbestimmungen in der Weise, daß die Reaktionen bei Tierblutflecken gleich denen von Menschenblut ausfallen.

3. Trotz mehrfachen Spülens nach dem Waschen (bzw. nach versuchter Fleckenentfernung) können noch Waschpulverbestandteile, die den Nachweis der Blutart stören, in den Stoffen zurückbleiben.

4. Die Fehlreaktionen kommen dadurch zustande, daß die Agglutination der bei der Antiglobulin-Methode zugesetzten Erythrocyten eingeschränkt bzw. ganz aufgehoben wird.

5. Auch mehrstündiges Digerieren der durch Substratkontrollen ermittelten störenden Stoffe in dem von BURGER angegebenen Lösungsmittel stellt die Agglutinabilität der Erythrocyten bzw. die Agglutinogene des Serums nicht wieder her.

6. Es wird eine Methode beschrieben, die die störenden Einflüsse des Substrates beseitigt: Angeregt durch die Arbeit von MARCINKOWSKI über die Modifikation der Lattes-Methode werden Extrakte von Blutflecken auf Stoffen mit störenden Beimengungen (die stets durch Substratkontrollen ermittelt werden) zunächst von Filtrierpapierstreifen aufgesogen. Von diesen wird nach Trocknung das oberste Ende abgeschnitten und abermals extrahiert. Die nunmehr angestellte Antiglobulin-Methode verläuft störungsfrei und spezifisch.

7. Die zur Entfernung der störenden Bestandteile des Substrates benutzten Filtrierpapierstreifen zeigen unter der UV-Lampe an ihrem unteren Ende das für eingetrocknete Waschmittel-Lösungen typische Fluorescieren.

Literatur

- BURGER, E.: Störung der Präcipitin-Reaktion durch moderne Waschmittel und Verhinderung dieser Störung. Arch. Kriminol. **117**, 140—144 (1956).
- JUNGWIRTH, J.: Eine Schnellmethode zur artspezifischen Differenzierung menschlichen Blutes. Dtsch. Z. gerichtl. Med. **45**, 527—529 (1956).
- MARCINKOWSKI, T.: Praktische Modifizierung der Lattes-Methode. Dtsch. Z. gerichtl. Med. **48**, 264—267 (1958).
- SCHLEYER, F.: Vergleichende Untersuchungen über die Empfindlichkeit der Methoden zum Blutnachweis. Z. Immun.-Forsch. **119**, 444—453 (1960).
- SCHOENHERR, K.-E.: Neue Untersuchungen zur Frage des Waschens von Laborgeräten mit modernen Waschmitteln. Einfluß auf die Präcipitin-Reaktion? Arch. Kriminol. **119**, 132—135 (1957).
- WIENER, A. S., M. A. HYMAN and LILLIAN HANDMAN: Inhibition test for human γ -globulin. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **71**, 96 (1949). Zit. nach J. JUNGWIRTH, Dtsch. Z. gerichtl. Med. **45**, 527—529 (1956).

Dr. med. IRMELA KLOSE,
Institut für gerichtl. Medizin der Univ. Heidelberg, Voßstr. 2