

## Fehlbestimmung der Faktoren MNSs, Fy(a) sowie der Rhesusfaktoren CcDEe an gealterten Blutproben\*

IRMGARD OEPEN

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg  
(Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer)

Eingegangen am 13. Juni 1969

Die Notwendigkeit, Blutgruppen an gealterten Blutproben zu bestimmen, ergibt sich gelegentlich

- a) bei Blutproben, die zu lange transportiert wurden,
- b) bei Wiederholungsbestimmungen in Vaterschaftssachen,
- c) bei der Untersuchung einer alten, in ihrer Identität angezweifelten Alkoholblutprobe, die mit einer frischen Blutprobe desselben Probanden verglichen werden soll.

Über die optimale Methodik, mit deren Hilfe bei übereinstimmenden Ergebnissen zweier Blutproben ihre Identität mathematisch festgestellt werden kann, wurde bereits berichtet (Oepen und Trautner).

Eine wichtige Voraussetzung für die Identitätsbestimmung alter Blutproben ist die Kenntnis der *Dauer* der Nachweismöglichkeit von Blutmerkmalen. Im folgenden wird über das Verhalten von *flüssigen* Blutproben berichtet, die bei +4° C im Kühlschrank aufbewahrt wurden. (Getrocknete Blutspuren wurden nicht untersucht; daher wurde die umfangreiche Literatur hierüber [vgl. Schleyer, 1966] auch nicht berücksichtigt.)

Tabelle 1 zeigt, daß die Frage der Typenbestimmbarkeit alter Blute für die Systeme ABO, Gc und Hp bereits durch mindestens zwei verschiedene Untersucher oder Untersuchergruppen im wesentlichen beantwortet wurde. Für die Saure-Erythrocytenphosphatase- und die s-Bestimmung liegt nur je eine Studie vor. Die Tabelle enthält nur solche Befunde, bei denen die Ergebnisse nicht nur an alten, sondern auch an frischen Blutproben derselben Personen gewonnen wurden.

Die gute Nachweisbarkeit der Gm-Faktoren an alten Blutproben ist so bekannt, daß sich eine Nachprüfung erübrigte. Falsch positive Resultate wurden nur nach Erhitzung von Blutspuren auf +66° C beobachtet (Merli, Ronchi und Marchiori).

---

\* Vorgetragen anlässlich der Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, Travemünde 1969.

Tabelle 1. Bisherige Untersuchungen über den Nachweis von Blutmerkmalen an flüssigen gealterten Blutproben

Merk- male	Blutproben		Veröffentlichungen		Besondere Methodik
	n	Höchstalter	Fehler in %	Aufbewahrung Autoren (Jahr)	
AB0	100 200	24–26 Monate 2 Jahre	4–7 5–22	4° C 4° C	Schleyer, 1963 Prinz, 1964 4 Methoden verglichen 5 Methoden verglichen
s	60	{ 1–2 Tage 3 Wochen 3 Tage	{ sehr gering ± 20 signifikant	{ 4° C 24°–25° C	{ Spielmann, Ruppin, Schilling und Teixidor, 1968
Ph	10	1 Jahr	0	4° C	Richter, unveröff. —
Gc	6 10	30 Tage 4–12 Monate	0 0	4° C, 20° C, 37° C 4° C	Reinskou, 1966 Hilgermann, unveröff. —
Hp	79 5 80 46	{ 14 Tage 21 Tage 5–71 Tage ab 9 Monate 9–11 Monate	{ 33 100 — 10 2	{ 2° C 4° C, 18° C, 37° C 4° C	{ Jörgensen und Gallasch, 1962 Speiser und Neuhold, 1963 Brinkmann und Stahlbaum, 1969 Hilgermann, unveröff. Stärkegelelektrophorese Stärkegelelektrophorese Immunoelktrophorese Acrylamidgelelektrophorese

Einer Ergänzung bedurfte dagegen unser Wissen über das Verhalten der Faktoren M, N, Ss und Duffy(a). Zu diesem Zweck wurden 84 Blutproben mit bekanntem Blutgruppenstatus nach unterschiedlich langer Lagerung bei  $+4^{\circ}\text{C}$  untersucht. Außerdem wurden die Rh-Faktoren CcDEe an 50 dieser 84 Blutproben nach 10 Monate langer Aufbewahrung bestimmt.

### Methodik

Die Erythrocyten der gealterten Blutproben wurden in Zentrifugenröhrchen (10 ml) gewaschen und nicht in Kapillaren (nach Ponsold), da sonst die Ausbeute zu gering gewesen wäre.

Die Faktoren M und N wurden mit kompletten Antiseren auf dem Objektträger untersucht. Das Merkmal S wurde an 65 Bluten mit kompletten Antiseren, an 19 Bluten im Coombs-Test im Röhrchen festgestellt. Die Merkmale s und Fy(a) wurden ebenfalls im Röhrchen, aber nur im Coombs-Test bestimmt. Die Rh-Faktoren wurden mit inkompletten Antiseren am Vollblut auf dem „Rhesognost“, die Faktoren E und e außerdem auf der Tüpfelplatte nach Inkubation bei  $+37^{\circ}\text{C}$  getestet.

Die Ergebnisse wurden nur makroskopisch abgelesen, da der mikroskopische Befund keine verwertbare Differenz zwischen fraglichen, ursprünglich positiven und fraglichen, ursprünglich negativen Reaktionen zeigte.

### Ergebnisse

Aus der grafischen Darstellung der Ergebnisse (Abb. 1—6) geht zunächst hervor, daß das Untersuchungsgut je nach Lagerungsdauer in 4 Serien aufgeteilt wurde. Man sieht, daß die Nachweismöglichkeit der genannten Blutmerkmale nicht allein vom Alter der Blutproben abhängt, sondern ganz wesentlich davon, ob die Kühlkette unterbrochen wurde und Manipulationen an der Blutprobe stattfanden. Die 10 Monate alten Blutproben, die ungestört in der Kälte verblieben waren, zeigen eine geringere Fehlerquote als jüngere Blutproben, die mehrfach aus dem Kühlschrank genommen und aufgerührt wurden. Dabei hat die bakterielle Verunreinigung vermutlich den größten Anteil an den Veränderungen, durch die die Bestimmbarkeit der Merkmale beeinträchtigt wird. Diese Beobachtung trifft für alle untersuchten Systeme zu.

Der Faktor N (Abb. 2) erwies sich gegenüber dem Faktor M (Abb. 1) als weniger störfähig. Damit verhalten sich die hier untersuchten *flüssigen* Blutproben anders als *Blutspuren*, wie Befunde von Marziano und Guardabasso, sowie von Krüger ergaben, in denen M sicherer nachzuweisen war als N. Entsprechend fand Pereira nur bei Spuren von M-Blut falsche, nämlich schwach N-positive Resultate, während N immer richtig angezeigt wurde. Sie führt diese Erscheinung auf das Vorhandensein N-ähnlicher Substanz bei M-Individuen zurück. In unserem Untersuchungsgut traten sowohl falsch positive wie auch falsch negative Ergebnisse bei der M-Bestimmung häufiger auf als bei Bestimmung des Faktors N. Es ist denkbar, daß die Differenz zwischen flüssigen und getrockneten Bluten

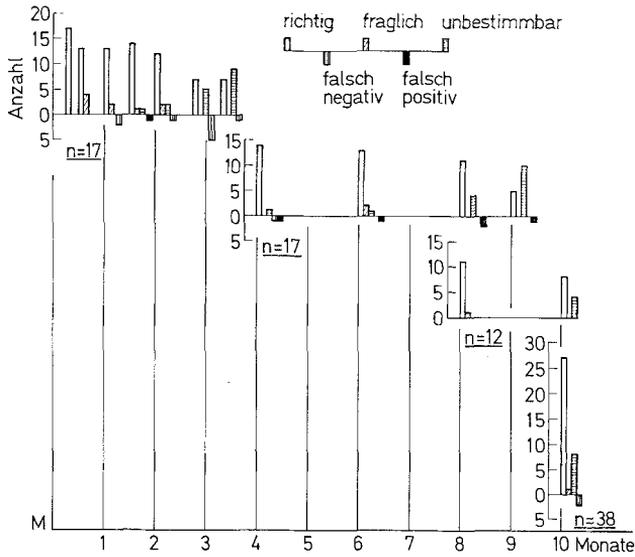


Abb. 1. Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen im MN-System an 4 Serien alter Blutproben; Verhalten des Faktors M

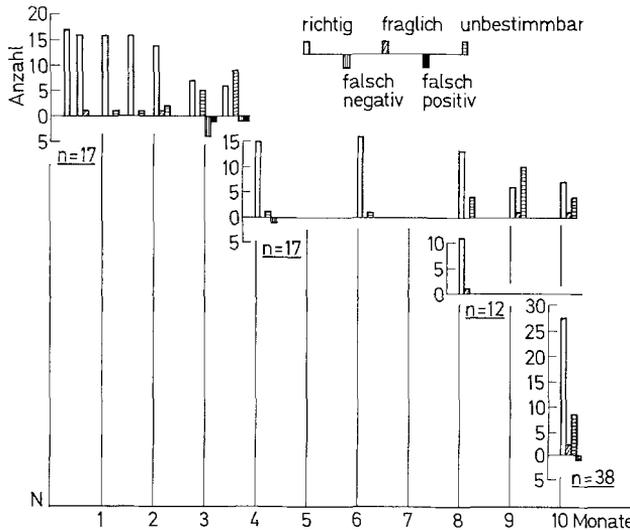


Abb. 2. Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen im MN-System an 4 Serien alter Blutproben; Verhalten des Faktors N

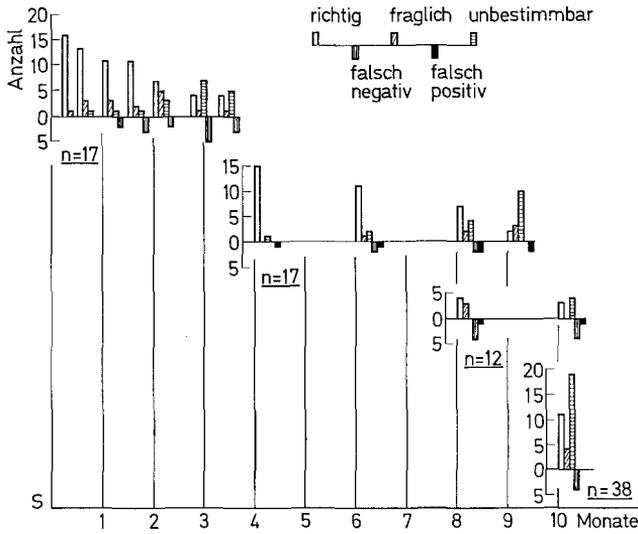


Abb. 3. Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen im Ss-System an 4 Serien alter Blutproben; Verhalten des Faktors S

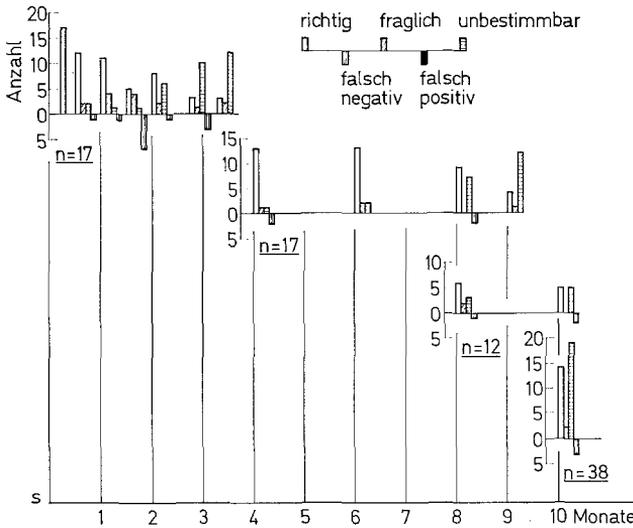


Abb. 4. Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen im Ss-System an 4 Serien alter Blutproben; Verhalten des Faktors s

auf unterschiedlichen Abbauprozessen beruht, da sie ja auch einer unterschiedlichen Bakterienflora ausgesetzt sind. Auf die besondere Wirkung verschiedener Mikroben bei der Zersetzung der Blutbestandteile haben auch Speiser und Neuhold hingewiesen. Spezifische, das M- und N-Agglutinogen alterierende Faktoren sind seit langem bekannt (u. a. Springer und Ansell, Nagel und Sachs). Die sicher mehrschichtigen, ursächlichen Einflüsse, die zu den abweichenden Befunden führten, konnten jedoch im Rahmen dieser Untersuchungen nicht analysiert werden.

Die meisten Fehler wurden bei der Bestimmung von S (Abb. 3) und Fy(a) (Abb. 5) gefunden. Für S ergab die Untersuchung mit kompletten und inkompletten Antiseren keinen Unterschied.

s (Abb. 4) wurde im Gegensatz zu den bereits genannten Faktoren zwar einige Male falsch negativ, aber nie falsch positiv angezeigt. Die Abschwächung oder der Verlust der positiven Reaktionen lag auch bei uns ebenso wie bei Spielmann u. Mitarb. bei 20%. Bei den 10 Monate gelagerten Bluten liegt sie etwas höher (7 von 26 Blutproben=27%), wenn man nur diejenigen berücksichtigt, bei denen sich noch eine Erythrocytensuspension herstellen ließ und bei denen daher überhaupt ein Ergebnis abzulesen war.

Das Rh-System (Abb. 6) brachte die sichersten Ergebnisse. Auch hier traten keine falsch positiven Resultate auf. Die Zuverlässigkeit war für die Faktoren C, c und D im Schnelltest auf dem Resognost größer als für die Faktoren E und e, die sich aber nach 10—20' Inkubation bei +37° C fast immer richtig bestimmen ließen. 3 Blutproben, die auch dann noch keine brauchbaren Reaktionen zeigten, ergaben nach Eintrocknung auf Stoff deutlich ablesbare, richtige Resultate im Absorptionsversuch, wenn die Blutflecken mit Bromelin vorbehandelt wurden. Nicht ganz so eindeutig waren die Ergebnisse im Absorptions-Elutionsverfahren (Bornscheuer). Auch dieser Befund steht im Gegensatz zu einer Studie an Blutspuren anderer Autoren (Bargagna und Pereira), die mit Anti-c falsch positive Resultate erhielten. Sie fanden für dieses Phänomen, das allerdings nicht bestätigt wurde (Lincoln und Dodd, Bornscheuer), keine Erklärung.

Im ganzen traten falsch negative Ergebnisse wesentlich häufiger auf als falsch positive, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, in der die Zahl der Blute angegeben ist, an denen falsche Resultate beobachtet wurden.

Die am meisten irritierenden falsch positiven Resultate wurden z.T. an derselben Blutprobe innerhalb von 3 Monaten 2- oder 3mal beobachtet, bis wieder eine negative Reaktion eintrat oder keine Erythrocytensuspension mehr herzustellen war. An einem Blut kamen zwei dieser Fehlbestimmungen zugleich vor, und zwar für M und S. Die falsch positiven Befunde stellten sich im allgemeinen später ein als falsch negative Resultate.

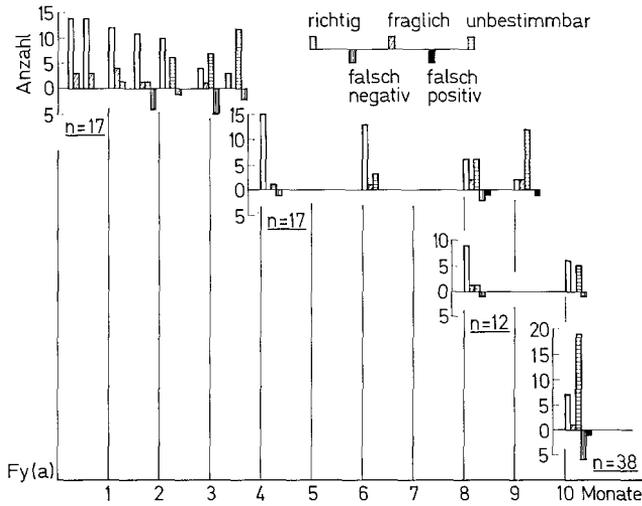


Abb. 5. Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen im Duffy-System an 4 Serien alter Blutproben; Verhalten des Faktors Fy(a)

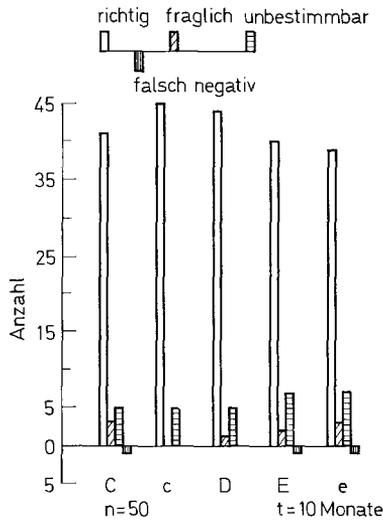


Abb. 6. Ergebnisse im Rhesus-System

Die letzten, sicher erfaßbaren Merkmale waren bei 50 Bluten 5mal nur die 5 untersuchten Rhesus-Faktoren, 2mal nur die Faktoren M und N und 6mal diese 7 Merkmale zusammen; die übrigen Faktoren waren nie als einzige erhalten geblieben.

Tabelle 2

Fak- toren	Zahl der falsch diagnostizierten Blute						
	n	falsch positiv		falsch negativ		insgesamt	
		absolut	in %	absolut	in %	absolut	in %
M	84	3	3,6	8	9,5	11	13,1
N	84	1	1,2	6	7,1	7	8,3
S	84	3	3,6	14	16,7	17	20,2
s	84	0	—	12	14,3	12	14,3
Fy(a)	84	2	2,4	15	18,0	17	20,2
C	50	0	—	1	2	1	2
c	50	0	—	0	—	0	—
D	50	0	—	0	—	0	—
E	50	0	—	1	2	1	2
e	50	0	—	1	2	1	2

### Zusammenfassung

Die Zuverlässigkeit des Nachweises von Blutmerkmalen an gealterten Bluten ist in erster Linie von der Art der Aufbewahrung abhängig. Sie ist am größten, wenn die Blutproben in verschlossenen Gefäßen und ohne mechanische Einflüsse (wie Umrühren und Zentrifugieren) in Kälte (bei  $+4^{\circ}\text{C}$ ) verwahrt werden. Der Zeitfaktor spielt für die Stabilität der Blutmerkmale nur eine untergeordnete Rolle. Alterungsprozesse wirken sich am wenigsten bei der Bestimmung der Rh-Faktoren aus. Die nächstniedrige Fehlerquote weist der Faktor N auf. Die Quote liegt noch höher bei Bestimmung der Faktoren M und s und ist bei S und Fy(a) am höchsten.

### Summary

The reliability of blood group typing depends mainly on the manner of blood storage. It is greatest, if blood samples are stored at  $+4^{\circ}\text{C}$  in closed tubes without mechanical influences like stirring or centrifugation. Storage time is less important. Ageing has the least effect on the determination of the Rh antigens. The antigen N determination comes next. Typing reliability with regard to the antigens M and s is still less and even smaller for S and Fy(a).

Fräulein Ursula Bock, med.-techn. Assistentin am Institut, danke ich für freundliche Hinweise und für Zweitbestimmungen.

### Literatur

- Bargagna, M., Pereira, M.: A study of absorption-elution as a method of identification of rhesus antigens in dried bloodstains. *J. forens. Sci.* **7**, 123—130 (1967).  
Bornscheuer, V.: Diss. Marburg (noch unveröffentlicht).

- Brinkmann, B., Stahlbaum, A.: Immunelektrophoretische Bestimmung der Haptoglobintypen aus Seren, alten Blutproben und Blutspuren. Festschr. E. Fritz, Hamburg 1969.
- Hilgermann, R.: Noch unveröffentlicht.
- Jørgensen, G., Gallasch, E.: Instability of heterozygous haptoglobin type 2—1 in starch-gel electrophoresis. *Lancet* **1962**, 1301.
- Krüger, B.: Untersuchungen zur ABO- und MN-Bestimmung an Blutflecken nach Gefrierrocknung der Extrakte. Diss. Marburg 1969.
- Lincoln, P., Dodd, B.: The detection of the Rh antigens C, C<sup>w</sup>, c, D, E, e and the antigen S of the MN<sub>S</sub>s system in bloodstains. *Med. Sci. Law* **8**, 288—295 (1969).
- Marziano, E., Guardabasso, B.: Ricerche sulla identificabilità degli agglutinogeni M, N su macchie di sangue di varia età. *G. Med. leg.* **9**, 304—310 (1963).
- Merli, S., Ronchi, G., Marchiori, A.: La determinazione su macchie di sangue dei fattori Gm(a), Gm(b) e Gm(x). *Zacchia* **40**, 368—380 (1965).
- Nagel, V., Sachs, V.: Zur Serologie gefärbter Blutkörperchen. *Blut* **6**, 193—202 (1960).
- Oepen, I., Trautner, R.: Zum Ausschluß einer Blutprobenverwechslung durch vergleichende Blutgruppenuntersuchung. *Blutalkohol* **5**, 270—276 (1968).
- Pereira, M.: The identification of MN groups in dried bloodstains. *Med. Sci. Law* **3**, 268—271 (1963).
- Ponsold, A.: Der Nachweis von Agglutininen schwächster Wirksamkeit. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **24**, 60—68 (1935).
- Prinz, B.: Vergleichende Untersuchungen zur ABO-Gruppenbestimmung 2 Jahre alter Alkoholblutproben an Hand von Agglutinin- und direkten Agglutinogennachweisen. Diss. Bonn 1964.
- Reinskou, T.: On the confidence of Gc type determinations. *Vox. Sang. (Basel)* **11**, 70—80 (1966).
- Richter, O.: Noch unveröffentlicht.
- Schleyer, F.: Vergleichende Versuche zur ABO-Gruppenzuordnung hämolytischer Blutproben mit Hilfe des Lattes- und des Absättigungsversuches und von Absorptions-Elutionsverfahren. *Z. ges. Hyg.* **149**, 281—286 (1963).
- Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung. Lübeck: Schmidt-Römhild 1966.
- Speiser, P., Neuhold, R.: Experimentelle Untersuchungen über die Zeitspanne der Nachweisbarkeit der Haptoglobintypen im Leichenblut. *Acta Med. leg.* **1963**, 35—49.
- Spielmann, W., Ruppig, H., Schilling, L., Teixidor, D.: Genotypenfrequenzen und Vererbung im MN<sub>S</sub>s-System, zugleich ein Beitrag über die Verwendbarkeit der Merkmale S und s im Blutgruppengutachten. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **64**, 186—203 (1968).
- Springer, G., Ansell, N.: Inactivation of human erythrocyte agglutinogens M and N by influenza viruses and receptor destroying enzyme. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **44**, 182—189 (1958).

Dr. med. Irmgard Oepen  
Institut für gerichtliche Medizin  
der Universität Marburg  
355 Marburg  
E. Mannkopff-Str. 2