

Neue Untersuchungen zur A-Untergruppen-Differenzierung an Blutspuren

R. HILGERMANN

Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg (BRD)

Eingegangen am 30. September 1970

New Investigations about Sub-typing of Group A Blood Traces

Summary. A modified absorption-elution technique as a method of sub-typing group A bloodstains and blood traces is described. The procedure is suitable for microanalysis even when only low titred antisera and anti-A and anti-H lectins are available, if optimal performance conditions are employed.

Key-Words: A-Untergruppenbestimmung, Differenzierung in Blutspuren — Blutspuren, A-Untergruppendifferenzierung.

Zusammenfassung. Ein modifiziertes Absorptions-Elutionsverfahren zur A-Untergruppenbestimmung an Blutspuren wird beschrieben. Das Verfahren ist auch bei Verwendung absorbierter Antiseren und von Phyttagglutininen niedrigen Titers für die Mikroanalyse geeignet, wenn optimale Arbeitsbedingungen eingehalten werden.

Der Versuch des Nachweises der A-Untergruppen an Blutspuren ergibt keineswegs immer sichere Resultate. Von den gängigen Verfahren zur AB0-Diagnostik sind der Agglutininnachweis wegen seines Wirkungsprinzips, der Absättigungsversuch wegen seiner geringen Empfindlichkeit sowie aus Mangel an Antiseren mit genügend hohen Titern zur Untergruppen-Differenzierung, vor allem an Fleckenextrakten, wenig geeignet. Es galt daher, die beiden anderen üblichen Verfahren, d.h. die Mischagglutination und den Agglutininbindungs-Absprengversuch zu erproben und zu modifizieren. Poon und Dodd haben eine Methode der A-Untergruppendifferenzierung mittels der Mischzellagglutination unter Verwendung papainbehandelter Indicatorzellen und eines Anti-A₁-Extraktes aus dem Samen von *Dolichos biflorus* beschrieben. Morgan und Richards halten das Absorptions-Elutionsverfahren für geeigneter, wenn man nur Anti-A₁-Agglutinin aus *Dolichos* ohne Fermentierung der Testzellen verwendet. Auf Grund der Beobachtung von Krüpe, daß *Dolichos biflorus* nach Papainbehandlung der Indicatorzellen zwar A₂-, nicht aber A₂B-Blutkörperchen agglutiniert, und daß dieses Phänomen zur A₂B-Verifizierung bei gelegentlich schwieriger A₁B-A₂B-Differenzierung herangezogen werden könnte, wurde die Brauchbarkeit der Absorptions-Elutionsmethodik und der Mischzellagglutination unter Verwendung einiger Phyttagglutinine mit Anti-A-Wirksamkeit, eines Forellenrogenextraktes (Anti-B_{sal}) und der in der Blutgruppenserologie bekannten proteolytischen Enzyme (Papain, Trypsin, Pronase, Ficin, Bromelin, Panozym) geprüft.

Material

I. *Antiseren*. 1. Absorbiertes menschliches Anti-A₁-Serum (Ortho Diagnostics) mit einem Anti-A₁-Titer von 1:4.

2. Anti-A₁-Phyttagglutinin aus *Dolichos biflorus*, dessen konzentrierter Rohextrakt auch A₂-Erythrocyten agglutiniert, dessen Wirksamkeit gegen A₁ aber etwa 500mal größer ist als gegen A₂ (Bird).

3. Anti-H-Phyttagglutininextrakte aus *Laburnum alpinum* und *Ulex europaeus*.

Herstellung der Extrakte nach Tobiška: Zerkleinern des trockenen Samens im Mörser oder Schlagmühle, 24 h Inkubation eines Gemisches aus 1 Teil Samenmehl und 9 Teilen 0,85% NaCl-Lösung im Brutschrank bei 37° C unter gründlichem Durchschütteln, 20 min Abzentrifugieren der Samentteile bei 3000—4000 U/min, Verdünnung des Überstandes, bis die Extrakte „spezifisch“ waren. Der Anti-A₁-Titer lag nach entsprechender Verdünnung der Rohabgüsse durchschnittlich bei 1:32—64 (*Dolichos biflorus*), der Anti-H-Titer bei 1:4—8 (*Laburnum*) und bei 1:8—16 (*Ulex*). Eine Absorption der Phyttagglutininextrakte war unsicher und führte zumal bei den Anti-H-Präparationen zu erheblichem Titerverlust. Sämtliche käuflichen Anti-H-Seren waren unbefriedigend. Sie besaßen alle einen sehr niedrigen Titer und zeigten fast ausnahmslos auch A₁ an.

4. Anti-B_{sal}, ein thermostabiles sog. Protectin, zubereitet aus Forellenrogenextrakt von *Salmo irideus* nach den Vorschriften von Dürwald und Leopold, das mit 2% NaCl-Lösung B- und A₂B-, nicht aber A₁B-Blutkörperchen, und mit 0,9% NaCl-Lösung keine Blutkörperchen agglutinieren soll.

II. *Blutflecken*. 220 Blutmuster der Gruppe A₁, A₂, A₁B und A₂B wurden auf Wolle, Leinen, Nylon und Glasplatten aufgetropft und bei Zimmertemperatur getrocknet.

III. *Proteolytische Enzyme*. Bromelin (Behringwerke); Pronase (Fresenius); Ficin (Hyland); Panozym, ein Bromelin-Ficinmisch (Molter); außerdem Enzymlösungen aus Trypsin 2000 E/g (Merck); Papain (Merck) und Ficin, wasserlöslich, 75000 E/g gegen Casein (Merck). Diese Enzymlösungen wurden nach der bei Dunsford und Bowley angegebenen Technik hergestellt und in kleinen Portionen bei -20° C aufbewahrt.

Methodik

1. *Vorversuche*. Die mit 0,85% NaCl-Lösung hergestellten Anti-B_{sal}-Extrakte agglutinierten A₁B bis zu einer Verdünnung von 1:10. A₁, A₂ und 0 wurden nicht agglutiniert. Bei Herstellung des Extraktes in 2% NaCl-Lösung nach Vorschrift (unverdünnt) trat Panagglutination auf, ab Verdünnung 1:3 reagierte er nur mit A₁B, A₂B und B, und erst bei sehr starker Verdünnung des Extraktes waren brauchbare Ergebnisse zur Differentialdiagnose zwischen A₁B und A₂B zu verzeichnen. Es bestand also kein qualitativer Unterschied zwischen diesen beiden NaCl-Lösungen, und die Befunde von Dürwald u. Mitarb. waren nicht reproduzierbar. Das Reagens eignete sich nicht für die Mischagglutination und auch nicht für die Absorption-Elution, obwohl dessen gleichbleibende Thermostabilität bis etwa 50° C nachgewiesen werden konnte (Jarosch u. Mitarb.).

In weiteren Versuchen wurde ermittelt, daß bei allen Phyttagglutinen eine deutliche Titersteigerung auftrat, wenn die dem Antikörper homologen Testblutkörperchen enzymbehandelt wurden. Zugleich agglutinierten die „spezifischen“ Phyttagglutinine die fermentierten *heterologen* Blutkörperchen in einigen Titerstufen; sie wurden also gleichsam wieder „unspezifisch“. Dieses Phänomen sollte zum „indirekten“ Nachweis der A-Untergruppen-differenzierung herangezogen werden (s. Diskussion).

2. *Mischagglutination*. Der Arbeitsgang entsprach im wesentlichen der Methode von Nickolls und Pereira unter Berücksichtigung einiger von Fiori (1961) und Benciolini angegebenen Modifikationen. Blutfleckenstückchen und Blutstaub der Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, A₂B wurden in silikonisierten Hohlschliff-Objektträgern verteilt (Maresch u. Wehrschütz) und 15—20 min mit Methanol fixiert. Das Fleckenmaterial wurde in möglichst feine Flöckchen aufgefasernt, und erst nach völligem Verdampfen des Methanols wurden die 4 oben aufgeführten Antiseren zugesetzt. Die Proben wurden dann in einer feuchten Kammer in der Kälte 12, besser 24 h stehengelassen. Das Antiserum wurde nach der Inkubation mit einer Mikropipette abgesaugt und das Faser- oder Blutstaubmaterial 5—7mal mit eiskalter NaCl-

Lösung gewaschen. Die letzte Spülflüssigkeit muß zur Kontrolle auf Agglutinationsfähigkeit gegen A_1 - und A_2 -Erythrocyten geprüft werden. Anschließend wurde jeder Probe 1 Tropfen einer 0,5% frischen, dem zugefügten Antiserum entsprechenden Blutkörperchensuspension mit einem Rinderalbumingehalt von 1% zugegeben. Die Ansätze wurden 2—6 h bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer inkubiert und die Resultate mikroskopisch abgelesen.

3. *Absorption-Elution*. Abgewandelte Technik in Anlehnung an das von Fiori u. Mitarb. angegebene Verfahren:

Blutfleckenstückchen auf synthetischen Fasern und Blutschüppchen wurden erst mit Aceton (Fiori, 1961), dann mit Methanol, die übrigen Blutflecken nur mit Methanol fixiert. Nach völligem Verdampfen der Fixationsflüssigkeit wurde das Fleckenmaterial nicht zerfasert, sondern fein zerschnitten und von jeder Probe wurden winzige Substratmengen nach dem Schema (Tabelle 2) auf insgesamt 16 (A_1 oder A_1B) oder 10 (A_2 oder A_2B) hydrophobierte Röhrchen von 7 mm lichter Weite verteilt. Je 2 Tropfen der 4 Antiseren wurden auf jede einzelne Probe aufgetropft, und zwar so, daß jeweils mit den homologen Antiseren je 1 Röhrchen und mit den heterologen Antiseren je 7 Röhrchen beschickt wurden. Nach 12—24 h Inkubation im Kühlschrank bei 4° C wurde das Antiserum unter der Wasserstrahlpumpe mit einer Mikropipette abgesaugt. Das Material wurde 5mal mit eiskalter NaCl-Lösung durch kräftiges Schütteln der Röhrchen gewaschen, wobei die Blutschüppchen notfalls nach jedem Waschvorgang zentrifugiert werden mußten. Eine Prüfung der letzten Waschflüssigkeit auf noch vorhandene freie Antikörper ist bei dieser Methode entbehrlich. Nach sorgfältigem Absaugen der Spülflüssigkeit wurde in jedes Röhrchen 1 Tropfen einer 0,85% NaCl-Lösung mit 1% Rinderalbumingehalt gegeben und 20 min bei 56° C im Wasserbad eluiert. Anschließend wurde das noch warme Eluat in entsprechend beschriftete, nicht hydrophobierte Röhrchen übertragen und jeder Probe 1 Tropfen einer dem eluierten Antikörper homologen 1% Blutkörperchensuspension (Suspensionsmedium: 0,85% NaCl-Lösung mit 1% Albumingehalt) zugesetzt. Nach 10 min Inkubation wurde das Reaktionsgemisch 1 min bei 1000 U/min zentrifugiert und nach Aufschütteln makroskopisch abgelesen. In alle Röhrchen, deren Eluate die erwarteten negativen Ergebnisse zeigten, wurde je Probe je 1 Tropfen der 6 proteolytischen Enzyme zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei 37° C wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert und nach Aufschütteln erneut abgelesen.

Kontrollansätze mit sauberen Stoffproben sowie mit fermentierten Testzellen zum Ausschluß einer fermentbedingten Autoagglutination wurden mitgeführt. Außerdem wurde an allen Proben die A- und B-Gruppeneigenschaft mit dieser Methode bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Das Verfahren der Mischagglutination zeigte wenig befriedigende, teilweise völlig unbrauchbare Resultate. Daß der Blutgruppennachweis an synthetischen Fasern schlecht oder gar nicht gelingt, ist seit den Untersuchungen von Maresch und Wehrschütz wie auch anderer Autoren bekannt. Als Ursachen kommen in Frage: mangelndes Eindringen des benetzenden Blutes in die synthetische Faser; daher vorzeitige Auswaschung vor allem des unfixierten Antigens durch das Antiserum, zum Teil erheblicher staubförmiger Antigenverlust beim Zerschaben oder Zerspleißen des Gewebes in feinste Fibrillen und schließlich zu geringer Titer der Antiseren. Die beiden letztgenannten Ursachen gelten auch für die Stoff- und Wollstoffproben.

Die Untersuchungen wurden daher nur noch mit der *Absorptions-Elutionsmethode* weitergeführt, deren Ergebnisse aus den Tabellen 1 und 2 ersichtlich sind.

Tabelle 1 zeigt die jeder Untergruppendifferenzierung voranzusetzende Bestimmung der A- und B-Gruppeneigenschaften an Blutflecken auf Leinen, Nylon und an Blutschüppchen unter Verwendung von Antiseren mit hohem Titer.

Die Reaktionsschemata der Untergruppenbestimmung an Blutflecken auf Leinen sind in der Tabelle 2 wiedergegeben; die Reaktionsergebnisse an Flecken

Tabelle 1. *Reaktionsschema der A- und B-Bestimmung von 9 Monate alten Blutschüppchen*
A- und Anti-

L. = Leinen, N. = Nylogewebe, S. = Trockenblutschüppchen.

Spur	A ₁						A ₂					
	Anti-A			Anti-B			Anti-A			Anti-B		
	L.	N.	S.	L.	N.	S.	L.	N.	S.	L.	N.	S.
Testzellen	A ₁	A ₁	A ₁	B	B	B	A ₁	A ₁	A ₁	B	B	B
Reaktion	++++	++++	++++	-	-	-	++++	++++	+++	-	-	-

auf Nylon und an Blutschüppchen waren grundsätzlich gleich. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von 3 und 9 Monate alten Blutspuren zeigt, daß eine altersabhängige Abschwächung der Reaktionen zu verzeichnen war, die sich am geringsten an den Blutflecken auf Leinen ausgewirkt hat. Wesentlich schwächer waren auch bei der Absorption-Elution alle Reaktionen am Fleckenmaterial auf Nylon und Stoff, wenn das Material zerfasert oder zerschabt und — das galt vor allem für frische Blutflecken — nicht fixiert worden war.

Tabelle 2. *Reaktionsschema der Untergruppenbestimmung von 3 und*

Antiseren: absorbiertes, menschliches Anti-A₁, Phyttagglutinine s. Text. Fermentierungstärken nach folgendem Schema: ++++ zusammenhängende Flocke; +++ lockere makroskopisch sichtbare Agglutinate; — keine Agglutination. Obere Zeile: Ergebnisse an

Spur	A ₁				A ₂			
	absorb. Anti-A ₁	Dol.	Ul.	Lab.	absorb. Anti-A ₁	Dol.	Ul.	Lab.
Test-Blkp.	A ₁	A ₁	A ₂	A ₂	A ₁	A ₁	A ₂	A ₂
Reaktion ohne Ferment	++ +	+++ +++	- -	- -	- -	- -	++++ ++	+ (+)
Bromelin			++++ ++++	+++ ++			++++ ++++	
Papain			++++ ++++	+++ (+)			++++ +++	
Trypsin			++++ +++	- -			++++ ++	
Panozym			++++ +++	+++ ++			+++ +	
Ficin			++++ ++++	+++ ++			+++ ++++	
Pronase			++++ ++++	+++ ++			++++ ++++	

sowie Blutflecken auf Stoff und Nylon im Absorptions-Elutionsversuch mit hochtitrierenden Anti-B-Immunsereen

A ₁ B						A ₂ B					
Anti-A			Anti-B			Anti-A			Anti-B		
L.	N.	S.	L.	N.	S.	L.	N.	S.	L.	N.	S.
A ₁	A ₁	A ₁	B	B	B	A ₁	A ₁	A ₁	B	B	B
++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Die Fermentierung der heterologen Blutkörperchen zur „indirekten“ Differenzierung hat ebenfalls brauchbare Resultate gezeigt. Offenbar werden bei der Elution doch „unspezifische“ Antikörper abgesprengt, die erst nach Fermentierung der entsprechenden Testzellen kräftige Agglutinate bilden. Natürlich können diese Reaktionen nur dann als beweisend angesehen werden, wenn *vor* der Fermentierung die Ergebnisse mit den homologen Antiseren eindeutig positiv und mit den heterologen Antiseren eindeutig negativ waren. Eine Fermentierung der Indicatorzellen

9 Monate alten Blutflecken auf Leinen im Absorptions-Elutionsversuch

der negativen Reaktionsansätze mit 6 verschiedenen proteolytischen Fermenten. Agglu-Flocke; ++ größere Einzelagglutinate; + feine Agglutinate; (+) schwache, eben noch 3 Monate alten Blutflecken; untere Zeile: Ergebnisse an 9 Monate alten Blutflecken.

A ₁ B				A ₂ B			
absorb. Anti-A ₁	Dol.	Ul.	Lab.	absorb. Anti-A ₁	Dol.	Ul.	Lab.
A ₁	A ₁	A ₂	A ₂	A ₁	A ₁	A ₂	A ₂
+	+++	-	-	-	-	++	+
+	++	-	-	-	-	+	(+)
		++++	+++			++++	
		++++	+			++++	
		++++	+++			+++	
		++++	+			++	
		++++	-			+++	
		++++	-			++	
		++++	++			+++	
		++	+			+	
		++++	+++			++++	
		++++	+++			++++	
		++++	+++			++++	
		++++	+++			++++	

von vorneherein, wie sie Poon und Dodd empfehlen, erscheint nur bei hochspezifischen Antiseren sinnvoll, nicht aber bei Phyttagglutininen. Verfährt man nach den Vorschlägen dieser Autoren, so besteht die Gefahr, daß man die falsche Untergruppe oder im günstigsten Falle beide Untergruppen gleichzeitig bestimmt.

Für die Routine empfiehlt sich die Verwendung von Bromelin, Pronase oder Ficin und von den Phyttagglutininen Dolichos und Ulex. Trypsin ist unter den Fermenten am wenigsten geeignet (s. z. B. Ansätze Trypsin/Laburnum). Bei A₂B-Blutflecken ist zu beachten, daß eine Agglutination mit abgesprengtem Antikörper von Dolichos ausbleiben kann, wenn man papain- oder trypsinbehandelte Testzellen verwendet. Bei Verwendung von Bromelin oder Pronase wurden niemals negative Reaktionen verzeichnet. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß bei AB-Blutspuren Anti-H-Extrakte auch durch den H-Charakter der B-Eigenschaft absorbiert werden können. Im übrigen wurde bei den Fermenttests aus Gründen der Vereinfachung der „einstufige“ Test gewählt, da die proteolytischen Enzyme offenbar keine Veränderung der Phyttagglutinextrakte bewirkten.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß das Absorptions-Elutionsverfahren im Röhrchentest als brauchbare Methode zur A-Untergruppendifferenzierung sowohl an Blutflecken als auch an Blutspuren anzusehen und der Mischagglutination überlegen ist. Entgegen der Auffassung einiger Autoren ließ sich ferner nachweisen, daß auch Antiseren mit niedrigem Titer durchaus brauchbare Ergebnisse liefern können (so auch Schleyer).

Zur Vermeidung fehlerhafter Resultate, vor allem bei schwachen Antiseren, sind folgende Kautelen zu beachten:

1. Phyttagglutinine müssen „spezifisch“ sein.
2. Das Fleckenmaterial sollte möglichst fein zerschnitten und fixiert sein (keine Rückstände der Fixationsflüssigkeit, da sonst Eiweißdenaturierung des Antiserums!).
3. Je geringer der Antiserumtiter ist, um so länger sollte die Inkubationszeit (Antigen-Antikörperreaktion) und um so geringer die Konzentration der (möglichst frischen) Blutkörperchensuspensionen sein.
4. Bei dieser Mikrobestimmung sind große Volumina zu vermeiden. Reichliche Zugabe allzu konzentrierter Testzellsuspensionen zum Eluat führt zu einem Mißverhältnis zwischen Antikörper und Antigen. Sie ist wohl die häufigste Ursache zu schwacher oder falsch negativer Resultate.
5. Kontrollen frischer A₁-, A₂-, A₁B- und A₂B-Blutflecken sind stets mitzuführen.

Das Prinzip der Methodik besteht also im Ansatz der unbekanntten Spur mit einem absorbierten Anti-A₁-Serum, einem Anti-A₁-Phyttagglutinin und einem wirksamen Anti-H(A₂)-Phyttagglutinin. Zur Abrundung des Ergebnisses ist zu den jeweils negativ gebliebenen Reaktionsansätzen Ferment zu geben. Eine erst jetzt auftretende unspezifische Agglutination in diesen Ansätzen erhärtet indirekt das primäre Ergebnis.

Nachtrag bei der Korrektur: Eine weitere Modifikation der Absorptions-Elutions-Methode zur A-Untergruppenbestimmung an Blutflecken stammt von Hayward. Verf. versetzt das blutfleckte Gewebe zunächst mit gepufferter Trypsinlösung und verwendet nur Dolichosextrakt und trypsinisierte A₁-Testzellen. Bei über 200 Untersuchungen an mindestens 12 Monate alten Flecken keine Fehlbestimmungen.

Frau M. Stallforth gebührt besonderer Dank für ihre zuverlässige technische Assistenz.

Literatur

- Benciolini, P.: La agglutinazione mista. *Med. leg.* **12**, 155 (1964).
- Bird, G. W. G.: Zit. nach Prokop und Uhlenbruck.
- Dürwald, W., Leopold, D.: Unterscheidung der Blutgruppen A₁B und A₂B durch Anti-B_{sal} (aus Forellenrogen). *Dtsch. Gesundh.-Wes.* **22**, 2392 (1967).
- Dunsford, I., Bowley, C. C.: *Techniques in blood grouping*, 2. Aufl. Edinburgh: Oliver & Boyd 1967.
- Fiori, A.: L'agglutinazione mista nell'identificazione degli antigeni AB0 in tracce di sangue. *Med. leg.* **9**, 205 (1961).
- Marigo, M., Benciolini, P.: Modified absorption-elution method of Siracusa for AB0 and MN grouping of bloodstains. *J. forensic Sci.* **8**, 419 u. 435 (1963).
- Hayward, J.: The sub-typing of group A bloodstains. *J. forens. Sci. Soc.* **9**, 147 (1969).
- Jarosch, K., Schnitzler, St., Prokop, O., Uhlenbruck, G.: Anti-B (Anti-B_{sal}) in Forelleneiern. *Z. ärztl. Fortbild.* **61**, 758 (1967).
- Krüpe, M.: Persönliche Mitteilung.
- Maresch, W., Wehrschütz, E.: Moderne Methoden der Blutfleckendiagnostik. *Arch. Kriminol.* **132**, 1 (1963).
- Morgan, B. R. J., Richards, S. L.: Sub-typing of group A bloodstains. *Med. Sci. Law* **7**, 82 (1967).
- Nickolls, L. C., Pereira, M.: A study of modern methods of grouping dried blood stains. *Med. Sci. Law* **2**, 172 (1962).
- Poon, W. L., Dodd, B. E.: The subdivision of blood stains into A₁ and A₂ and the detection of H on human epidermal cells. *Med. Sci. Law* **4**, 258 (1964).
- Prokop, O., Uhlenbruck, G.: *Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen*, 2. Aufl. Leipzig: Georg Thieme 1966.
- Schleyer, F.: *Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung*. Lübeck: Schmidt-Römhild 1966.
- Tobiška, J.: *Die Phythämagglutinine*. Berlin: Akademie-Verlag 1964.

Dr. med. Reinhard Hilgermann
Institut für Rechtsmedizin
der Universität
D-3550 Marburg, E.-Mannkopff-Str. 2