

Eine verbesserte Methode zum Nachweis des Y-Chromosoms in Blutspuren

J.L. THOMSEN

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Kopenhagen (Dänemark)

Eingegangen am 12. November 1974

An Improved Method for the Determination of Y Chromosomes in Blood Stains

Summary: A new filter combination for fluorescence microscopy using SWP 440 interference filter for excitation and GG 455 as the barrier filter is described. In blind trials examining blood smears of 5 male persons and by examination of 3 weeks old blood stains a better Y chromosome demonstration has been obtained using this new technique in comparison with the "usual" filter combination: BG 12-530. In blind trials of up to 6 weeks old blood stains of one male and one female a reliable sex determination was made using the new technique.

Zusammenfassung: Eine neue Filterkombination mit Interferenzfilter SWP 440 als Primärfilter und GG 455 als Sekundärfilter im Fluoreszenzmikroskop zum Nachweis des Y-Chromosoms in Blutspuren wird beschrieben. Im Vergleich mit der am üblichsten angewandten Filterkombination zu diesem Zweck, BG 12 - 530, ergibt die neue Filterkombination im Blindversuch mit 5 männlichen Probanden und bei der Untersuchung von drei Wochen alten Blutspuren signifikant bessere Resultate. In vorläufig bis zu sechs Wochen alten Blutspuren auf Glas ist im Blindversuch eine sichere Geschlechtsdiagnostik mit dieser Technik erreicht worden.

Key words: Geschlechtsbestimmung, Blutspuren - Blutspuren, Geschlechtsbestimmung - Y-Chromosomen, Nachweis in Blutspuren

Seit der Mitteilung von ZECH 1969, daß der distale Anteil der langen Arme des Y-Chromosoms nach Anfärbung mit Quinakrinsenf deutlich fluoresciert, sind Methoden ausgearbeitet worden, welche die Anfärbung mit diesem und damit verwandten Stoffen zum Nachweis der Y-Chromosomen in kernhaltigen Zellen verschiedener Art ausnutzen. Die Anfärbung kann ähnlich wie die 1949 von BARR u. BERTRAM beschriebene Untersuchung auf Geschlechtschromatin in weiblichen Zellen und im Gegensatz zur gewöhnlichen zeitraubenden Chromosomenuntersuchungstechnik mit den Zellen in der Interphase ausgeführt werden. Das Y-Chromosom wird sich dann bei der Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop in einigen der Zellen als

Die Arbeit ist mit Unterstützung des Staatl. Med. Forschungsrates ausgeführt worden. Der Verfasser dankt Herrn Dipl.-Ing. W. OLSEN "Optisk Laboratorium", Akad. für techn. Wiss. (ATV), Kopenhagen, für wertvolle Hilfe.

ein stark leuchtender Punkt von ca. 0,25 my Durchmesser abheben (PEARSON *et al.* 1970).

Die Methode setzte sich bald in der rechtsmedizinischen Praxis zur Geschlechtsbestimmung eingetrockneter Blutspuren und Haare durch (PHILIPS *et al.* 1971, MÜLLER *et al.* 1971, SCHWINGER 1972, BRINKMANN *et al.* 1973).

Innerhalb der Fluoreszenztechnik ist der Typ der Primär- und Sekundärfilter von entscheidender Bedeutung für das Ergebnis, und besonders wenn man mit eingetrockneten Materialien von variierendem Alter arbeitet, wird eine optimale Technik bedeutungsvoll sein. Als Erregerfilter (Primärfilter) wurde am häufigsten BG 12 angewandt (SCHWINGER 1972, PEARSON *et al.* 1970, CONEN *et al.* 1971), und zwar im Regelfalle mit Sperrfilter (Sekundärfilter) 530 kombiniert.

In der vorliegenden Arbeit wird beschrieben, wie es sich erwiesen hat, daß eine geänderte Filterkombination die Geschlechtsbestimmung an Blutspuren auf Glas verbessert.

MATERIAL UND METHODE

Einige Blutflecke von einer männlichen und einer weiblichen Versuchsperson wurden auf Objektträger aufgetropft. Die Flecke wurden in einem geschlossenen Raum bei Zimmertemperatur gelagert. Dem Untersucher wurden im Abstand von einer Woche 8 - 10 Flecke ausgeliefert, die im Blindversuch untersucht wurden, indem weder das Geschlecht der einzelnen Spur noch die Zahl der männlichen bzw. weiblichen Spuren dem Untersucher bekannt waren. Ferner wurden acht frische Blutausstriche von Venenblut blind untersucht.

Bei der Untersuchung der einzelnen Spur wurde folgendes Verfahren benutzt: Auf die Spur wurde wie von PHILIPS *et al.* 1972 beschrieben ein Tropfen 2mM MgCL₂ aufgetropft. Mit einem stumpfen Glasinstrument wurde die Spur darauf zerrieben und mit einer Pipette auf einen Objektträger gebracht, wo sie ausgestrichen und luftgetrocknet wurde. Das hierdurch erreichte Präparat wurde für wenigstens 30 Minuten in 100%-igem Methanol fixiert und luftgetrocknet. Es wurde für 5 Minuten in 1%-igem Mepakrinchlorid gefärbt, für 3 1/2 Minuten in fließendem Wasser gespült und schließlich in Phosphatpuffer pH 5,5 getaucht, worauf ein Deckglas darauf gelegt wurde.

Angewandt wurden ein Reichert Immunopan Auflichtfluoreszenzmikroskop und eine HBO 50 Quecksilberlampe. Die Filterkombination wird unten unter Resultaten beschrieben.

In den Präparaten wurden je wenigstens 50 Zellen ausgezählt. In Übereinstimmung mit SCHWINGER 1972 erwiesen sich die mononukleären Zellen am geeignetsten zum Nachweis des Y-Chromosoms und nur solche wurden ausgezählt.

RESULTATE

Abb. 1 zeigt das Absorptionsspektrum für in Phosphatpuffer, pH 5,5, gelöstes Mepakrinchlorid. Man sieht ein Absorptionsmaximum bei ca. 415-450 nm, weshalb es richtig sein wird, in diesem Intervall zu erregen. Das meist benutzte Primärfilter, BG 12, wird bei ca. 400 nm mit Maximum erregen (OLSEN u. RYGAARD

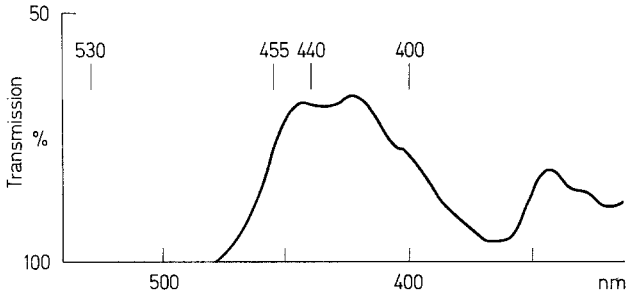


Abb. 1. Absorptionsspektrum für Mepakrinchlorid in Phosphatpuffer pH 5,5 1 mg/100 ml

1970). Es transmittiert jedoch Licht mit einer Wellenlänge bis zu 525 nm, weshalb es notwendig ist, das Sperrfilter 530 anzuwenden, das jedoch nicht nur das Erregerlicht ausschließt, sondern auch einen Teil des Fluoreszenzlichtes behindern wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Primärfilter mit Transmissionsmaximum bei 440 nm (SWP 440) benutzt. Es ist dies ein Interferenzfilter (OLSEN u. RYGAARD 1970) mit einem Transmissionsbereich, der bei ca. 450 nm jäh abgeschnitten wird, weshalb man ein Sperrfilter benutzen kann, daß die Passage des Lichtes über diese Wellenlänge gestattet, und man wird somit sozusagen all das ausgesandte Fluoreszenzlicht verwerten können. In dieser Arbeit wurde Sperrfilter GG 455 angewandt.

Abb. 2. zeigt die ermittelten Resultate. Es ist aus der Abbildung ersichtlich, daß eine sichere Geschlechtsbestimmung mit diesen 2 Personen nach 6 Wochen noch immer möglich war, da sich weder falsch positive noch negative Werte fanden. Nach 6 Wochen fand sich eine Spur männlicher Herkunft mit nur 7% positiven Zellen, aber dies war doch höher als der höchste Befund für Spuren weiblicher Herkunft.

Um die Bedeutung der Filtertechnik für das Ergebnis zu beleuchten, wurden 10 männliche, 3 Wochen alte Blutspuren vom gleichen Probanden wie oben untersucht. Präparate von diesen 10 Spuren wurden wie oben beschrieben angefertigt. 5 wurden mit der "gewöhnlichen" Filterkombination: BG 12 - 530 und 5 mit der Kombination SWP 440 - 455 ausgezählt. Diese Untersuchung kann nicht blind ausgeführt werden, da die Filterkombination unmittelbar aus der Farbe des Präparats hervorgeht; es fand sich aber eine markant grössere Anzahl Y-chromosompositiver Zellen mit der neuen Filterkombination (Tabelle 1). Der gesamte Unterschied fand sich bei einem χ^2 Test signifikant, $p < 0,01$.

Es wurden ferner frische Blutausstriche von 5 männlichen Versuchspersonen untersucht. Von den Personen wurden je 2 Ausstriche untersucht, und zwar so,

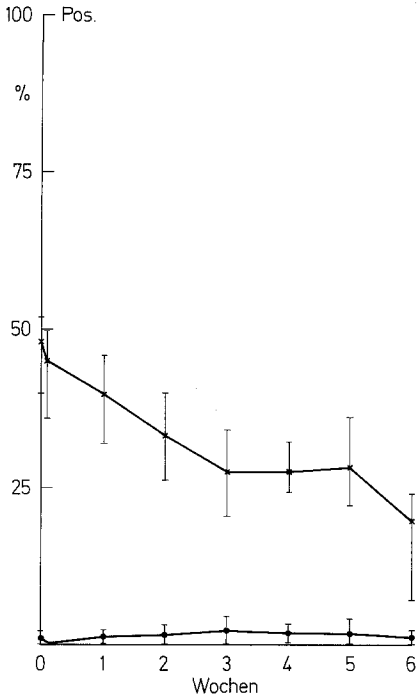


Abb. 2. Die prozentuale Anzahl Y-fluoreszenzpositiver Zellen als Funktion des Alters von Blutspuren auf Glas. Der Durchschnitt, der größte und der kleinste Wert sind eingezeichnet. x----x: Spuren männlicher Herkunft. o----o Spuren weiblicher Herkunft

Tabelle 1.

Anzahl Y-pos. Zellen von 5x50 mit SWP440 - GG455	13 + 10 + 11 + 16 + 13	63
Anzahl Y-pos. Zellen von 5x50 mit BG12 - 530	9 + 9 + 8 + 4 + 6	36

Gegenüberstellung der zwei Filterkombinationen zur Untersuchung der Y-Chromosomfluoreszenz in 3 Wochen alten Blutspuren auf Glas

daß die Zahl der Y-chromosompositiven Zellen mit beiden Filtertechniken untersucht wurden. Die Identität der einzelnen Präparate war dem Untersucher nicht bekannt und er wußte also nicht, welche zusammengehörten. In jedem Präparat wurden 50 Zellen ausgezählt. Tabelle 2 zeigt die erzielten Resultate. Der Unterschied ist bei einem t-Test signifikant befunden, $t = 5,4$, $p < 0,01$. Es gab eine deutliche Variation der ausgezählten Zellen von Person zu Person und

Tabelle 2.

Person Nr.	1	2	3	4	5	Insgesamt
Anzahl Y-pos. Zellen von 50 mit SWP440 - GG455	39	37	19	34	42	171
Anzahl Y-pos. Zellen von 50 mit BG12 - 530	36	35	13	29	36	149

Blindversuch mit 5 männlichen Probanden. Die Blutaussstriche von Venenblut wurden für jede Person mit den beiden beschriebenen Filterkombinationen untersucht

es sei noch bemerkt, daß die männliche Versuchsperson aus der Abb. 2 die Person mit der niedrigsten Zahl ist.

DISKUSSION

Die in der Abb. 2 gezeichnete Kurve zeigt ein geringeres Absinken als in früheren Arbeiten beschrieben. SCHWINGER 1972 fand schon nach 34 Tagen die erste männliche Spur, in welcher kein Y-Chromosom nachgewiesen werden konnte. Diese Arbeit läßt sich jedoch nicht direkt mit der vorliegenden vergleichen, da die Blutspuren auf dem Objektträger ausgestrichen sind, auf dem sie aufgetropft sind, während sie in der vorliegenden Arbeit auf einen anderen Objektträger gebracht und ausgestrichen wurden, wodurch die Zahl der Y-chromosompositiven Zellen (nach PHILLIPS *et al.* 1971) abnimmt. In der Forensischen Praxis wird es vermutlich nur ausnahmsweise vorkommen, daß Blutspuren im Mikroskop behandelt und untersucht werden können, ohne auf einen Objektträger gebracht zu werden.

LITERATUR

- BARR, M.L., BERTRAM, E.G.: A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature (Lond.)* 163, 676-677 (1949)
- BRINKMANN, B., JOBST, U.: Bestimmung des Kerngeschlechtes an biologischen Spuren. *Z. Rechtsmedizin* 73, 1-6 (1973)
- CONEN, P.E., LEWIN, P.K., VAKIL, D.V.: Rapid Y chromosome identification in human blood smears. *Canad. med. Ass. J.* 104, 925-926 (1971)
- MÜLLER, H., BÜHLER, M., VOEGELIN, M.G., STALDER, G.R.: Eine neue Methode der Geschlechtsbestimmung in Leukozyten aus eingetrockneten Blutflecken. *Schweiz. med. Wschr.* 101, 1171-1174 (1971)
- OLSEN, W., RYGAARD, J.: Immunfluorescenzmikroskopi med interferensfiltre. *Fysisk-teknisk grundlag. vom Verf. herausgegeben. Kopenhagen* (1970)
- PEARSON, P.L., BOBROW, M., VOSA, C.G.: Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. *Nature (Lond.)* 226, 78-80 (1970)

- PHILLIPS, A.P., GATEN, E.: Y chromosome fluorescence in bloodstains. *Lancet* 2, 371-372 (1971)
- PHILLIPS, A.P., WEBSTER, D.F.: Improved Y chromosome fluorescence in the presence of magnesium ions. *J. forensic. Sci.* 12, 361-362 (1972)
- SCHWINGER, E.: Geschlechtsbestimmung aus Blutspuren. *Z. Rechtsmedizin* 70, 157-162 (1972)
- ZECH, L.: Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. *Exp. Cell Res.* 58, 463 (1969)

Dr. J.L. THOMSEN
Inst. für gerichtl. Med.
der Universität
Juliane Maries vej 16,
DK-2100 Kopenhagen Ö.