

Anwendung der modifizierten Mischzellagglutination (mixed cell agglutination reaction, MCAR nach Davidsohn) in der forensischen Serologie; MCAR auf dem Klebebandstreifen

IKUO ISHIYAMA und TAKEO OKADA
Teikyo University, School of Medicine, Tokyo (Japan)

eingegangen am 7. Januar 1975

Application of the Modified Mixed Cell Agglutination Reaction (MCAR According to Davidsohn) in Forensic Serology; MCAR on Adhesive Tape

Summary: In view of serological sensitivity, specificity and simple procedure of reaction pattern the modified mixed cell agglutination reaction (Davidsohn's MCAR) proved to be a very useful test for typing ABO isoantigens in forensic medicine. Its sensitivity surpasses in some cases, where very small amounts of isoantigens have to be detected, that of the absorption-elution reaction several thousand times. The capacity to demonstrate the localization of antigens seems to be more reliable than the original test method. The modified Davidsohn's MCAR (MCAR on adhesive tape) is especially recommended when isoantigens which are localized on the surface of microscopic objects including fingerprints, dust, hairs, and histological sections, have to be determined. The usefulness of our modification in forensic medicine and the conditions which are essential for the application, are discussed.

Zusammenfassung: Die ABO-Blutgruppenbestimmung mittels der modifizierten Mischzellagglutinationsreaktion (MCAR nach Davidsohn) erfüllt, was Empfindlichkeit, Spezifität, Einfachheit des Verfahrens etc. angeht, alle Bedingungen für ihre Anwendung in der forensischen Praxis. Ihre Empfindlichkeit bei antigenarmem Spurenmaterial liegt einige tausendmal höher im Vergleich zur Absorption-Elutionsmethode. Die Lokalisation der Isoantigene erscheint überzeugender als bei der Originalmethode. Die beschriebene Modifikation der MCAR ermöglicht die Blutgruppentypisierung an verschiedenem mikroskopischen Spurenmaterial, wie Fingerabdrücken, Kleiderschmutz, Haaren und histologischen Schnitten, was bei bisherigen serologischen Untersuchungen nicht gelang. Die Brauchbarkeit der Methode in der forensischen Praxis und die Bedingungen, die für eine sichere Bestimmung nötig sind, werden besprochen.

Key words: Spurenkunde, Mischzellagglutination - Mischzellagglutinationsreaktion (MCAR) - Absorption-Elution Reaktion (AER)

EINLEITUNG

Bei der ABO-Typisierung an Spurenmaterial haben sich zwei Methoden, die Mischzellagglutinationsreaktion (MCAR; COOMBS *et al.*, 1961 und 1963) und die Absorp-

tion-Elutionsreaktion (AER; KIND, 1960, NICKOLLS *et al.*, 1962), die schon früher in die forensische Serologie eingeführt worden sind, bewährt. Ihre außerordentlich guten Ergebnisse im Vergleich zu denen der früheren klassischen Absorptionsmethode, haben dazu geführt, daß sie in vielen forensischen Laboratorien gebräuchlich sind. Diese, soweit sich absehen läßt, allgemein anwendbaren Methoden zur Bestimmung von Blutgruppen haben folgende Schwierigkeiten, die ihre praktische Verwendbarkeit beträchtlich einschränken kann.

a) Theoretisch ist MCAR viel empfindlicher als AER. Bei der Ausführung treten jedoch manchmal Schwierigkeiten auf, spezifische und unspezifische Reaktionen zu unterscheiden. Die Zentrifugation von sensibilisiertem Untersuchungssubstrat mit Indikatorzellen steigert die Empfindlichkeit der Reaktion erheblich, dieses Verfahren verstärkt aber auch die unspezifische Reaktion. Zu berücksichtigen ist die Tatsache, daß Mischzellagglutinationen, wenn sie sich an der Oberfläche des Substrats befinden, durch leichtes Schütteln oder Bewegen (z.B. bei der Herausnahme von Untersuchungsmaterial aus dem Reagenzglas) abgelöst oder abgerissen werden können.

b) Bei AER gibt es keine große Schwierigkeit was die Auswertung der Reaktion angeht. Aber ihre Empfindlichkeit ist viel niedriger als bei MCAR, da die Menge des eluierten Agglutinins so groß sein muß, daß sie die Agglutination der Indikatorzellen deutlich anzeigt. Außerdem ist als ein Nachteil zu bezeichnen, daß bei AER keine Möglichkeit besteht, die topographische Lokalisation der Antigene darzustellen.

Trotzdem kann man beim derzeitigen Stand der forensischen Serologie in vielen Fällen mit der AER auskommen, die sichere Ergebnisse bringt. Aber in einigen Fällen benötigt man die Mikroreaktion, die auf Grund zellulärer Befunde - z.B. in Verbindung mit der zellulären Diagnostik des Geschlechts oder mit den histochemischen Veränderungen von Zellen- die serologische Eigenschaft erfaßt. Hierfür soll die MCAR die wichtigste Rolle spielen.

Wir haben festgestellt, daß die modifizierte MCAR nach Davidsohn (diese Methode eignet sich für die Darstellung von Isoantigenen in Paraffin-Präparaten; TOENDER *et al.*, 1964 und DAVIDSOHN *et al.*, 1966, 1968, 1972) verschiedene Bedingungen in der forensischen Serologie erfüllt. Die Modifikation, deren Prinzip, nicht auf der Elution, sondern auf der spontanen Sedimentierung von nicht-reagierenden Indikatorzellen beruht, stört Mischagglutinationsgebilde nicht, so daß die mikroskopische Beobachtung und die Beurteilung der Befunde erleichtert werden. Für die praktische Spurenkunde haben wir eine weitere Modifikation erprobt, deren Ergebnisse und Brauchbarkeit in dieser Arbeit beschrieben werden.

MATERIAL UND METHODE

I. Untersuchungsmaterial

- a) Biologische Spurenflecke: Bei der Mischzellagglutination wurde als Trägermaterial für Speichel und Blut weißes Leinen oder Watte verwendet. 1 x 1 cm große Stücke von Leinengewebe oder etwas ausgezupfter Watte wurden mit Speichel oder Blut verschiedener Verdünnungen (1:1 bis 1:100,000) getränkt (5 Min) und anschließend getrocknet.
- b) Zigarettenstummel (Filteranteile) wurden gesammelt und serologisch geprüft.
- c) Fingerabdrücke von männlichen und weiblichen Personen im Alter von 20 - 27 Jahren (insgesamt 140 Fälle) wurden direkt auf Klebebandstreifen, die sich auf dem Objektträger ankleben lassen, abgenommen.
- d) Hemd-, Kittel- und Kleiderschmutz wurden direkt aus Schmutzstellen (Kragen und Ärmel) mittels Klebeband gesammelt.
- e) Haare wurden von männlichen und weiblichen Personen im Alter von 21 - 27 Jahren (insgesamt 96 Fälle) gesammelt.
- f) Paraffin-Präparate wurden aus Sektionsmaterial ausgewählt, das vom gerichtsmmedizinischen Institut der Universität Tokyo stammte. Einige neue Präparate wurden aus Organen hergestellt, die schon fast 10 Jahre in Formalinlösung asserviert waren. Sie wurden in einer Dicke von 5 μ geschnitten und in der Xylol-Alkohol-Reihe entparaffiniert. Danach wurden sie mit destilliertem Wasser und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und serologisch untersucht.

II. Agglutinine

Immun-Anti-A und Anti-B Agglutinine sind Erzeugnisse von Schering Co. Ltd., Kenilworth, U.S.A., Dade Co. Ltd., Miami, U.S.A., Nihonseiyaku Co. Ltd., Tokyo, Japan und Tokyo Standard Serums Co. Ltd., Tokyo, Japan. Ihre Agglutininaktivität liegt im Bereich von (1:512) bis (1:1024).

Zwei Sorten von Anti-H Agglutininen wurden benutzt. Ulex Anti-H ist ein Extrakt aus Ulex-Samen (Ulex europaeus von Sanko Junyaku Co. Ltd., Tokyo). Es enthält Agglutininaktivität gegen intakte O- (1:64) und gegen Pronase-behandelte O-Zellen (1:6400). Aal Anti-H ist Serum vom Aal, das direkt aus großen Venen entnommen wurde. Agglutinititer ist 1:128 - 1:256 gegen intakte O- und 1:10,000 gegen Pronase behandelte O-Zellen.

III. Indikatorzellen

Frische A, B und O Zellen wurden von den Kliniken der hiesigen Universität (Leiter des Pathoklinischen Laboratorium: Prof. Dr. YASUDA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

IV. Verfahren der modifizierten MCAR-Methode nach Davidsohn (Abb. 1)

1. Doppelseitiger Klebebandstreifen (scotch double stick tape Cot. No. W-200, 3M Co. Ltd., Saint Paul, U.S.A.) wird auf dem Objektträger angeklebt (Abb. 1a).
2. Einseitiger Klebebandstreifen (Cellotape, Nichiban Co., Ltd., Tokyo, Japan) wird darauf so geklebt, daß seine Klebeseite freiliegt. Da der doppelseitige Streifen, der im Wasser lange Zeit stehen bleibt, sich leicht trübt und seine Klebekraft beträchtlich nachläßt, ist er mit dem Cellotape-Streifen zu bedecken (Abb. 1b).
3. Kleine Stücke vom Untersuchungsmaterial werden darauf fest angeklebt (Abb. 1c).
4. Es wird mit Agglutinin gut benetzt und bei Zimmertemperatur etwa 15 Min. inkubiert. Bei einigen Experimenten wird die Inkubation bis zu 30 Min. verlängert (Abb. 1c).

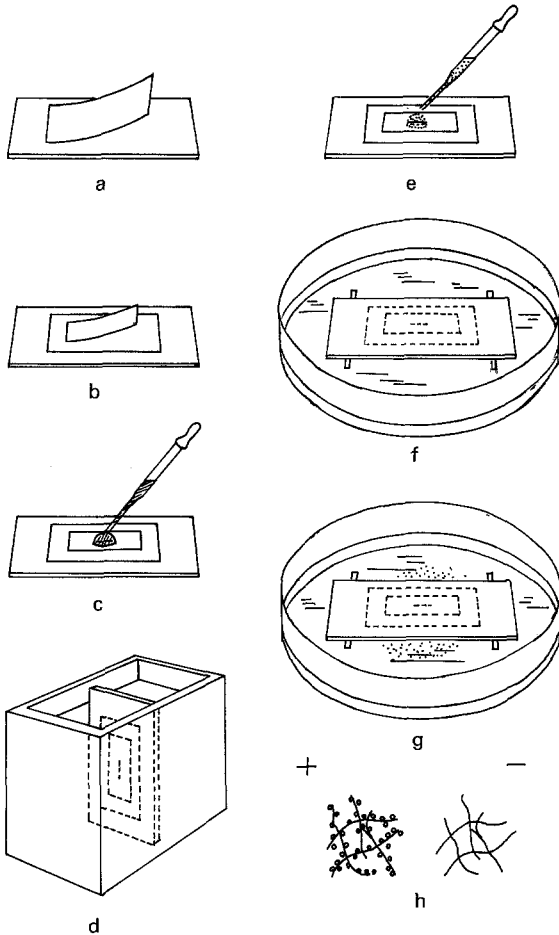


Abb. 1. Schematische Darstellung der modifizierten MCAR auf dem Klebebandfilm (ISHIYAMA und OKADA) s. auch Text

5. Entfernung des Agglutinins durch 3-5maliges Waschen mit jeweils 10 ml physiologischer Kochsalzlösung. Nachfolgendes Stehenlassen in Kochsalzlösung für etwa 20 Min. (Abb. 1d).

6. Die Waschflüssigkeit wird mit Filterpapier abgesaugt. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß das Untersuchungsmaterial nicht beschädigt wird. Nach dem Absaugen werden 2-3 Tropfen einer Indikatorzelllösung hinzugegeben. Herstellung der Indikatorzelllösung: Die Zellen werden 3 mal mit Kochsalzlösung gewaschen und mit der 10% Glukose-haltigen Kochsalzlösung in einer Konzentration von 5% aufgeschwemmt.

Die Inkubation dauert etwa 10-15 Min. bei Zimmertemperatur (Abb. 1e).

7. Der Objektträger wird umgekehrt und in Kochsalzlösung gebracht, daß nur die Klebeseite von Wasser bedeckt ist (Abb. 1f).

8. Der Objektträger bleibt in diesem Zustand etwa 15 Min. stehen, Inzwischen fallen freie (nicht reagierende) Indikatorzellen ab. (Abb. 1g).

9. Mikroskopische Beurteilung (Abb. 1h).

Negativer Befund: Keine Agglutination; meistens fallen alle Zellen ab; öfters findet man zerstreut einschichtige Anhaftung von Zellen, was leicht als unspezifische Reaktion diagnostiziert wird.

Positiver Befund: a. Schichtige Agglutination: Es befinden sich an der Oberfläche des Spurenmaterials Agglutinationsgebilde, bei denen sich die Indikatorzellen palisadenartig, dicht nebeneinander anordnen; mitunter findet man eine mehrschichtige Anordnung der Zellen.

b. Membranöse Agglutination (Segregation): Die Zellen ordnen sich nicht in der Schicht, sondern in membranöser Fläche an. Diese wird regelmäßig an Verdauungsepithelien, Pankreasparenchymen etc., wo die Isoantigene reichlich vorhanden sind, beobachtet.

c. Weintraubenartige Agglutination: An Kapillaren und feinfaserigem Untersuchungsmaterial findet man die Agglutinate der Zellen, die an der Anhaftstelle weintraubenartig hängen bleiben. Bei leichtem Aufschütteln schwingen sie mit, so daß ihr Vorhandensein deutlich erfaßt werden kann.

d. Rosettenbildung: Typische Mischzellagglutinationsgebilde; sie werden in vielen Fällen an der Oberfläche kleiner Stückchen, wie Mikroschmutz und Epidermisschuppen, beobachtet.

ERGEBNISSE

I. Blutspuren

1. MCAR mit Blutflecken: Stofffasern, die mit Blut benetzt wurden, waren völlig ausgetrocknet. Ein kleines Stück 1 x 1 mm oder noch kleiner wird abgeschnitten und mit einer Nadelspitze zerzupft. Die zerkleinerten Stückchen werden am Cellotape-Streifen fest angeklebt. Danach wird 5%ige Formalinlösung zugegossen (Fixierung). Nach der Fixierung (30 bis 60 Sekunden) wird das Formalin ausgewaschen und serologisch geprüft. Das Ergebnis zeigt Abb. 2.

Es ergeben sich beträchtliche Mischzellagglutinationsbilder im Fall der Übereinstimmung zwischen Blutgruppe vom Spurmaterial, sensibilisierendem Agglutinin und Indikatorzellen. Positive MCAR Reaktion ist bis zur Verdünnung von 1:500 nachweisbar.

2. MCAR an Abdruckmaterial: Blutflecke werden ohne Abschneiden direkt mit Formalinlösung fixiert. Nach Fixation werden sie mit Kochsalzlösung ausgewaschen und getrocknet. Statt Formalin kann Methanol benutzt werden. Nach Abtrocknung wird das Klebeband leicht darauf gedrückt. Danach wird die MCAR auf dem Klebebandstreifen ausgeführt.

II. Speichelflecke

1. MCAR an benetzten Fasern: Wie bei Blutflecken können die Blutgruppen der Speichelflecken ohne Schwierigkeit festgestellt werden. Dabei können die Flecke von Ausscheidern und Nicht-Ausscheidern nicht unterschieden werden. Die Verdünnungsversuche der Speichel von beiden Sekretortypen (Hemmungsgrad des Ausscheiders von A-Gruppe 1:128 gegen Anti-A und derselbe vom Nichtausscheider 1:1) werden getestet. Sie zeigen gleichfalls deutlich MCAR bis zur Verdünnung

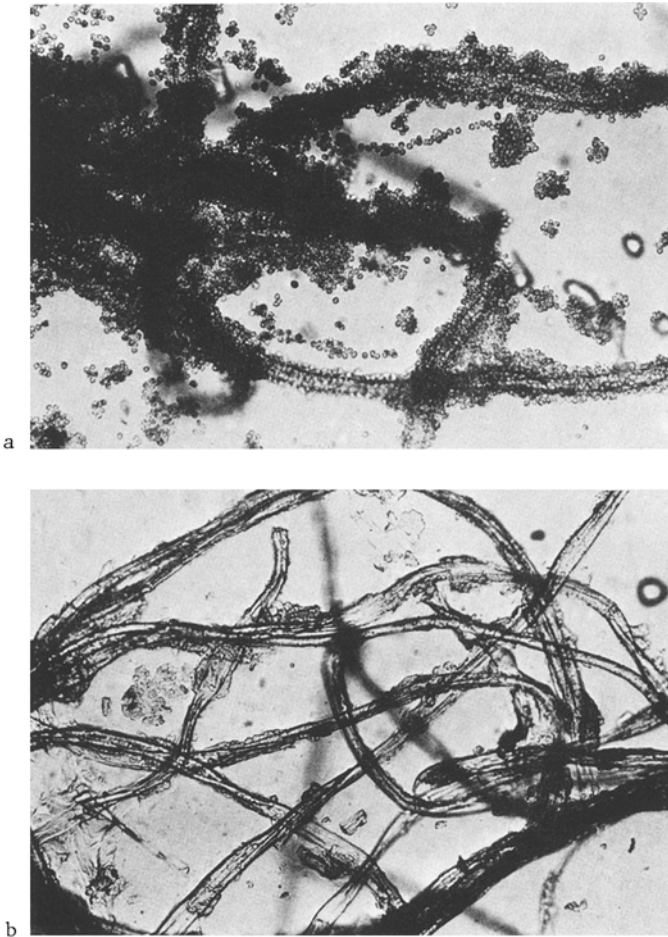


Abb. 2. Blutflecke auf der Stofffaser (Blutgruppe A)

Fixierung: 10%ige Formalinlösung

a. Positive MCAR (Vergrößerung 1:100) Sensibilisierung mit Anti-A, danach Zusatz von A-Indikatorzellen. Deutliche schichtige und weintraubenartige Agglutination

b. Negative MCAR (Vergrößerung 1:100) Sensibilisierung mit Anti-B, danach Zusatz von B-Indikatorzellen. Völlige Ablösung der nicht reagierenden Indikatorzellen

von (1:10 000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß hier kein quantitativer Unterschied zwischen den beiden Sekretortypen vorliegt, was bei den Absorptions- und Absättigungsversuchen immer festgestellt werden kann.

2. MCAR an Zigarettenstummel: Das Filterstück des Zigarettenstummel wird leicht über die Oberfläche des Klebebandstreifens gerieben. Dabei sind reichlich

Papierfasern anzukleben. Die Blutgruppentypisierung kann leicht daraus ermittelt werden.

III. Hemd-, Kittel- und Kleiderschmutz (Schmutz an Kragen und Ärmel)

Die Stellen, wo der Schmutz (meistens an Kragen und Ärmel) anhaftet, werden leicht auf das Klebeband gedrückt. Nach der mikroskopischen Kontrolle, ob Schmutzreste ankleben, wird das MCAR Verfahren durchgeführt. Die Ärmel und Kragen vom Hemd, etwa einen halben Tag getragen, können in vielen Fällen mit reichlichem Schmutz kontaminiert sein, die Blutgruppenbestimmung gelingt fast immer.

IV. Fingerabdrücke

Fingerbeeren werden direkt auf die Oberfläche des Klebebandstreifens gedrückt. Sie werden direkt mittels MCAR getestet.

Wie Abb. 3 zeigt, kann ein positiver MCAR Befund entlang den Papillarlinien nachgewiesen werden; außerdem findet man mikroskopisch typische Rosettenbildung rings um abgestossene Epithelschuppen, die sich zerstreut an Papillarlinien und Furchen befinden.

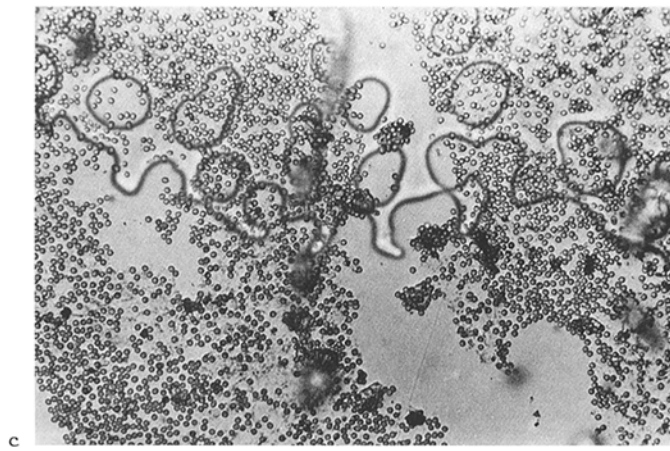
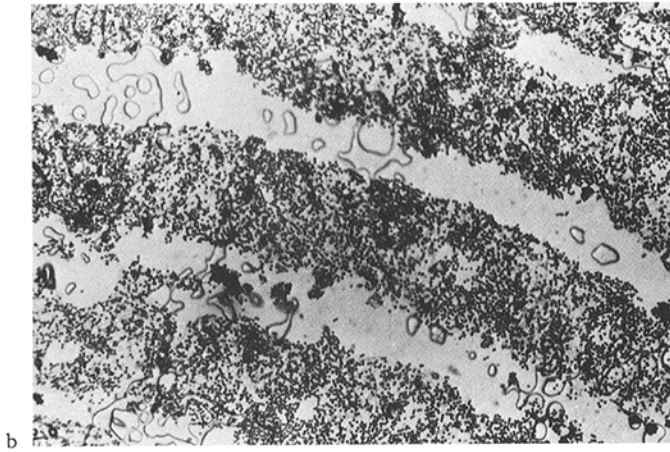
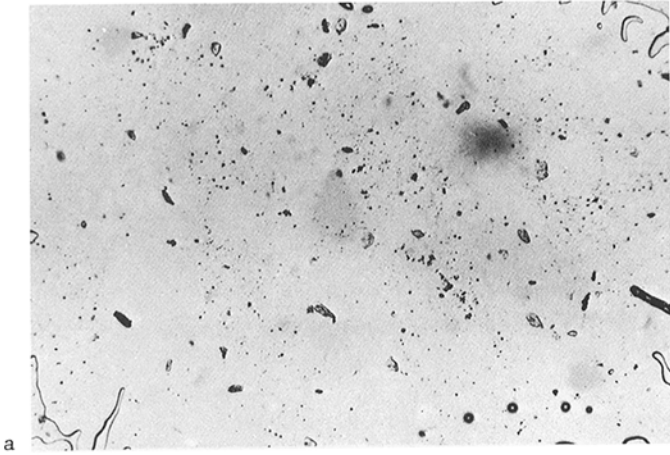
Ausscheider und Nichtausscheider zeigen gleichfalls positiven Befund. Positive MCAR-bilder entlang der Papillarlinie lassen sich vermutlich durch das Vorhandensein von ultramikrostrukturellen Schuppen und Schweißkonglomeraten an der Oberfläche der Fingerbeeren darstellen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit Fingerabdrücken von 140 männlichen und weiblichen Personen (20-27 Jahren) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

In über 92 % der Fälle stimmt die Blutgruppe und der MCAR-Befund völlig überein. Bei diskordanten Fällen haben wir nach der Möglichkeit einer Kontamination gefragt und noch einmal mit sauberen Fingerabdrücken geprüft. Wichtige Kontaminationsquellen sind Ergreifen von Handgriffen in der Straßenbahn etc. und Händedruck mit feuchten Händen. Nach Waschen der Hände mit Seife bekommen wir immer richtige Resultate, aber in schwacher Reaktion, bei der die mikroskopische Untersuchung unentbehrlich ist. Empfehlenswert ist bei Routineuntersuchungen, daß die Hände vor dem Test gut gewaschen, mit Papier abgewischt und etwas erwärmt werden, damit sie etwas feucht werden. Die Fingerabdrücke, die nach diesem Verfahren erhalten werden, geben immer richtige Ergebnisse.

V. Blutgruppenbestimmung aus Hautschuppen

Nach der Feststellung von Kontaminations-Möglichkeiten haben wir uns damit beschäftigt, kontaminationsfreie Stellen herauszufinden. Die Oberfläche von Hautpartien, die mit Kleidung bedeckt sind, wird direkt mit Klebebandstreifen abgedrückt und serologisch getestet. Dabei erhielten wir stets richtige Reak-



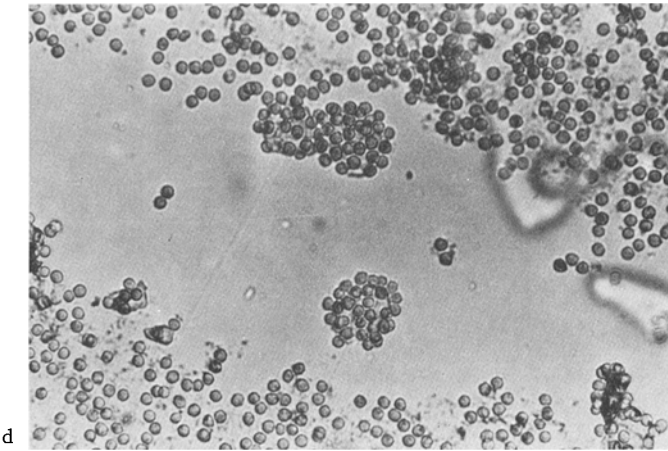


Abb. 3. Blutgruppenbestimmung von Fingerabdrücken (Blutgruppe B)
Keine Fixierung

Abdruck der Fingerbeere direkt auf dem Streifen.

- a. Negative MCAR (Vergrößerung 1:40) Wie in Abb. 2a. Völlige Ablösung von nicht reagierenden Indikatorzellen
- b. Positive MCAR (Vergrößerung 1:40) wie in Abb. 2b. Membranöse Anordnung der Indikatorzellen entlang der Papillarlinie und zerstreute Rosettenbildung
- c. Positive MCAR an der Papillarlinie (Vergrößerung 1:100)
- d. Positive MCAR, besonders typische Rosettenbildung in der Papillarfurche (Vergrößerung 1:200)

tionen. Manchmal können auch Kußspuren richtigen Aufschluß bei serologischer Untersuchung geben.

VI. Haare

Haare von 96 Studenten der hiesigen Universität wurden gesammelt und auf ihre Blutgruppen untersucht. Nach der Vorschrift von YADA *et al.* (1966) und AKAISHI *et al.* (1965) werden sie in Längen von 2 mm oder noch kürzer zerschnitten und mit dem Hammer zersplittert. Dann werden sie auf dem Klebebandstreifen aufgebracht. Bei der Untersuchung mit unserer Standard-MCAR werden keine sicheren Befunde erzielt. Nach Erproben von verschiedenen Bedingungen läßt sich folgendes Verfahren als optimal ansehen; Die Sensibilisierung muß etwa bis 30 Min. verlängert werden und die Konzentration von Indikatorzellen ist recht hoch anzusetzen (etwa 20 bis 30 %). Es ist auch empfehlenswert, das ganze Verfahren bei niedriger Temperatur (unter 20°C) durchzuführen.

Aus dem Befund von Fingerabdrücken haben wir angenommen, daß Haare oberflächlich mit blutgruppenaktiven Schuppen und Sekretkonglomeraten bedeckt sind. Unter dieser Voraussetzung wurde die serologische Beschaffenheit der Oberfläche

Tabelle 1. Blutgruppentypisierung von Fingerabdrücken (140 Fälle von Personen männlichen und weiblichen Geschlechts im Alter von 20-27 Jahren)

Blutgruppe der Untersuchten	1. Stufe: Mit Anti-A sensibilisiert, 2. Stufe: A-Indikatorzellen zugegeben				1. Stufe: Mit Anti-B sensibilisiert, 2. Stufe: B-Indikatorzellen zugegeben			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-
A (50 Fälle)	50	0	0	0	0	0	2	48
B (30 Fälle)	0	3*	0	27	30	0	0	0
AB (18 Fälle)	0	18	0	0	0	18	0	0
O (42 Fälle)	0	0	5*	37	0	4*	0	38

- +++ : Starke Segregation der Indikatorzellen entlang der Papillarlinie. Damit wird die Papillarlinie makroskopisch deutlich sichtbar, Völlige Darstellung von Papillarmuster durch Indikatorzellen.
- ++ : Mittelgradige Segregation. Die Zellen lagern sich nicht so dicht ab, die Papillarlinie kann jedoch deutlich beurteilt werden.
- + : Keine Segregation oder schwache Segregation der Zellen entlang der Papillarlinie. Papillarlinie, sowie Papillarmuster kaum sichtbar. Mikroskopisch treten typische Rosettenbildungen auf.
- * : Nach Waschen der Hände negativer Befund, Gleichzeitige Untersuchung von Hautschuppen aus der inneren Seite des Vorderarmes zeigt auch negativen Befund, Kontaminations-verdächtig.

von Haare überprüft. Man bringt Haare, nachdem sie mit absolutem Alkohol gewaschen worden sind, an der Klebeseite auf und zieht diese sofort wieder ab. Die blutgruppenaktive Beschaffenheit der Spuren auf dem abgenommenen Klebeband wird durch MCAR getestet. Es tritt ein positiver Befund in der Spurenfurche auf und die Indikatorzellen ordnen sich manchmal entlang dem Kutikularsaum an. Die Ergebnisse der Untersuchung mit Haaren von 96 Personen zeigt Tabelle II. Bei über 80% wurde die richtige Blutgruppe aus der Oberfläche der Haare festgestellt.

Um die Reaktionsweise weiter aufzuhellen, wurden Haare mit Haarwaschmittel gewaschen und noch einmal serologisch nach der Abdruckmethode geprüft. Danach ist stets eine schwächere oder in vielen Fällen völlig negative Reaktion zu beobachten. Daraus läßt sich schließen, daß sich MCAR an der Haaroberfläche nicht durch haareigene, sondern durch anhaftende Blutgruppensubstanzen (z.B. abgestossene Haarschorfe, Sekretkonglomerat etc.) durchführen läßt. Wenn man gewaschene Haare unvorsichtig mit einem unsauberen Kamm behandelt, werden sie sofort mit blutgruppenaktiven Substanzen des Kammes kontaminiert.

Tabelle 2. Blutgruppentypisierung von Spurenfurchen der Haare auf dem Klebebandstreifen (96 Fälle)

Blutgruppe der Untersuchten	1. Stufe; Mit Anti-A sensibilisiert. 2. Stufe; A-Zellen zugegeben		1. Stufe; Mit Anti-B sensibilisiert. 2. Stufe; B-Zellen zugegeben	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
A (38 Fälle)	34	4	2	36
B (18 Fälle)	1	17	14	4
AB (12 Fälle)	9	3	8	4
O (28 Fälle)	3	25	2	28

VII Histologische Präparate

Nach der Vorschrift von DAVIDSOHN haben wir die Blutgruppentypisierung an Paraffin-Präparaten durchgeführt; dabei wurde die AER gleichzeitig geprüft, um die Empfindlichkeit der beiden Methoden zu vergleichen.

Leber, Milz, Lunge, Niere, Muskel, Pankreas, Speicheldrüse, Zunge, die Blutgruppensubstanzen in eigenen Zellen enthalten oder bei denen reichliche Kapillaren vorhanden sind, zeigen immer starke positive Reaktion an. Im Vergleich mit unsrer bisherigen Erfahrung, daß AER eine Größe von 0.4 x 0.4 cm bei einer Dicke von 5 μ bei der Untersuchung von histologischen Präparaten benötigt, kann bei Größen von unter 1/1000 die Blutgruppenbestimmung durch MCAR durchgeführt werden (ISHIYAMA und ITAKURA, 1970).

Außerdem wird die Blutgruppenbestimmung in Geweben, wie Gehirn, Fettgewebe und Knorpel, die mit geringerer Menge von blutgruppenaktiven Substanzen beladen sind und die Schwierigkeiten bei Blutgruppenbestimmung mit AER bereiten (ISHIYAMA und ITAKURA, 1970; SLAVIK und MELUZIN, 1972), durch MCAR, besonders durch das Vorhandensein von Agglutinationsgebilden an der Kapillarwand, ermöglicht. Färbungen wie Haematoxylin-Eosin, van Gieson, Methylenblau, Azan, Elastika etc., die keine Inaktivierung von Blutgruppeneigenschaften bewirken, stören die Reaktion nicht. Dagegen fällt, wie erwartet, die MCAR Reaktion bei PAS, Silberimprägnierung, Entkalkung durch starke Säuren, die die chemische Struktur der Blutgruppensubstanzen, besonders nicht-reduzierende, terminale Zuckerreste, schädigen, negativ aus oder wird zumindest beträchtlich reduziert.

VIII. Beeinflussung der angewandten Seren und Indikatorzellen bei MCAR

Am Anfang unserer Untersuchung traten mitunter Schwierigkeiten, besonders bei der Bewertung der Ergebnisse, auf; unspezifische Anhaftung der Indikatorzellen und schwach positive Reaktionen waren Fehlerquellen. Bezüglich der unspezi-

fischen Reaktionen können durch Verwendung von frischen Zellen bessere Erfolge erwartet werden. Die Zellen, die innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme bei 4°C aufbewahrt wurden, sind als optimale Indikatorzellen anzusprechen. Wenn sie jedoch länger im Kühlschrank aufbewahrt werden, zeigen sie in vielen Fällen unspezifische Anhaftungen an der Oberfläche des Klebebandstreifens und Objektträgers. Diese Erscheinung ist mit der Zugabe von inaktiviertem Kaninchenserum oder 10% Glukosehaltiger Kochsalzlösung meistens zu eliminieren. Die MCAR Reaktion kann auch durch Verwendung von frischen Zellen erheblich verstärkt werden. Viele Serologen, die sich mit AER und MCAR beschäftigen, glauben, daß nur einige bestimmte Seren, nicht alle, richtige positive MCAR oder Elution bewirken und daß diese Reagenzien nur für MCAR und AER verwendet werden sollten. Daher haben wir auch die Möglichkeit der Beeinflussung durch die verwendeten Seren getestet. Vier Arten von Anti-A- und Anti-B-Seren, von denen drei Human- und eines Kaninchenserum waren und deren Agglutinationstiter bei 1:512 - 1:1024 lagen, ergaben verschieden starke Reaktionen. Um die optimale Bedingung für MCAR zu erfassen, haben wir die Beeinflussung der Agglutinabilität der Indikatorzellen für die Ergebnisse der MCAR geprüft. Nach unseren Untersuchungen läßt die Kombination von Serum und Zellen, die innerhalb von 15 Sekunden völlige Agglutination bewirken, immer ausgezeichnete Erfolge erwarten. Die Konzentration der Indikatorzellen beeinflußt die Reaktionsstärke erheblich. Nach den Vorschriften verschiedener Autoren benutzt man verdünnte Zellaufschwemmungen (0.1 - 0.5%) zum Nachweis der MCAR. Außerdem wird leicht zentrifugiert, um das Zusammentreffen von Antikörper und Indikatorzellen zu fördern. Da Zentrifugation oder Schütteln bei unserer Methode nicht möglich sind, müssen Gelegenheiten für eine spezifische Anhaftung der Indikatorzellen an den sensibilisierenden Loci, wie dies während der Sedimentierung der Indikatorzellen geschieht, geboten werden. Die Sedimentierung dauert bei unserer Methode 15 Minuten; Verlängerung der Inkubationsperiode darüber hinaus, führt mitunter zu unspezifischen Anhaftungen, so daß freie Indikatorzellen schlecht abzulösen sind. Unter diesen Bedingungen braucht man nur -besonders bei Substrat von geringer Sensibilisierung, also bei antigenarmen Untersuchungsmaterialien- konzentrierte Lösungen zu benutzen, um die Häufigkeit der Reaktion zwischen Indikatorzellen und sensibilisierenden Loci zu fördern.

IX. Problem des Anti-H

Bei der Spurenuntersuchung beklagt man oft die Schwierigkeit des Nachweises der H-Aktivität. Wenn die Untersuchung der Artspezifität, der A- und B-Aktivität noch sichere Resultate zeigt, sind weitere Untersuchungen überflüssig. Trotzdem wird in vielen Fällen die Untersuchung der H-Eigenschaft verlangt.

Als Anti-H wurden Ulex-Extrakt und Aalserum angewandt. Wegen einer leichten Hemmung der Agglutininaktivität durch konzentrierte Glukose, wurde in diesem Experiment physiologische Kochsälzlösung verwendet. Obwohl Ulex und Aal Anti-H hohe Titer der Agglutinationsfähigkeit (besonders beim Aal bis zu 1:256) ergeben können, reagieren sie mit intakten O-Zellen sehr langsam (etwa 5-10 Min. bis zur Entstehung völliger Agglutination); sie reagieren jedoch schneller mit Pronase-behandelten Zellen (innerhalb 15 Sekunden).

Wie erwartet, reagieren intakte Zellen nicht mit den sensibilisierenden Agglutininen; typische MCAR wird beobachtet, wenn Pronase-behandelte Zellen benutzt werden (Beeinflussung der Agglutinabilität).

MCAR durch Ulex- und Aal-Anti-H kann durch Zusatz von L-Fukose (1 %) völlig gehemmt werden, wodurch der Agglutinationsbefund als serologisch-spezifisch beurteilt werden kann.

DISKUSSION

Was die Empfindlichkeit der modifizierten MCAR-Methode angeht, so ist folgender Vergleich möglich: Bei der Isoantigenbestimmung in Paraffin-Präparaten, die ohne Beeinträchtigung des morphologischen Befundes zu ermitteln ist, benötigt man eine Größe von 0.4 x 0.4 cm bei einer Dicke von 5 μ (bei Leber, Niere, Pankreas etc., die Blutgruppensubstanzen reichlich enthalten) im Fall der AER, während bei MCAR schon einige Kapillaren genügen (ISHIYAMA und ITAKURA, 1970). Damit ist MCAR etwa mehrere tausendmal empfindlicher als AER. Außerdem ergibt MCAR bei der Typisierung von antigenarmen Geweben, wie Gehirn, Fettgewebe, Knorpel etc., stets sichere Befunde. Biologisches Spurenmaterial, wie Haut-, Fett-, Muskel-, Gehirngewebe, die oft am Tatort bei Verkehrsunfällen und Mordfällen gefunden werden, sollten mit Formalin fixiert und mikroskopische Präparate daraus hergestellt werden. Damit wird die Asservierung von Spurenmaterial, nicht nur für morphologische, sondern auch für serologische Untersuchung, gewährleistet.

Nach der Feststellung, daß MCAR fast immer zu sicheren Ergebnissen führt, haben wir uns damit beschäftigt, diese Methode in der praktischen Spurenkunde zu erproben. Verschiedene Klebstoffe wurden darauf geprüft, Spurenmaterial zu sammeln und anzuheften. Durchsichtige Cellophanklebestreifen (Cellotape) erfüllten völlig unsere Bedingungen. Die Klebemethode, die früher schon eingeführt worden ist (FREI, 1955), eignet sich für die schnelle Beobachtung und Asservierung der Spurenmaterialien. Es ist wünschenswert, daß möglichst viel Spurenmaterial mittels Klebebandmethode asserviert wird, wodurch sowohl eine

morphologische (Histologie, Geschlechtsunterschied u.s.w.), wie chemische (Benzidin-Probe, schnelle Prüfung auf Schlafmittel etc.) als auch serologische (Artspezifität, Blutgruppeneigenschaft etc.) Prüfung erfolgen kann.

Weiterhin empfiehlt sich unsere Methodik durch ihre hohe Empfindlichkeit. Für serologische Untersuchungen reicht es schon, nur mit dem Klebebandstreifen die Oberfläche vom Untersuchungsmaterial abzutupfen. Damit kann man die Blutgruppenbestimmung, ohne Beschädigung der Beschaffenheit von Spuren, an gleichen Stellen mehrmals wiederholen. Wichtig ist jedoch, daß unsere Modifikation nicht zwischen Ausscheider und Nicht-Ausscheider differenzieren kann. Nach serologischen Untersuchungen der Spurenoberfläche kann man an den gleichen Stellen die Absättigungsmethode durchführen. In diesem Sinne ist die Klebebandmethode als "screening test" zu verwerten.

Die Eigentümlichkeit der MCAR bei den Ausscheidertypen (MCAR zeigt deutlich die Blutgruppeneigenschaft in Speichel von Nichtausscheidern an; diese Befunde sind von verschiedenen Forschern -DODD und HUNTER 1963, PEREIRA 1963, MARESCH und WEHRSCHÜTZE 1964, PROKOP und GIBB 1965, SCHULZ 1974- berichtet worden) gibt wichtige Hinweise für die Biosynthese von ABO-Blutgruppensubstanzen. Ob es sich in diesem Fall um eine große Empfindlichkeit der MCAR oder um eine MCAR-spezifische Eigenschaft handelt, ist nicht sicher zu beantworten. Die Tatsache, daß kein quantitativer Unterschied bei der MCAR vorliegt -die Speichel von beiden Sekretortypen reagieren bis zur gleichen Verdünnung 1:10,000- spricht vielmehr für die letzte Annahme. Das Problem, ob sich zwei Systeme von ABO-blutgruppenaktiven Eigenschaften im Speichel befinden - eine, die zum bisherigen blutgruppenaktiven Glykoprotein gehört und von H-h und Se-se Genen gesteuert wird, und eine andere, die, wie die ABO-Isoantigene an Erythrozytenmembranen, unabhängig von den Sekretortypen immer im Speichel vorhanden ist-, muß offen bleiben.

Nach unserer Erfahrung, ist es empfehlenswert, die aufgetragenen (oder abgedrückten) Spuren serologisch zu untersuchen. Eine Stofffaser kann manchmal so viel Antikörper aufsaugen, daß trotz wiederholten Waschens er immer noch haften bleibt und zu Fehlern führt. Dies ist besonders dann der Fall, wenn Ulex Anti-H und Pronase-behandelte O-Zellen benutzt werden.

Der Befund, daß Fingerabdrücke eine Blutgruppenbestimmung ermöglichen, scheint bedeutungsvoll bei krimnologischen Untersuchungen. Nach der japanischen Strafprozessordnung unterliegt die Blutentnahme bei einem Verdächtigen für eine Blutgruppenbestimmung immer der Genehmigung des Gerichtes, dagegen die Entnahme von Fingerabdrücken nicht. Daher ermöglicht unsere Technik die Blutgruppenbestimmung in bestimmten Fällen. Dabei muß man jedoch immer mit einer Kontamination von blutgruppenaktiven Substanzen aus der Umgebung rechnen. So

empfiehlt es sich, neben Fingerabdrücken auch Hautschuppen aus der inneren Seite des Unterarms gleichzeitig zu untersuchen. Bezüglich der Blutgruppenbestimmung aus Hautschuppen und Schmutz, hat SWINBURNE (1962) darauf hingewiesen, daß sie vor MCAR mit Kalilauge behandelt werden sollen. Die hydrophoben Eigenschaften von Hautschuppen und Schmutz bewirken nur schwache Anhaftungen der Indikatorzellen an den sensibilisierten Loci, so daß sie durch die Zentrifugation oder Aufschütteln abgelöst werden. Da die Gefahr von mechanischem Schütteln bei unserer Methode ausgeschlossen ist, gewinnt man immer typische MCAR-Befunde.

Wir haben auch untersucht, in welchem Umfang verschiedene Seren und Indikatorzellen die Mischagglutination beeinflussen. Bisherige Befürchtungen, daß bestimmte Seren für die sichere Reaktion mit Vorsicht zu verwenden sind, konnten wir nicht bestätigen. Unvorsichtige Kombinationen der Seren und Indikatorzellen ergeben jedoch manchmal schwache und sogar negative Befunde. Nach unserer Erfahrung ergeben Zellen, die innerhalb von 15 Sekunden positive Agglutination anzeigen, stets eindeutige Befunde. Außerdem benutzen wir frische Zellen, die weniger als 24 Stunden nach der Blutentnahme bei 4°C aufbewahrt wurden; die, die länger asserviert wurden, geben oft nur schwache Reaktionen; die unspezifische Anhaftung der Zellen an der Oberfläche des Filmes ist stets stärker.

Wir haben die Blutgruppentypisierung an verschiedenen Untersuchungsmaterialien versucht, um die Grenzen unserer Klebeband-Methode sicher zu erfassen. Am schwersten erscheint die Untersuchung von Haaren. Nachdem wir jedoch die oben erwähnte Bedingung erfüllt haben, fanden wir keine Schwierigkeit bei der Untersuchung in über 100 Fällen. Mit den anderen Spurenarten, einschließlich Fingerabdrücken, Hautschuppen, Schmutz etc., gibt es keine Schwierigkeit.

Trotz des einfachen Verfahrens muß man bei der Behandlung von Spurenmaterialien jedoch immer vorsichtig sein. Unvorsichtige Berührungen mit bloßen Händen, die bei der allgemeinen Absorption oder bei AER keine Beeinflussung geben mag, führt zu störenden Kontaminationen, die weitere Untersuchungen in Frage stellen. Dies läßt sich jedoch bei vorsichtigem Arbeiten vermeiden. Die Erfahrungen mit anderen Blutgruppeneigenschaften und der Artspezifität etc. werden in weiteren Untersuchungen fortgesetzt.

LITERATUR

- AKAISHI, S.: Studies on the group-specific double combination method. *Jap. J. Legal Med.* 19, 175 (1965)
- COOMBS, R.R.A., DODD, B. Possible Application of the Principle of Mixed Agglutination in the Identification of the Blood Stains *Med. Sci. Law.* 1, 359 (1961)
- DAVIDSOHN, I.: Early Immunologic Diagnosis and Prognosis of Carcinoma. *A.J.C.P.* 57, 715 (1972)

- DODD, B.E., HUNTER, D.: A Comparison between the Inhibition and Mixed Agglutination Techniques for the Detection of A, B and H. Proceedings of the Third International Meeting in Forensic Immunology, Medicine, Pathology and Toxicology; London, 1963
- FREI, M.: Beitrag zur Spurenkunde des Suicids durch Erhängen und Erdrosseln. *Kriminalistik* 9, 345 (1955)
- ISHIYAMA, I., ITAKURA, Y.: New Method of Determining Blood Group ABO from Paraffin-sectioned Tissue Slice (in japanisch). *Igakunoayumi* 74, 217 (1970)
- KIND, S.S.: Absorption-elution grouping of dried blood smears. *Nature (Lond.)* 185, 397 (1960)
- KOUVARIK, S., DAVIDSOHN, I., STEJSKAL, R.: ABO Antigens in Cancer. *Arch. Path. (Chicago)* 86, 12 (1968)
- MARESCH, W., WEHRSCHÜTZE, E.: Untersuchungen über die Ausscheidereigenschaft. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 55, 228 (1964)
- NICKOLLS, L.C., PEREIRA, M.: A Study of Modern Methods of Grouping dried blood stains. *Med. Sci. Law* 2, 172 (1962)
- PEREIRA, M.: Observations on the Grouping of Dried Stains of Body fluids. Proceedings of the Third International Meeting in Forensic Immunology, Medicine, Pathology and Toxicology; London, 1963
- PROKOP, O., GIBB, B.: Ergänzende Bemerkungen zur Arbeit von Maresch und Wehrschütz über die Ausscheiderschaft. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* 56, 221 (1965)
- SCHULZ, E.: Absättigungsversuch und Mischzellagglutination; Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis der Ausscheidereigenschaft. *Z. Rechtsmedizin* 74, 87 (1974)
- SLAVIK, V.L., MELUZIN, FR.: Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit im System ABO an histologischem Material. I. Histologische Präparate der seziierten Fälle. *Z. Rechtsmedizin* 70, 79 (1972)
- STYLES, W.M., DODD, B.E., COOMBS, R.R.A.: Identification of Human Blood Stains by Means of the Mixed Antiglobulin Reaction on Separated Cloth Fibrils. *Med. Sci. Law* 3, 275 (1963)
- SWINBURNE, L.M.: The identification of skin. *Med. Sci. Law* 3, 3 (1962)
- TOENDER, O., MILGROM, F., WITEBSKY, E.: Mixed Agglutination with Tissue Section. *J. exp. Med.* 119, 265 (1964)
- YADA, S., OKANE, M., SANNO, Y.: Blood Grouping of a Single Human Hair by Means of Elution Technique. *Acta criminol. jap.* 32, 7 (1966)

Prof. Dr. I. ISHIYAMA
Teikyo University
School of Medicine
11-1 Kaga, 2 chome
Itabashi-ku
Tokyo 173/Japan