

Zum Beweiswert der MN-Differenzierung aus Blutspuren

Wolfgang Schwerd

Institut für Rechtsmedizin der Universität, Versbacher Landstr. 3, D-8700 Würzburg,
Bundesrepublik Deutschland

On the Proof of MN-Differentiation from Blood Samples

Summary. 1. The results of MN testing are – so far as the factor N is concerned – especially in the case of older samples to be used only with caution.
2. The provision for a reliable result demands several good sera that have been previously used in testing and found to be satisfactory.
3. It is especially necessary to work with two different methods. The mixed agglutination method is no longer reliable in cases of months-old or very dryly stored samples.

Zusammenfassung. 1. Die Ergebnisse von MN-Untersuchungen sind – soweit es das Merkmal N betrifft – insbesondere bei nicht mehr ganz frischen Spuren nur mit großer Vorsicht verwertbar.
2. Voraussetzung für ein beweiskräftiges Ergebnis ist, daß mit mehreren Testseren gearbeitet wurde, deren Eignung vorher an Testspuren erwiesen wurde.
3. Es ist darüberhinaus unbedingt nötig, mit 2 verschiedenen Methoden zu arbeiten. Die Mischagglutinationsmethode ist bei Spuren, die Monate alt sind oder sehr trocken gelagert waren, nicht mehr verlässlich.

Key words: Blutgruppen, MN-Differenzierung aus Blutspuren – MN-Blutgruppen, in Spuren – Spurenkunde, MN-Differenzierung

Schon bald nachdem man entdeckt hatte, daß die Merkmale des ABO-Systems A und B in angetrockneten Blutspuren auf indirektem Wege nachweisbar sind (Schiff, Holzer), wurde versucht, auch die Merkmale M und N auf diese Weise zu erfassen.

Lauer wendete 1933 als erster die Absorptionstechnik für den MN-Nachweis an. Er führte seine Versuche mit von der Spur abgeschabtem Blutpulver aus und verwendete davon für jedes der beiden Merkmale 10 mg. Mit M- und N-Blutspuren ergab sich eine vollständige Absorption der in 0,1 ml Anti-M-Serum (Titer 1 : 10) enthaltenen Anti-Körper. Mit MN-Spuren kam es dagegen zu keinem vollständigen Titerverlust der M- und N-Antiseren. Hier war die Verzögerung des Eintretens einer Agglutination für die Beurteilung maßgebend. Mit Blutspuren, die sich an Stoffen (Tüchern) befanden, hatte Lauer mehrfach unsichere Ergebnisse. Andere Autoren weisen auf

Schwierigkeiten beim Nachweis der N-Eigenschaft hin (Therkelsen 1936, Schleyer u. Mitarb., Maehly u.a.).

Mit der Entwicklung besserer spurekundlicher Methoden waren die Aussichten, auch das Merkmal N in den Griff zu bekommen, gestiegen. Wesentliche methodische Verbesserungen waren das Mischagglutinationsverfahren (Coombs, Coombs u. Dodd) sowie die Absorptions-Elutions-Methode (Kind). Diese Methoden wurden bekanntlich zunächst zum Nachweis der Merkmale A und B angewendet, aber bald darauf versuchte man, auch den MN-Nachweis damit zu erzielen. Bei der Durchsicht der einschlägigen Arbeiten gewinnt man den Eindruck, daß die frühere Problematik des Nachweises des N-Merkmals nicht mehr von Bedeutung ist, wenn auch gewisse, im ganzen aber nur vorsichtige Hinweise auf Schwierigkeiten zu finden sind, wie z.B. „die Eigenschaft M ist widerstandsfähiger als N“ (Kojakov-Tribulew). Tatsächlich sind aber, wie wir im folgenden zeigen werden, die Schwierigkeiten bei der Erfassung des Merkmals N auch bei Anwendung der modernen Methoden nicht völlig beseitigt.

Eigene Untersuchungen

Nach zahlreichen Vorversuchen, bei denen festgestellt wurde, daß die Absorptionstechnik nach Lauer für spurekundliche Untersuchungen wenig geeignet ist, wendeten wir folgende 3 Methoden an:

1. Die Absorptions-Elutions-Methode nach Kind in Anlehnung an die Modifikation von Rauschke.
2. Die Absorptions-Elutions-Methode in der Modifikation von Lincoln u. Dodd.
3. Die Mischagglutinations-Methode nach Coombs u. Dodd in Anlehnung an die Modifikation von Kobiela, Tukowska u. Opolska.

Sämtliche Versuche wurden mit Blutspuren verschiedenen Alters vorgenommen, die an weißen Leinenläppchen angetrocknet waren.

Technik

I. Absorptions-Elutions-Methode nach Kind in Anlehnung an die Modifikation von Rauschke

1. Man schneidet aus dem Blutflecken 2 je 5 mm² große Stückchen heraus und zur Leerkontrolle 2 gleichgroße Textilstückchen aus dem sauberen Teil des Stoffs.
2. Die Blutflecken werden auf einer Tüpfelplatte 15 min lang mit Methanol fixiert. Der Alkohol wird danach mit Filtrierpapier abgesaugt und die Flecken luftgetrocknet.
3. Nun bringt man die Flecken in saubere Reagensgläschen (Venülenröhrchen).
4. In jedes Röhrchen gibt man 2 Tropfen Anti-M- bzw. Anti-N-Serum (Titer 1 : 32) und läßt die Antiseren 12 Std im *Kühlschrank* einwirken.
5. Sodann werden die Seren abgesaugt und die Stoffstückchen 6mal mit eisgekühlter physiol. NaCl-Lösung gewaschen, die man zwischendurch jeweils 10 min im *Kühlschrank* einwirken läßt und dann absaugt.
6. Nach Zugabe von je 1 Tropfen physiol. NaCl-Lösung bringt man die Röhrchen zum Abstrengen der Antikörper 15 min lang in ein Wasserbad (56 °C).
7. Die Röhrchen werden abgekühlt und danach erneut 15 min lang ins Wasserbad gebracht.
8. Aus den erwärmten Röhrchen werden jetzt die Stoffstückchen herausgenommen. Nach dem Abkühlen setzt man dem Röhrcheninhalt je 1 Tropfen einer höchstens 0,5 %igen Aufschwemmung von O-M- bzw. O-N-Erythrozyten in physiol. NaCl-Lösung mit 1 % Rinderalbumin (frisch angesetzt!) zu. Der Röhrcheninhalt wird gut durchmischt.

9. Anschließend bringt man die Röhrcn im Reagensglasständer bei Zimmertemperatur auf einen Rotator und läßt sie solange schaukeln bis die Positivkontrollen deutliche Agglutinate zeigen. Dies ist in der Regel nach 1 Std der Fall.

Die mit Anti-M-Serum behandelten Proben ergeben bei Blutflecken, die von Personen mit den Eigenschaften M (reinerbig) oder MN stammen, fast stets kompakte Agglutinate. Die mit Anti-N-Serum behandelten Proben weisen dagegen manchmal, selbst bei Blutflecken, die von N-reinerbigen Personen stammen, schwächere Agglutinate auf.

II. Absorptions-Elutions-Methode (Modifikation von Lincoln u. Dodd)

Die Schritte 1–4 decken sich mit der unter I genannten Technik. Die erforderliche Spurenmenge ist geringer. 2 mm² genügen.

5. Das Auswaschen des Testserums geschieht in der Weise, daß 5mal mit reichlich eisgekühlter NaCl-Lösung gewaschen wird. Zum 6. Waschvorgang wird der eisgekühlten NaCl-Lösung 30 %iges Rinderalbumin im Verhältnis 1 : 100 zugesetzt. Der gesamte Waschvorgang soll sich über 2–3 Std erstrecken. Die Waschflüssigkeit ist jeweils sorgfältig zu entfernen.

6. Nach dem Auswaschen wird in jedes Röhrcn 1 Tropfen der albuminhaltigen NaCl-Lösung (1 : 100) gegeben und 10 min lang bei 60 °C im Wasserbad unter Schütteln eluiert.

7. Jetzt wird – ohne daß der Spureträger entfernt wird – 1 Tropfen einer 0.5 %igen Testerythrozytensuspension in albuminhaltiger NaCl-Lösung zugesetzt, das Röhrcn geschüttelt und 1 – 1 1/2 Std bei 37 °C inkubiert.

8. Der Überstand wird abgesaugt, das Röhrcn mit NaCl-Lösung aufgefüllt und der Spureträger vorsichtig entfernt. Die verbliebenen Erythrozyten werden 2mal mit NaCl-Lösung gewaschen. Zum Rückstand gibt man 1 Tropfen Coombs-Serum (bei Verwendung von Kaninchen-Testseren Anti-Kaninchen-Serum!), schüttelt kurze Zeit auf dem Rotator und liest (makroskopisch) ab.

Bei Punkt 7 muß in Abweichung von der Originalvorschrift das Röhrcn statt bei 37 °C inkubiert für mehrere Stunden in den Kühlschrank gestellt werden. Nach unserer Erfahrung sind schon nach dem Herausnehmen der Röhrcn aus dem Kühlschrank (vor Schritt 8) positive Reaktionen klar zu erkennen. Eine Verbesserung der Ergebnisse durch die Zugabe des Coombsserums fanden wir jedenfalls nicht.

III. Mischagglutinations-Methode nach Coombs u. Dodd in Anlehnung an die Modifikation von Kobiela, Tukowska u. Opolska

1. Man nimmt einen etwa 5 mm langen blutbefleckten Faden und zerfasert ihn unter Methanol, das schon 10 min vorher eingewirkt haben muß. Nach völligem Abdunsten des Methanols kommen die Fasern in Mikroreagensgläser und werden dort mit 2 Tropfen Anti-M- bzw. Anti-N-Serum (Mindesttiter 1 : 32) versetzt.

2. Das Testserum läßt man mindestens 12 Std im Kühlschrank einwirken.

3. Nach sechsmaligem sorgfältigen Waschen mit eiskalter physiol. NaCl-Lösung, die jeweils im Kühlschrank 10 min einwirkt und dann mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wird, setzt man je 1 Tropfen der homologen Testerythrozyten (0.5 %ig) zu.

4. Vor der mikroskopischen Ablesung werden die Röhrcn für 2 Std bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Danach werden die Fasern auf einen Objektträger gebracht und mit Deckgläschen bedeckt.

Diskussion

Eine forensisch brauchbare Methode muß zuverlässig sein, d.h., sie muß einwandfreie, stets reproduzierbare Ergebnisse zulassen. Eine solche Methode ist z.B. die Absorptions-Elutions-Methode zur ABO-Bestimmung.

Bei der spurenkundlichen MN-Bestimmung ist es uns jedoch in jahrelangen Versuchen nicht gelungen, eine für alle Fälle brauchbare Methode zu finden. Die Schwierigkeit liegt beim Merkmal N. Der Nachweis des Merkmals M ist unproblematisch. Therkelsen hat deshalb schon 1936 empfohlen, nur dieses Merkmal zu berücksichtigen. Damit nimmt man aber einen solchen Informationsverlust in Kauf, daß man auf die MN-Bestimmung praktisch ganz verzichten kann, denn fast 80 % der Europäer besitzen das Merkmal M reinerbig oder in Kombination mit N. Zudem würde man bei negativem Ausfall des M-Nachweises nicht einmal in jedem Falle mit ausreichender Sicherheit sagen können, daß nur das Merkmal N vorliegt, weil – bei geringem Spurenmaterial – auch der M-Nachweis versagen kann.

Da man in wichtigen Spurenfällen nicht gerne auf die MN-Bestimmung verzichten möchte, stellt sich die Frage nach einem vertretbaren Ausweg. Einen solchen sehen wir derzeit nur in einer etwas umständlichen Form, nämlich dadurch, daß man – ähnlich wie bei der HLA-Untersuchung – mit mehreren Anti-N-Seren arbeitet. Dabei genügt es nicht, beliebige Testseren heranzuziehen. Es dürfen vielmehr nur solche Seren verwendet werden, die vorher mit Test-Spuren auf ihre Brauchbarkeit geprüft worden sind. Die Titerbestimmung der Seren reicht allein nicht aus.

Bei allen spurenkundlichen Untersuchungen sollte man die von Lincoln und Dodd besonders hervorgehobenen Gesichtspunkte beachten. Sie lauten:

1. Es muß ein passendes Verhältnis zwischen Antigen (= Spur) und Antikörpern in der Phase der Absorption bestehen. Ein Überschuß an Antigen bringt die Gefahr mit sich, daß vor allem die besonders starken Antigen-Rezeptoren Antikörper anlagern und bei der Elution nur schwer abgeben oder daß diese sich gleich wieder anlagern (Rekombination). Man muß also immer für einen Antikörperüberschuß in der Absorptionsphase sorgen. Allerdings darf dieser wiederum nicht zu groß sein, weil man dann mit unspezifisch positiven Befunden rechnen muß.

2. Beim Auswaschen der überschüssigen Antikörper muß man sehr darauf achten, möglichst nahe bei 4 °C zu bleiben, weil bei dieser Temperatur die Gefahr der Abspaltung gebundener Antikörper am geringsten ist.

3. Die Erythrozytensuspension darf nicht zu hoch konzentriert sein. Sie soll 0,5 % nicht überschreiten.

Wir möchten hinzufügen, daß die Erythrozyten möglichst frisch sein sollten. Sie dürfen nicht älter als 24 Stunden sein. O-M- bzw. O-N-Erythrozyten sind zu bevorzugen, weil die in der Spur selbst vorhandenen Isoagglutinine als Störfaktor in Betracht kommen. Eine Papainisierung der Testerythrozyten, die bei der ABO- evtl. auch bei der CDE-Bestimmung eine erhebliche Empfindlichkeitssteigerung bringt, ist bei der MN-Bestimmung nicht zulässig, weil die M- und N-Antigene durch proteolytische Fermente zerstört werden (Krüpe u.a.).

Bei frischeren Blutspuren nimmt man an Stoffen je nach deren Dicke und der Intensität der Blutdurchtränkung etwa 5–10 mm²-große Flecken bzw. eine entsprechende Blutmenge von anderem Trägermaterial. Um eine Vorstellung von der erforderlichen Blutmenge zu bekommen, haben wir die Größe von Blutflecken auf Leinen (Oberhemdenstoff) und das Gewicht der aufgebrachten Blutmenge bestimmt. Etwa 6 mg schwere Blutropfen ergeben Flecken von ca. 30 mm². 10 mm² entsprechen also einer Menge von 2 mg Frischblut. Wenn die Spuren 1 Jahr und älter sind oder sehr trocken gelagert waren, dann empfiehlt es sich, größere Spurenmengen (bei Stoff 30–50 mm² – und entsprechend mehr Testserum –) einzusetzen. Auch

sollte man dann die Inkubationszeit von 12 auf 20–24 Stunden (evtl. sogar noch mehr) verlängern (vgl. Hausch).

Bei der Mischagglutinationsmethode kommt man in der Regel mit einer 5 mm langen blutgetränkten Faser aus. Der Einsatz von mehr Material hat bei dieser Methode wenig Sinn, dagegen ist bei älteren Spuren eine Verlängerung der Inkubationszeit in der Absorptionsphase anzuraten.

Von größter Bedeutung ist die *Qualität der Testseren*. Wie schon erwähnt wurde, ist der Nachweis des Merkmals M nicht problematisch, d.h. man wird rasch für spurenkundliche Zwecke brauchbare Anti-M-Seren finden. Dagegen hat es sich immer wieder gezeigt, daß zuverlässige Anti-N-Seren selten sind. Unsere Erwartung, daß hochtitrige Anti-N-Seren (die man ohnedies kaum bekommt) besonders geeignet sind, hat sich nicht erfüllt. Manchmal waren Seren mit einem etwas geringeren Titer sogar besser geeignet als höhertitrigere. Wir haben auch beobachtet, daß einzelne Anti-N-Seren nach mehrwöchiger Lagerung im Kühlschrank zur spurenkundlichen Untersuchung nicht mehr geeignet waren, obwohl ihr Titer nicht abgesunken war.

Entscheidend ist offensichtlich zweierlei:

1. Die Qualität der Testseren, d. h., deren Reaktionsbreite, wie es Kraus bezeichnet hat. Sie läßt sich nur durch Prüfung der verwendeten Seren mit mehreren Test-Spuren feststellen.

2. Faktoren, die in der Spur selbst gelegen sind. Da Schwierigkeiten praktisch nur bei der N-Bestimmung auftreten, wird man am wenigsten daran zu denken haben, daß das Trägermaterial selbst von Bedeutung ist. Es ist wohl vielmehr so, daß in erster Linie die N-Rezeptoren weniger kräftig sind, als die des Merkmals M. Das tritt offensichtlich erst dann deutlich in Erscheinung, wenn das Material eingetrocknet war, was natürlich bei Spuren praktisch immer der Fall ist. Darüberhinaus sind die N-Rezeptoren auch wesentlich stärker alterungsempfindlich als diejenigen des Merkmals M, weshalb zu empfehlen ist, eine spurenkundliche MN-Untersuchung baldmöglichst durchzuführen.

Unter den Testseren sind nach unserer Erfahrung Kaninchenserum etwas besser brauchbar als Humanserum. Für den N-Nachweis empfiehlt es sich zusätzlich ein Phyttagglutinin (*Vicia graminea*) heranzuziehen. Dabei sind sowohl bei der Absorptions-Elutions- als auch der Mischagglutinations-Methode besondere Arbeitsvorschriften (welche die Konzentration der Seren und die „Erwärmung“ bei der Elution betreffen) zu beachten (s. Schwerd).

Hinsichtlich des Beweiswertes der MN-Bestimmung ist folgendes zu sagen:

Unter der Voraussetzung, daß die Testspuren einwandfreie Ergebnisse brachten, ist der M-Befund auf alle Fälle verwertbar. Beim N-Nachweis ist zu bedenken, daß falsch positive Befunde bei exakten Versuchsbedingungen praktisch nicht vorkommen, dagegen falsch negative Befunde hin und wieder beobachtet werden. Wenn also unter mehreren Antiseren eines nicht anzeigt, die anderen dagegen positive Befunde bringen, so kann der negative Befund vernachlässigt werden. Notfalls kann man die Untersuchung wiederholen.

Literatur

- Coombs, R.: A and B Blood Group Antigens on Human Epidermal Cells Demonstrated by Mixed Agglutination. *Lancet* I, 461 (1956)
- Coombs, R., Dodd, B.: Possible Application of the Principles of Mixed Agglutination in the Identification of Blood Stains. *Med. Sci. Law* 1, 359 (1961)

- Hausch, R.: Untersuchungen zum Nachweis von MN-Merkmalen in Blutspuren. Inaugural-Dissertation, Würzburg 1975
- Holzer, F.J.: Zum Nachweis der Blutgruppeneigenschaften M und N. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 26, 615 (1936) und 16, 445 (1931)
- Kind, S. S.: Absorption-Elution-Grouping of Dried Bloodsmears. Nature (London) 185, 397 (1960) und 187, 789 (1960)
- Kobiela, J., Tukowska, B., Opolska, B.: Bestimmung von MNSs-Faktoren in menschlichen Blutflecken. Arch. med. sadowej 22, 117; Zit. in: Zbl. Rechtsmedizin 7, 190 (1974)
- Koch, E.: Zum Problem des schwachen N. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 39, 222 (1948/49)
- Kosjakow, P., Tribuler, W.: The Effect of Temperature and Drying upon the M- and N-Factors. J. Immunol. 37, 297 (1929)
- Lauer, A.: Zur Technik der Blutfleckendiagnose für M und N. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 22, 86 (1933)
- Lincoln, P.J., Dodd, B.E.: An Evaluation of Factors Affecting the Elution of Antibodies from Bloodstains, J. forens. Sci. Soc. 13, 37 (1973)
- Machly: Persönliche Mitteilung
- Rauschke, J.: Persönliche Mitteilung
- Schiff: Zit. nach Holzer
- Schleyer, F., Oepen, I., Hilgermann, R.: Bemerkungen zum „Beitrag zur Erfassung der Antigene M und N . . .“ Arch. Kriminol. 152, 111 (1973)
- Schwerd, W.: Zum Nachweis des Merkmals N in Blutspuren mit Phyttagglutinin. Beiträge gerichtl. Med. (im Druck)
- Therkelsen, F.: Typenbestimmung bei gerichtsmedizinischen Fleckenuntersuchungen. Z. Rassenhygiene 8, 98 (1936) und 9, 1 (1937)

Eingegangen am 26. Oktober 1977