

Originalarbeiten / Original Works

**Erste Erfahrungen mit dem
Treponema-pallidum-Hämagglutinations-(TPHA)-Test
an Blutspuren**

W. Keil¹, G. Müller² und H. Nitschke³

¹Institut für Gerichtliche Medizin, Bereich Medizin (Charité)
der Humboldt-Universität, Hannoversche Str. 6, DDR-1040 Berlin

²Dermatologische Klinik und Poliklinik, Bereich Medizin (Charité)
der Humboldt-Universität, Schumannstr. 20/21, DDR-1040 Berlin

³Abteilung für Klinische Immunologie, Bereich Medizin (Charité)
der Humboldt-Universität, Ziegelstr. 5-12, DDR-1020 Berlin

**First Results with the Treponema-Pallidum-Haemagglutination (TPHA) Test
for Bloodstains**

Summary. Bloodstains were produced from probationers who had had syphilis at some time in their lives and from others whose anamnesis had no indication of syphilis. After storage the stain eluates underwent the treponema-pallidum-haemagglutination (TPHA) test, with the eluates' IgG content being adapted to a concentration adequate to the test conditions. The results received from the stain eluates of the previous syphilis patients corresponded in 85% of the cases with the serum findings of these probationers. It appears that the TPHA test can already provide clues as to the identity of an unknown stain producer at the beginning of the police investigation. Methodical parallels to dried-blood tests of syphilis as a clinical problem will be discussed.

Key words: TPHA test, syphilis dried-blood reactions - Bloodstain typing

Zusammenfassung. Von Probanden, die im Laufe ihres Lebens Syphilis hatten, und von Probanden, deren Anamnese ohne Anhalt für Syphilis war, wurden Blutspuren gefertigt. Nach Lagerung wurde an den Spureneluaten der Treponema-pallidum-Hämagglutinations-(TPHA)-Test durchgeführt, wobei der IgG-Gehalt der Eluate auf eine den Testbedingungen entsprechende Konzentration eingestellt wurde. Die an den Spureneluaten der ehemals Erkrankten erhaltenen Resultate stimmen in 85% der Fälle mit den Serumbefunden dieser Probanden gut überein. Es zeigt sich, daß der TPHA-Test bereits am Beginn polizeilicher Ermittlungen Hinweise auf einen unbekann-

ten Spurenverursacher erbringen kann. Methodische Parallelen zu Trockenbluttests auf Syphilis unter klinischer Fragestellung werden diskutiert.

Schlüsselwörter: TPHA-Test, Syphilis-Trockenblutreaktionen – Blutspuren-typisierung

In der klinischen Medizin wurde vielfach bestätigt, daß der TPHA-Test *die* ideale Suchreaktion in der Serodiagnostik der Syphilis darstellt [Übersicht bei 11]. Durch das Testsystem, das außerordentlich empfindlich ist [5, 11], werden erregerspezifische Antikörper zunächst der IgM-, später der IgG-Klasse nachgewiesen [15]. Der Test gehört zu den Reaktionen, die bei unbehandelter, aber auch bei ausreichend und rechtzeitig behandelter Syphilis lebenslang positiv bleiben können [7, 10, 12]. Auch kann der Test an Trockenblutproben, die entsprechend einem Programm der WHO aus verschiedenen Entwicklungsländern zur Diagnostik nach Europa verschickt werden, mit besten Ergebnissen ausgeführt werden [16]. Es war daher naheliegend, den TPHA-Test auch unter forensisch-spurenkundlichem Aspekt zu überprüfen.

Material und Methode

Blutspuren

Von 107 Probanden wurden Venenbluttropfen auf Glasplatten luftgetrocknet.

TPHA-Test-positive Probanden

Es handelte sich um 48 Personen (8 Frauen und 40 Männer) im Alter zwischen 19 und 72 Jahren, die im Laufe ihres Lebens mindestens *eine* Syphilis durchgemacht hatten und deren Serum einen positiven TPHA-Test (bei Serumverdünnung 1:80 1+ oder stärkere Reaktion) erbrachte. Die Probanden zeigten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keinerlei klinische Symptomatik. Die Infektion war in fast allen Fällen ausreichend und rechtzeitig behandelt worden. Die am kürzesten zurückliegende Infektion war 7 Monate vor Anlegung der Spuren diagnostiziert (Syphilis Stadium II) und behandelt worden. Die älteste Erkrankung war vor 29 Jahren aufgetreten; der Fall stellt sich heute als spätlatente Syphilis dar.

TPHA-Test-negative Probanden

Als Kontrollgruppe wurden Blutspuren von 59 Probanden (7 Frauen und 52 Männer), die zwischen 19 und 60 Jahre alt waren, untersucht. Nach eigenen Angaben hatten diese Personen niemals eine Syphilis. Im TPHA-Test waren alle Probandenserum negativ. Bei 54 Personen handelte es sich um Blutspender, weitere 4 Probanden waren Träger von antinukleären Faktoren, 1 Proband stand unter Syphilisverdacht (Kontaktperson), der aber nicht bestätigt werden konnte.

Aufbereitung der Spuren

Nach verschiedenen Lagerungszeiten bei Zimmertemperatur wurden zu 15 bis 20 mg abgekratzter Trockenblutsubstanz 0,2 ml Absorptionsmittel¹ gegeben. Nach Umrühren ver-

¹ Es handelt sich um das kommerzielle, im Test-Kit (Fujizoki) enthaltene Absorptionsmittel. Nach Angaben des Herstellers besteht es aus: Zellmembransonikat von Schaf- und Rinderythrozyten, Kaninchenhodenextrakt, Reiter-Treponemen-Sonikat, Kaninchenserum, Tween 80 und Akazienpulver in PBS, pH 7,2.

blieben die Eluate über Nacht im Kühlschrank. Scharfes Zentrifugieren erfolgte zur Beseitigung ungelöster Partikel. Vom Überstand wurden definierte Volumen (meist 0,15 ml) abgefüllt.

Der genauen Relation von Trockenblutsubstanzmenge zum Absorptionsmittelvolumen kommt keine entscheidende Bedeutung zu. Voraussetzung für die nachfolgende Testung ist jedoch eine ausreichende IgG-Konzentration im Spureneluat.

IgG-Konzentrationen der Spureneluate

Die Messung des IgG-Gehaltes erfolgte mit der einfachen radialen Immunodiffusion nach Mancini. Verdünnungen des Standardserums (Behring, 1240 mg IgG/dl) von 1 : 8, 1 : 15, 1 : 20 und 1 : 30 erbrachten Eichkurven, auf denen die Konzentrationen der unverdünnten Eluate abgelesen werden konnten. 0,007 ml Eluat wurden in ein Impfloch aufgetragen.

Da Serum bei dem von uns genutzten TPHA-Test-Kit in Ausgangsverdünnungen von 1 : 20 verwendet wird, wurden Spureneluate mit einer Konzentration von mehr als $\frac{1}{20}$ des Mittelwertes der physiologischen IgG-Konzentration durch weiteren Zusatz von Absorptionsmittel auf 65 mg IgG/dl verdünnt. Niedriger konzentrierte Eluate blieben unverdünnt. Spureneluate, die weniger als $\frac{1}{20}$ der unteren Grenze der physiologischen Variationsbreite des IgG-Spiegels aufwiesen (40 mg IgG/dl) wurden bei der Auswertung besonders berücksichtigt.

TPHA-Test

Passive Hämagglutination: Antigen ist der auf Kaninchenhodend gezüchtete, pathogene Nichols-Stamm von *Treponema pallidum*. Fragmentierung der Treponemen durch Ultraschallbehandlung. Sensibilisierung der mit Tannin und Formalin vorbehandelten tierischen Erythrozyten mit dem Treponemen-Ultrasonikat. Verdünnung des Untersuchungsmaterials mit Absorptionsmittel (Vermeidung unspezifischer Reaktionen) und Zugabe der sensibilisierten Testerythrozyten, die bei Vorhandensein treponemenspezifischer Antikörper agglutinieren.

Ein nach diesem Prinzip aufgebautes Test-Kit (Fujizoki) wurde im Mikroverfahren verwendet. In Mikrotitrationsplatten wurden zu je 0,025 ml eines Spureneluats 0,075 ml einer 2,5%igen Suspension sensibilisierter Schaferythrozyten zugesetzt (Endverdünnung der Eluat-IgG-Konzentration bezogen auf Serum 1 : 80). In gleicher Weise wurden die Eluate mit Kontrollerythrozyten (nicht sensibilisierte, sonst gleichartige Schaferythrozyten) zusammengebracht, um unspezifische Reaktionen erkennen zu können. Nach leichtem Schütteln erfolgte Inkubation über Nacht bei Zimmertemperatur in den abgedeckten Platten. Die Bewertung des Stärkegrades der Agglutinationen wurde makroskopisch nach den Richtlinien des Test-Kit vorgenommen.

- 4+ Zellniederschlag, der nahezu gleichmäßig den Boden bedeckt. Gelegentlich gleiten Erythrozyten in das Zentrum.
- 3+ Zellniederschlag, der den Boden inhomogen bedeckt. Angedeutete Ausbildung des punktförmigen Zentrums.
- 2+ Testzellen bilden membranähnliches Muster mit granulärer Sedimentation. Stärkere Ausbildung des Zentrums.
- 1+ Bereits deutlicher Zellniederschlag im Zentrum. Größere Struktur infolge zahlreicher granulärer Sedimentationen.
- Im Zentrum des Bodens kompakter Zellknopf.

Untersuchungsmaterial, das 1+ oder stärkere Agglutination mit den sensibilisierten Erythrozyten zeigt, gilt als reaktiv, vorausgesetzt, daß die nicht sensibilisierten Erythrozyten nicht agglutinieren.

Abbildung 1 gibt Reaktionen des TPHA-Testes wieder.

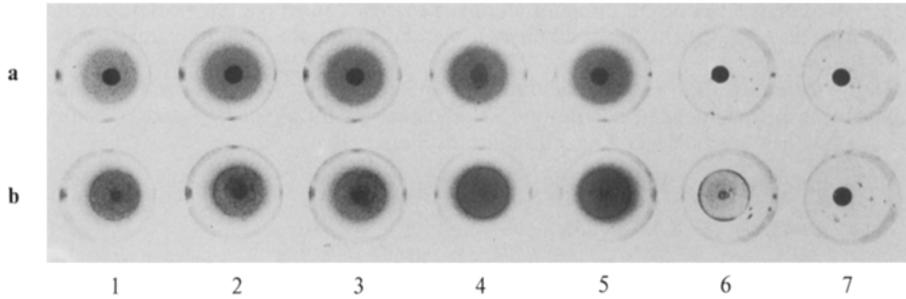


Abb. 1. Hämagglutinationsbilder beim TPHA-Test. **a** Nicht-sensibilisierte Kontrollerythrozyten, **b** sensibilisierte Testerythrozyten

Nr.	Material
1-5	Eluate von bis zu mehreren Wochen gelagerten Blutspuren
6	Positive Serumkontrolle des Test-Kit
7	Negative Serumkontrolle
<i>Spurenverursacher</i>	
1	Weiblich, 20 Jahre, frühlatente Syphilis vor 3½ Jahren
2	Weiblich, 30 Jahre, Syphilis II vor 3 Jahren
3	Weiblich, 19 Jahre, Syphilis II vor 1¾ Jahren
4	Männlich, 34 Jahre, Syphilis II vor fast 2 Jahren
5	Männlich, 22 Jahre, Syphilis II vor 3¾ Jahren
<i>Reaktionsstärke</i>	
1b	3+ 1a —
2b	2+ 2a —
3b	1+ 3a —
4b	4+ 4a —
5b	4+ 5a —
6b	4+ 6a —
7b	— 7a —

Ergebnisse

Der Vergleich der Resultate, die an den Seren der TPHA-Test-positiven Probanden und an den von diesen Probanden stammenden Spuren nach verschiedenen Lagerzeiten erhalten wurden (Blindversuch), ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Blutspuren der TPHA-Test-negativen Probanden wurden nach gleichen Lagerungszeiten, wie in Tabelle 1 ausgewiesen, untersucht. Die 208 an diesem Material ausgeführten Tests waren ausnahmslos negativ (nur bei 2 Ansätzen war der IgG-Gehalt der Eluate geringer als 40 mg IgG/dl).

Diskussion

In rund 85% der Tests (100 von 117, vgl. Tabelle 1) stimmen die am Serum und am gelagerten Spurenmaterial erhaltenen Ergebnisse gut überein und sind bei etwa

Tabelle 1. TPHA-Test-Reaktionen von Blutspureneluaten nach unterschiedlicher Spurenlagerzeit im Vergleich zu den positiven TPHA-Testergebnissen an Serum von 48 Probanden

Reaktionsstärke Spur/Serum	Lagerzeit (Wochen)				Summe
	1	4	9	13	
gleich	17 (2)	14 (2)	24 (2)	5	60 (6)
stärker	6 (1)	6	9	2	23 (1)
schwächer	3	3	7	4	17
negativ	1 (1)	6 (2)	3	1 (1)	11 (4)
Unspezifische Reaktionen (Agglutination der Kontrollerythrozyten)	0	0	0	6 ⁺	6
Summe	27	29	43	18	117

() = Anzahl jener Fälle der beobachteten Gesamtzahl, bei denen die IgG-Konzentration im Eluat kleiner als $\frac{1}{20}$ der unteren Grenze der physiologischen Variationsbreite des Serums war.

⁺ = bei späteren Wiederholungsbestimmungen derselben Proben spezifischer Testausfall

der Hälfte der Testansätze (60 von 117) sogar identisch. Bemerkenswert ist, daß einzelne Spureneluate zu Agglutinationen führen, die den Reaktionen des Serums genau entsprechen oder sogar stärker sind, obwohl sie die vorausgesetzte Mindestkonzentration von 40 mg/dl nicht besitzen. Hier deuten sich Konzentrationsphänomene an (z. B. relativ hoher Anteil der Treponemen-Antikörper am Gesamt-IgG), die in weiteren Untersuchungen zu klären sind. Eine lagerungsbedingte Verschlechterung des Treponemen-Antikörper-Nachweises ist im Untersuchungszeitraum nicht erkennbar, wengleich der relative Anteil schwächerer Reaktionen der Spureneluate im Vergleich zum Serum nach 13 Wochen höher ausfiel als es bei kürzerer Lagerung der Fall war. 7 der 117 Untersuchungen führten an den Spuren zu falsch negativen Ergebnissen. Bei weiteren 4 Tests mit negativen Reaktionen war der vorausgesetzte Mindest-IgG-Gehalt in den Eluaten nicht erreicht, so daß diese Resultate nicht von vornherein als falsch negativ, sondern als nicht beurteilbar gedeutet werden. Die relativ hohe Rate unspezifischer Reaktionen nach 13wöchiger Lagerung ist am ehesten technischen Unzulänglichkeiten zuzuordnen, da Wiederholungsbestimmungen keine Unspezifitäten erbrachten. Die spurenkundliche Verwertbarkeit des Testes wird dadurch untermauert, daß an Spuren TPHA-Test-negativer Probanden in keinem Fall falsch reaktive Ergebnisse beobachtet wurden.

Zum forensischen Syphilis-Nachweis aus Blutspuren finden sich Parallelen in der klinischen Medizin, wenn Massenuntersuchungen an Trockenblutproben durchgeführt werden oder wenn angetrocknetes Blut zur Diagnostik per Post in Zentrallaboratorien eingesandt wird.

In zahlreichen, unterschiedlich erfolgreichen Untersuchungen wurden Trockenblutauszüge für die Lipoid-Antikörper-(Reagin)-Nachweise (auch in Mikrotests) zur Syphilis-Diagnostik verwendet [Übersichten bei 3, 17]. Größere Bedeutung hatte das Verfahren nach Chediak [1] — eine Modifikation der Mikro-Meinicke-Flockungsreaktion. Jedoch sind die Lipoid-Antikörper-Nachweise prinzipiell für forensische Zwecke weniger geeignet: Die Reaktivität der Tests bleibt durchschnittlich kürzere Zeit nach der Infektion erhalten, während die treponemenspezifische „serologische Narbe“ meist über eine längere Zeit oder sogar lebenslang nachweisbar ist [7, 10, 11]. Die Lipoid-Antikörper-Nachweise sind im Vergleich zu den trepo-

nemenspezifischen Tests unempfindlicher [14] und führen in einem relativ hohen Anteil zu unspezifischen Reaktionen [3, 5, 14]. Die an Trockenblut erhaltenen Ergebnisse sind häufig schlechter als die Resultate bei Serumuntersuchungen; so wird auch das Chediak-Verfahren für die Diagnostik des Einzelfalls schon seit längerer Zeit abgelehnt [3, 17].

Wesentlich bessere Ergebnisse wurden mit Trockenbluttests zum Nachweis treponemenspezifischer Antikörper erzielt. Hopkins [6] wendete den Fluoreszenz-Treponemen-Antikörperabsorptions-(FTA-Abs)-Test bei Eluaten an, die von auf Filterpapier getrockneten und bis 2 Monate bei -20°C gelagerten Blutproben gewonnen wurden (Eluat im Vergleich zum Serum etwa 1 : 8). Bei 90% im Serum positiver Probanden konnte der Antikörper auch im Eluat nachgewiesen werden. Paris-Hamelin et al. [16] hatten beim FTA-Abs-Test und sogar beim quantitativen FTA- und TPHA-Test übereinstimmende Ergebnisse von Serum und Eluaten. Als Trägermaterial wurden Glasfibrscheiben genutzt. Die Eluatkonzentrationen lagen bei etwa 1 : 10 in Relation zum Serum. Lagerung des Materials von bis zu 2 Monaten bei Zimmertemperatur führten zu keinerlei Reaktivitätsabfall.

Unter klinischen Bedingungen kann davon ausgegangen werden, daß bei Verwendung gleichartig beschaffener Trägermaterialien an diese etwa gleiche Blutvolumina antrocknen. Somit stehen nach der Elution im Vergleich zum Serum stets Antikörperkonzentrationen bestimmter Größenordnung zur Verfügung. In der forensisch-spurenkundlichen Praxis sind solche Verhältnisse nicht gegeben. Die von uns angewandte IgG-Konzentrationsbestimmung im Spureneluat ist daher notwendige Voraussetzung, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Nach unserer Kenntnis hat erstmals King [8] den *Treponema pallidum*-Antikörper unter spurenkundlichem Aspekt untersucht. Jedoch hat der Autor selbst auf Schwierigkeiten, besonders Spezifitätsprobleme hingewiesen [8, 9], die die an Blutspuren erhobenen Befunde zweifelhaft erscheinen lassen, zumal Vergleiche mit den Serumreaktionen der Spurenverursacher nicht mitgeteilt wurden.

Anzumerken ist, daß die Zahl der Neuerkrankungen an Syphilis in der DDR wie in anderen europäischen Regionen [2] gegenwärtig vergleichsweise gering ist – Ende der 70er Jahre wurden in der DDR jährlich etwa 950 Neuinfektionen registriert [18]. Dies schmälert jedoch die spurenkundliche Brauchbarkeit nicht, weil die Anzahl der Träger treponemenspezifischer Antikörper weitaus größere Dimensionen haben dürfte, und weltweit betrachtet, die Zahl der *Treponema pallidum*-Infektionen (Syphilis) wieder zunimmt [13].

Untersuchungen, wie sie für den *Treponema pallidum*-Antikörper durchgeführt wurden, können gegenüber den herkömmlichen Ergebnissen der Bestimmung genetisch gesteuerter Blutgruppenmerkmale bereits am Beginn polizeilicher Ermittlungen – also prospektiv – direkte Hinweise auf einen zunächst unbekanntem Spurenverursacher erbringen. Aufgrund ähnlicher Antigenstrukturen der humanpathogenen Treponemen-Spezies sind bei positivem TPHA-Test differentialdiagnostische Einschränkungen nur in Hinblick auf in Europa sehr selten vorkommende Krankheiten (endemische Syphilis, Frambösie, Pinta) zu machen. Biologisch spezifisch reaktive Befunde kommen aus verschiedenen Ursachen nur in etwa 2,1 bis 3,3‰ der Fälle vor [7, 11]. In der DDR bilden die gesetzlichen Grundlagen zur Verhütung und Bekämpfung von Geschlechtskrankheiten [4, 19] gute Voraussetzungen für die Ermittlungstätigkeit, da Syphilitis-erkrankungen meldepflichtig sind und auch ehemals Erkrankte festgestellt werden können.

Danksagung. Frau Rosemarie Bitta danken die Autoren vielmals für die konstruktive technische Unterstützung.

Literatur

1. Chediak A (1932) Technik und vergleichende Resultate der Syphilisdiagnose aus einem Tropfen getrockneten und defibrierten Blutes. Arch Med Infant Hosp Garcia 1:125. (Zit in: Zentralbl Haut- Geschl-Krankh 44 : 210)
2. Communicable Diseases Scotland. Summary of sexually transmitted diseases 1972-1979. Ruchill Hospital, Glasgow
3. Ehrmann G (1962) Klassische Serologie der Syphilis. In: Jadassohn J (Hrsg) Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten VI/2A. Springer, Berlin Göttingen Heidelberg
4. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung übertragbarer Krankheiten beim Menschen vom 20. 12. 1965. GBl DDR I (1966) : 29
5. Hagedorn HJ, Naumann P (1979) Moderne Serodiagnostik der Syphilis. Ein Vergleich von TPHA- und FTA-Abs-Test mit den klassischen Flockungs- und Komplementbindungs-Reaktionen. Dtsch Med Wochenschr 104 : 209
6. Hopkins DR (1977) Fluorescent treponemal antibody absorptions (FTA-Abs) tests using blood samples collected on filter paper. Am J Trop Med Hyg 26 : 188
7. Kern A (1975) Moderne Screening-Routine-Serodiagnostik der Syphilis. Dtsch Gesundheitswesen 30 : 1135
8. King LA (1974) The identification of anti-parasitic-antibodies in bloodstains using an indirect fluorescent antibody technique. J Forensic Sci 14 : 117
9. King LA, Werret DJ, Whitehead PH (1976) Antibody profiling of bloodstains. Forensic Sci Int 8 : 151
10. Luger A, Spendlingwimmer I, Zips A, Ogris E, Hawlicek F, Pühringer R (1974) Das Verhalten der Reaktivität in syphilisserologischen Untersuchungen. Z Hautkr 49 : 529
11. Müller F (1976) Der Treponema-Pallidum-Hämagglutinations-(TPHA)-Test. Prinzip, Aussagekraft und bisherige Erfahrungen. Aktuel Dermatol 3 : 123
12. Müller F (1977) Serodiagnostik der Syphilis aus der Sicht des Immunologen. Hautarzt 28 : 167
13. Müller F, Ehrke K, Bitz H (1979) Ergebnisse moderner Syphilis-Serologie bei Blutspendern. Zugleich ein Beitrag zur Häufigkeit von Syphilis-Spontanheilungen. Z Hautkr 54 : 363
14. Müller F, und Arbeitsgruppe (1981) Serodiagnostik der Syphilis (Lues). Zentralbl Bakteriologie Mikrobiol Hyg [A] 250 : 1
15. Okamoto S, Tanabe Y (1971) Studies of the treponema pallidum haemagglutination antibodies. Br J Vener Dis 47 : 77
16. Paris-Hamelin A, Caussee G, Vaisman A, Fustec-Ibarbouré S, Tordjman N (1979) Utilization of fibreglass discs to collect specimens for the serodiagnosis of syphilis by the fluorescent antibody and passiv haemagglutination tests. Document WHO/VDT/RES/79.360 : 1
17. Schneeweiss U, Dietz O (1963) Die Reihenuntersuchung auf Syphilis mit modernen serologischen Methoden. Barth, Leipzig
18. Statistisches Jahrbuch der Deutschen Demokratischen Republik (1981). Staatsverlag, Berlin (DDR)
19. Verordnung zur Verhütung und Bekämpfung der Geschlechtskrankheiten vom 23. 2. 1961. GBl DDR II (1961) : 85

Eingegangen am 17. März 1983