

Originalarbeiten / Original Works

Mikromethode zum Nachweis erythrozytärer Antigene an Blutspuren

J. Lötterle¹, Birge Berns und H. Kern

Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg,
Universitätsstr. 22, D-8520 Erlangen, Bundesrepublik Deutschland

Micromethod for Grouping Red Blood Cell Antigens in Stains

Summary. A micromethod was developed to allow the analysis of blood stains of minor size by the absorption elution technique. The individual absorption, washing, and elution steps were carried out in Beckman tubes containing 5 μ l antiserum. The final agglutination reaction was read through the inverted microscope in microtest plates regularly used for HLA typing. For this final reaction, 2–4 μ l eluate was incubated with 2,000 red blood cells suspended in 1 μ l saline and supplement. For the purpose of standardization, the intensity of agglutination in the microtest plate had to be defined. In comparison to the standard method (tube test and centrifugation), the proposed method proved to be slightly more sensitive with regard to the Rhesus and slightly less sensitive with regard to the AB0 system. With the proposed method very small traces could be successfully analyzed. Thus, two cotton threads 1 mm in length were sufficient for testing antigens A and B, and two cotton threads 2.5 mm in length were enough to detect an Rh antigen.

Key words: Absorption elution test – Blood stains – Micromethod – Red blood cell antigens

Zusammenfassung. Um den Absorptions-Elutions-Test auch noch mit sehr kleinen Blutspuren durchführen zu können, wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem die Reaktionsschritte während der Absorptions- und Elutionsphase in sogenannten Beckman-Tubes (0,4 ml Inhalt) erfolgen, und die Agglutinationsreaktion in Mikrottestplatten für die HLA-Typisierung durchgeführt wird. Die Zugabe von 2000 Testzellen in 1 μ l Suspension zu 2–4 μ l Eluat war ausreichend, um eindeutige mikroskopisch ablesbare Reaktionen zu erzielen. Die Stärke der Agglutinationsreaktion in Mikrottestplatten wurde definiert und mit herkömmlichen Methoden verglichen. Zahlreiche Vorunter-

¹Gegenwärtige Adresse: Institut für Pathologie, Leopoldina Krankenhaus,
D-8720 Schweinfurt

Sonderdruckanfragen an: J. Lötterle (Adresse siehe oben)

suchungen zur Sensitivitätssteigerung der Agglutinationsreaktion und zur Einstellung des Test-Systems wurden durchgeführt und werden ausführlich beschrieben.

Schlüsselwörter: Absorptions-Elutions-Test – Blutspuren – Mikromethode – Blutgruppenantigene

Die für den Nachweis erythrozytärer Antigene erforderliche Größe einer Blutspur ist – neben der Zahl der Antigen determinanten pro Erythrozyt – vor allem von der gewählten Methode abhängig. Beim gebräuchlichen Absorptions-Elutions-Test (Kind 1960a; Kind 1960b) mit seinen verschiedenen Modifikationen (Übersicht bei Schleyer und Oepen 1977; Denault et al. 1980; Dodd und Lincoln 1982; Gaensslen et al. 1985) wird auch aus praktischen Gründen bei den einzelnen Reaktionsschritten als Mindestmenge „ein Tropfen“ einer Flüssigkeit, also ein Volumen von 20–30 μl , eingesetzt.

Bei Verwendung von Mikrottestplatten für die HLA-Typisierung dagegen kann eine serologische Reaktion schon in 2–5 μl Flüssigkeit durchgeführt werden. Beim Einsatz dieser Platten für den Absorptions-Elutions-Test wäre ein Volumen von wenigen μl zum Nachweis des eluierten Antikörpers ausreichend, wodurch letztlich eine Verringerung der Spurengröße zu erwarten ist.

Deshalb sollte in der vorliegenden Untersuchung der Einsatz von Mikrottestplatten für die Blutgruppenuntersuchung an Spuren geprüft werden.

Material und Methode

1. Agglutinationsreaktion in Mikrottestplatten

Je zwei Anti-A-, -B-, -H-, -C-, -c-, -D-, und -E-Reagenzien wurden in die Kavitäten von Mikrottestplatten in geometrischer Verdünnung in 1- μl -Portionen unter Decköl eingebracht. Dann wurden jeweils ca. 2000 der entsprechenden Testzellen in 1 μl Suspension zugegeben. Für die ABH-Reagenzien wurden in isotoner NaCl-Lösung resuspendierte stabilisierte Erythrozyten (Sangocell, Behringwerke) verwendet.

Für die Rh-Seren wurden frisch entnommene und papainisierte Erythrozyten in isotoner NaCl-Lösung eingesetzt, die zur Hemmung etwaigen Bakterienwachstums mit einer geringen Menge Natriumacid versetzt worden waren. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für die ABH- und bei 37°C für die Rh-Antikörper. Die Reaktionen wurden während 24 h wiederholt unter dem umgekehrten Mikroskop mit Phasenkontrast-Einrichtung bei 100facher Vergrößerung abgelesen.

Bei allen Seren trat in den niedrigen Verdünnungsstufen neben der Agglutinationsreaktion ein optisches Phänomen auf, welches wie eine teilweise Verschmelzung mehrerer Zellen aussah (Abb. 1c, d und e). Die Zellmembran zwischen zwei flächig aneinanderliegenden Zellen schien dabei aufgehoben zu sein. Dieses Phänomen konnte bei zunehmender Reaktionsdauer auch bei verschiedenen stärker verdünnten Seren festgestellt werden. Es zeigt sich, daß bei langer Inkubationszeit (4–24 h) das „Verschmelzungsphänomen“ die führende Veränderung der Erythrozyten darstellte.

Die Reaktionsstärken sind in Abb. 1a–e definiert. Eine Agglutination auch zahlreicher Zellen ohne „Verschmelzung“ wurde als \pm -Reaktion gewertet (Abb. 1b). Als 1+-Reaktion wurde ein Befund definiert, bei dem – neben Agglutinaten – mehr als die Hälfte der Erythrozyten das „Verschmelzungsphänomen“ zeigten. Eine 2+-Reaktion lag dann vor, wenn fast alle Zellen das „Verschmelzungsphänomen“ und daneben größere Agglutinate aufwiesen. Bei der

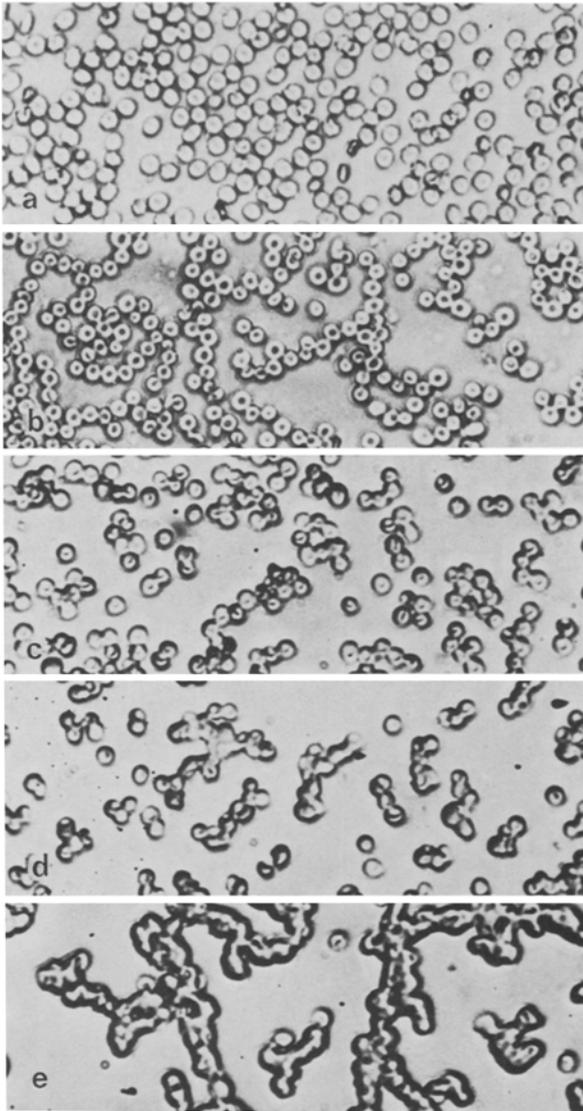


Abb.1a-e. Definition der Stärke der Agglutinationsreaktion in der Mikrotestplatte. Von oben nach unten: negative Reaktion, \pm -Reaktion, 1+-Reaktion, 2+-Reaktion und 3+-Reaktion

3+-Reaktion mußten zum überwiegenden Teil Verschmelzungen von mehr als 20 bis 50 Zellen vorliegen. Eine 4+-Reaktion, die durch ein einzelnes zusammenhängendes Agglutinat mit „Verschmelzung“ von Zellen charakterisiert war, wurde nur vereinzelt beobachtet.

Eine Agglutinationsförderung der Erythrozyten war durch Anwendung eines Vibrationsrüttlers (50 Aktionen/s) an einer Längs- und Breitseite der Mikrotestplatte bei den ABH-Reagenzien möglich. Als besonders günstig erwies sich eine Vibration der Mikrotestplatten zur Klärung von \pm -Reaktionen, bei denen es manchmal zur Auflösung, häufiger aber zur Verstärkung der Agglutinate kam. Bei den Seren zur Testung des Rh-Systems zeigte die Anwendung des Vibrationsrüttlers keinen veränderten Effekt.

Tabelle 1. Zur Agglutinationsverstärkung bei der Mikrotestplattenmethode untersuchte Supplemente und Enzyme

Supplemente	Enzyme
1) Rinder-Albumin, 30%ig und 1%ig	1) Neuraminidase (<i>Vibrio cholera comma</i> , Behringwerke)
2) Antikörperfreies AB-Serum, 30%ig	2) Bromelin (Biotest)
3) Ficoll (MG 400000, Pharmacia), 1% in physiologischer Kochsalzlösung	3) Pronase (Fresenius)
	4) Papain (Biotest)

2. Agglutinationsverstärkung

Da die agglutinationsverstärkende Wirkung von Enzymen und Supplementen in Mikrotestplatten nicht bekannt war, wurden die in Tabelle 1 angegebenen Enzyme und Supplemente jeweils getrennt und in Kombination für die Antigene des AB0- und Rh-Systems an frischen Testzellen untersucht. Die Enzyme wurden nach Vorschrift angewendet. Für die Supplemente wurden die bei Blutspurenuntersuchungen üblichen Konzentrationen eingesetzt. Bei den ABH-Antigenen ergaben die Enzyme im Durchschnitt eine Verstärkung um ein bis zwei Titerstufen und die Supplemente eine Verstärkung um etwa eine Stufe, so daß auch aus Gründen der Praktikabilität eine Supplementzugabe als ausreichend erschien. Mit 30%igem antikörperfreiem AB-Serum ergab sich eine besonders gute Ablesbarkeit der Reaktionen, so daß dieses Supplement für den Absorptions-Elutions-Test später routinemäßig eingesetzt wurde. Für das Rh-System erbrachte Papain eine wesentlich größere Reaktionsverstärkung als die übrigen Enzyme. Durch Suspension der Testzellen in 1%iger Rinderalbuminlösung wurde noch eine weitere geringe Agglutinationsverstärkung erreicht, so daß später nur noch papainisierte Erythrozyten in 1%iger Rinderalbuminlösung verwendet wurden.

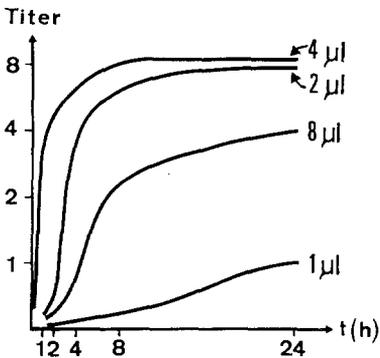


Abb. 2. Abhängigkeit der Reaktionsstärke vom eingesetzten Volumen an Antiserum (gleiche Antikörper-Konzentration) im Mikroverfahren

3. Mengenverhältnis von Testzellen und Antiserum

Wegen der geringen Ausmaße der Bodenfläche der Reaktionskammern von Mikrotestplatten können für die Agglutinationsreaktion maximal ca. 5000 Testzellen eingesetzt werden. Eine optimale Ablesbarkeit bei gleicher Reaktionsstärke ergab sich bei ca. 2000 Testzellen. Bei dieser Zahl in 1 µl Flüssigkeit suspensierter Erythrozyten war zu prüfen, welche Antikörperkonzentration in welcher Flüssigkeitsmenge noch deutliche Agglutinationen ergeben würde. Dazu wurden Titerbestimmungen mit 1, 2, 4 und 8 µl entsprechend verdünntem Anti-A- und -B-Serum und je 1 µl Testerythrozytensuspension mit ca. 2000 Zellen durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 4, 8 und 24 h abgelesen. In Abb. 2 sind die Mittelwerte der Einzelergebnisse angegeben. Man erkennt, daß bei einem Volumen von 2 oder 4 µl Antiserum die stärkste Agglutinationsreaktion auftrat, so daß bei der vorgegebenen

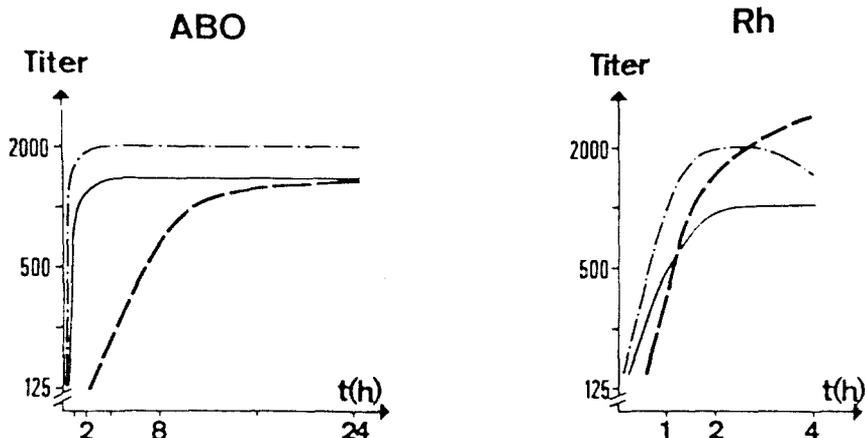


Abb. 3. Vergleichende Titrationskurven. Konventionelle Verfahren – Mikrotestplattenmethode. - - - - Röhrenmethode (mit Zentrifugation); — — — Mikrotestplatte; — — — Tüpfelplatte

Erythrozytenzahl für die Testphase des Absorptions-Elutions-Tests mindestens 2, höchstens aber 4–6 μl Eluat in die Mikrotestplatte zu überführen waren.

4. Vergleichende Titrations

Mikrotestplatte – konventionelle Verfahren. In vergleichenden Titrations wurde die Sensitivität der Agglutinationsreaktion nach den unter 2. und 3. ausgestesteten optimalen Reaktionsbedingungen für Mikrotestplatten mit den Reaktionen von gebräuchlichen Makromethoden (Röhrenmethode mit Zentrifugation und Plattenmethode) verglichen. Bei den Makromethoden wurde zur Erreichung höchster Sensitivität (Lincoln und Dodd 1973) eine 0,1%ige Testzellsuspension mit jeweils den gleichen Enzymen bzw. Supplementen wie bei der Mikrotestplatte eingesetzt. Die Röhren wurden vor der Ablesung zentrifugiert und in der Zwischenzeit bei Zimmertemperatur (ABO-System) bzw. 37°C (Rh-System) inkubiert. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte in der feuchten Kammer bei entsprechenden Temperaturen.

In Abb. 3 sind die Mittelwerte der Ergebnisse der Vergleichstitrationen angegeben. Man erkennt, daß die Agglutinationsreaktion in Mikrotestplatten generell langsamer verläuft als bei den anderen Methoden und daß nach entsprechender Reaktionsdauer im ABO-System mit der Röhrenmethode und im Rh-System mit der Mikrotestplatten-Methode die stärksten Reaktionen erzielt wurden.

5. Handhabung kleiner Blutspuren in geringen Flüssigkeitsmengen

Da sich eine antikörperhaltige Flüssigkeitsmenge von 2 μl in der Mikrotestplatte als sinnvolles Mindestvolumen erwiesen hatte, war die Menge an Flüssigkeit, in die eluiert werden sollte, entsprechend zu begrenzen. Für solche geringen Volumina erwiesen sich Reaktionsgefäße für das System Beckman (sogenannte „Beckman-Tubes“) mit 0,4 ml Inhalt als besonders geeignet. Um die Verdunstung der geringen Flüssigkeitsmengen zu verhindern, wurden alle Reaktionen unter Mineralöl durchgeführt. In den Beckman-Tubes konnten auch extrem kleine Spurenmengen, z. B. ein 0,5 mm langer blutbefleckter Faden mit 0,4 mm Durchmesser, gut in das Antiserum plaziert und dort auch wieder aufgefunden werden. Wegen der geringen Ausmaße der Röhrenkuppe war die Größe der Spuren auf einen 2,5 mm langen Faden oder eine Stanze von blutbeflecktem Stoff mit einem Durchmesser von 1,5 mm zu begrenzen.

Das Beschicken der Beckman-Tubes mit Antiserum erfolgte mit einer 6fach-Dispensorspritze (Firma Hamilton, Modell 1725). Pro Hub wurden 5 μl Antiserum eingebracht. Decköl (atoxisches Mineralöl, Firma Biotest, Art.-Nr. 811080) wurde mit einer herkömmlichen

Spritze zugegeben. Durch kurze Zentrifugation wurde das Decköl auf das Antiserum geschichtet. Die so vorbereiteten Tubes konnten über mehrere Monate bei -24°C ohne Aktivitätsverlust der Antiseren gelagert werden.

Zur Antikörper-Absorption wurde die Spur an den Innenrand des Röhrchens oder auf die das Antiserum bedeckende Ölschicht gebracht; anschließend wurde das Beckman-Tube für etwa 1 min bei 2000 g zentrifugiert. Dann befand sich die Blutspur stets vollständig im Antiserum; Ölanhaftungen an der Spur traten wegen der hohen Beschleunigung während des Zentrifugierens nicht auf. Der Wasch- und Elutionsvorgang konnte im gleichen Gefäß abgeschlossen werden. Eine sogenannte Cornwall-Spritze (Schütt-Laboratoriumseinrichtungen, Göttingen, Best.-Nr. 7.50000 2c) eignete sich zur Zugabe von isotoner Kochsalzlösung während der Waschphase. Zum Absaugen von Flüssigkeit wurde eine abgeschliffene Kanüle mit 1,4 mm Außendurchmesser verwendet, deren Spitze mit einer dünnen Gaze aus Kunststoff überzogen war (monofiles Gewebe Polyman PES 58/41 der Schweizerischen Seidengaze Fabrik AG, Zürich). Die Entnahme oder Zugabe kleinster Flüssigkeitsmengen erfolgte mit einer 25- μl -Spritze (Firma Hamilton, Nr. 80430702 RN mit Kanüle RN/P/22 S (1) mit Dosiereinrichtung PB 600/1), die pro Hub 0,5 μl abgab. Vor der Zugabe von Flüssigkeit, in die eluiert werden sollte, wurde zunächst mit einem Tropfen Decköl überschichtet. Dann wurden die Tubes für 1 min bei 2000 g zentrifugiert, damit sich die im Röhrchen befindlichen geringen Flüssigkeitsmengen in der Kuppe ansammelten. Anschließend wurde auf ein geschätztes Volumen von 5 μl aufgefüllt und es erfolgte die thermische Elution im Wasserbad bei 56°C .

6. Testverfahren

ABO-System. Die Spuren wurden 12–18 h lang bei 4°C mit 5 μl der vorher austitrierten Testreagenzien inkubiert, bei Anti-A und Anti-B je 8mal und bei Anti-H 6mal bei 4°C gewaschen und anschließend 15 min lang bei 56°C eluiert. Die noch erwärmten Eluate wurden in Mikrottestplatten eingebracht. Die Inkubation mit den frischen, in 30%igem AB-Serum aufgeschwemmten Testzellen betrug mindestens 3 h bei Raumtemperatur. Dann wurden die Agglutinate mikroskopisch abgelesen. Eine zweite Ablesung der Reaktionen war bei im Kühlschrank aufbewahrten Testplatten noch etwa 24 h lang möglich.

Rh-System. Vorversuche zeigten, daß zur sicheren Bestimmung eines Antigens Fäden von 2,5 mm Länge erforderlich sind und daß nur durch gleichzeitige Testung mit zwei Antiseren verschiedener Herkunft eindeutige Ergebnisse zu erzielen waren. Die Inkubationszeit der Spuren mit 5 μl Antiserum betrug zwischen 12 und 18 h bei 37°C . Zur Verhinderung von Bakterienwachstum wurden die Antiseren mit wenig Natriumacid versetzt. Der Waschvorgang wurde bei 4°C je 6mal wiederholt, dann wurde 15 min lang bei 56°C eluiert. Die noch erwärmten Eluate wurden entnommen und mit ganz frischen papainisierten Testzellen in 1%iger Rinderalbuminlösung, die wenig Natriumacid enthielt, für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Ablesung war dann 1–2 h lang möglich.

Ergebnisse

In Tabelle 2 und 3 sind exemplarisch die Ergebnisse der Absorptions-Elutions-Untersuchungen an 10 Blutspuren dargestellt. Die in den Abbildungen angegebene Verdünnung der Reagenzien war in Vorversuchen als optimal ausgetestet worden. Zum Nachweis der Antigene A und B wurden jeweils 1 mm lange blutbefleckte Stücke eines 0,4 mm starken Baumwollfadens eingesetzt; der Nachweis des Antigens H wurde mit einer 1,5 mm großen Spurenstanze aus Baumwollstoff geführt. Zum Nachweis der Antigene des Rh-Systems wurden jeweils 2,5 mm lange Fadenstücke verwendet. Das Blutspurealter betrug etwa 20 Wochen.

Tabelle 2. AB0-System. Versuchsergebnisse mit dem Absorptions-Elutions-Test. Angabe der Stärke der Agglutinationsreaktion (0 \triangleq negative Reaktion, 1 \triangleq 1+-Reaktion usw.)

Blutgruppe der Spur	Anti-A	Anti-B	Anti-H
	Fresenius Ch. 6025	Fresenius Ch. 6024	Behringwerke C. 012544B (Laburnum alpinum)
	Verdünnung 1:4	Verdünnung 1:2	nativ
A ₁	2-3	0	0
0	0	0	3
B	0	3	0
0	0	0	3
B	0	3	1
A ₁	2	0	0
B	0	2-3	0
A ₂	1-2	0	0
B	0	3	0
A ₂ B	2-3	3	0

Tabelle 3. Rhesus-System. Versuchsergebnisse mit dem Absorptions-Elutions-Test. Angabe der Stärke der Agglutinationsreaktion (0 \triangleq negative Reaktion, 1 \triangleq 1+-Reaktion usw.)

Rhesus- Phänotyp der Blutspur	Anti-Rhesus-Serum							
	C		c		D		E	
	Ortho Lot CS 140 A, nativ	BAG Lot C 129-1, Verd. 1:2	BAG Lot c 124-1, nativ	Gö- decke Ch. 20415, nativ	BAG Lot D 155-5, nativ	Gö- decke Ch. 20020, Verd. 1:2	BAG Lot E 126-1, nativ	Gö- decke Ch. 20317, nativ
CcD.Ee	2	2	3	2	3	2	2	3
ccD.EE	0	0	3	3	3	2	1	3
ccddee	0	0	3	3	0	±	0	0
CCD.ee	2	3	0	0	2	3	0	±
ccddee	0	0	2	3	±	0	0	0
CcD.ee	2	3	2	3	3	2	0	±
CCD.ee	3	3	0	±	3	2	0	0
CcD.ee	1	3	3	3	2	2	0	0
CcD.ee	3	3	2	3	2	3	0	0
ccD.Ee	0	0	2	3	2	1	2	2

Diskussion

Für den Nachweis des AB0-Systems an Blutspuren wird die Methode von Howard und Martin (1969), bei der ca. 3 mm lange Fadenstücke ausreichend sind, allgemein als das empfindlichste Verfahren angesehen (Culliford 1971; Kind

und Lang 1976). Dieses Verfahren soll auch der Ammoniak-Extraktionsmethode (Kind and Cleevly 1969; Schwerd und Fauner 1980) in bezug auf den Materialverbrauch überlegen sein. Die hier vorgeschlagene Methode stellt somit eine materialsparende Alternative zu den bislang gebräuchlichen sensitivsten Verfahren des Absorptions-Elutions-Tests dar.

Bei der Untersuchung der Antigene A und B war es bei Anwendung der beschriebenen Methode nicht erforderlich, daß die Spur sehr stark mit Blut durchtränkt war. Auch schwach gefärbte Spuren ergaben klare Resultate. Selbst Fadenspuren von weniger als 1 mm Größe wurden erfolgreich untersucht; allerdings waren diese Spuren kaum mehr zu handhaben und zerlegten sich gelegentlich bei den zahlreichen Waschvorgängen, wodurch Spurenmaterial verloren ging.

Zum Nachweis des Antigens H ist generell die etwa 10fache Spurenmenge wie für den Nachweis der Antigene A und B einzusetzen, worauf schon in den ersten Untersuchungen mit dem Absorptions-Elutions-Test (Outteridge 1962) hingewiesen wurde.

Bei der Rh-Untersuchung mit dem Absorptions-Elutions-Test konnte durch ein Antiserum allein nicht immer ein genügend differenzierendes Ergebnis erreicht werden (Tabelle 3). Durch den Einsatz von zwei Testseren unterschiedlicher Herkunft war eine wesentliche Steigerung der Aussagekraft der Methode möglich. Die benötigte Spurengröße von ca. 5 mm blutbeflecktem Faden pro Antigen entspricht etwa dem Spureneinsatz anderer Untersucher, die besonders sensitive Methoden unter Verwendung eines Antiserums beschrieben (Rand und Kloosterman 1983; Lincoln und Dodd 1983).

Nicht jedes im direkten Verfahren gut reagierende Anti-Rh-Serum zeigte sich für den Absorptions-Elutions-Test geeignet, so daß jeweils mehrere Seren ausgetestet wurden. Auch sollten die Testzellen das zu untersuchende Merkmal homozygot tragen, da – anders als im AB0-System – die Zahl der Rh-Determinanten vom Genotyp abhängig ist. Entsprechende Testzellen zum Nachweis des Antigens E sind allerdings selten.

Viele Anti-Rh-Seren enthalten schwache Begleitantikörper, die in der Papaintechnik bei langer Inkubationszeit gelegentlich einen recht hohen Titer zeigen. Deswegen muß der Phänotyp des Erythrozytenspenders entsprechend ausgewählt werden. So empfiehlt es sich, zum Nachweis des Antigens D nur Testzellen zu verwenden, die das Antigen C nicht aufweisen, da fast alle Anti-D-Seren C-Begleitantikörper enthalten. Da der am besten geeignete (für D im Regelfall homozygote) Phänotypus ccD.EE selten ist, können zum D-Nachweis auch ccD.Ee-Testzellen eingesetzt werden.

Von besonderer Wichtigkeit war bei der Rh-Untersuchung, daß die Testzellen nicht älter als 8–12 h sind. Papain ist das Enzym der Wahl zur Sensitivitätssteigerung; orientierende Absorptions-Elutions-Untersuchungen, bei denen die Testzellen mit anderen Enzymen behandelt worden waren, ergaben wesentlich schlechtere Ergebnisse.

Versuche zur Sensitivitätssteigerung mit einem Medium geringer Ionenstärke („LISS“; Loew und Messeter 1974) ergaben bei der Rh-Untersuchung zahlreiche falsch positive Reaktionen. Dieses Ergebnis steht mit den Befunden von Rand und Kloosterman (1983) in Einklang; andere Autoren haben dagegen

über gute Erfolge mit diesem Medium berichtet (McDowall et al. 1978; Lincoln und Dodd 1983).

Die Ablesung der Mikrotestplatten im Mikroskop mit Strahlengang von oben (und Phasenkontrast-Einrichtung!) ist besonders bequem; steht ein solches Mikroskop nicht zur Verfügung, kann eine Ablesung auch im konventionellen Mikroskop bei 10facher Objektivvergrößerung erfolgen, wobei der Deckel der Mikrotestplatte abgenommen wird. Je nach Bauart des Mikroskops kann jedoch schon bei dieser Vergrößerung der Einsatz eines „long-distance“-Objektivs erforderlich werden.

Literatur

- Culliford BJ (1971) The examination and typing of bloodstains in the crime laboratory. US Department of Justice, Government Printing Office, Washington
- Denault GC, Takimoto HH, Kwan QY, Crim D, Pallos A (1980) Detectability of selected genetic markers in dried blood on aging. *J Forensic Sci* 25:479–498
- Dodd BE, Lincoln PJ (1982) The use of antigen-antibody techniques in forensic serology. In: Bell CA (ed) A seminar on antigen-antibody reactions revisited. American Association of Blood Banks, Washington, pp 223–239
- Gaensslen RE, Lee HC, Pagliaro EM, Bremser MS (1985) Evaluation of antisera for bloodstain grouping. I. AB0, MN and Rh. *J Forensic Sci* 30:632–654
- Howard HD, Martin PD (1969) An improved method for AB0 and MN grouping of dried bloodstains using cellulose acetate sheets. *J Forensic Sci Soc* 9:28–30
- Kind SS (1960a) Absorption-elution grouping of dried blood smears. *Nature* 185:397–398
- Kind SS (1960b) Absorption-elution grouping of dried blood-stains on fabrics. *Nature* 187:789–790
- Kind SS, Cleevely RM (1969) The use of ammoniacal bloodstain extracts in AB0 grouping. *J Forensic Sci Soc* 9:131–134
- Kind SS, Lang BG (1976) Some observations on the ammoniacal extraction method in blood stain grouping and its comparison with other extractive and non-extractive methods. *J Forensic Sci Soc* 16:47–54
- Lincoln PJ, Dodd BE (1973) An evaluation of factors affecting the elution of antibodies from blood stains. *J Forensic Sci Soc* 13:37–45
- Lincoln PJ, Dodd BE (1983) The successful application of AB0, Rh, Ss, Kell, Duffy and Kidd red cell antigens to the identification of blood-stains in casework. Referate 10. Internationaler Kongress für forensische Blutgruppenkunde, München, S 179–184
- Löw B, Messeter L (1974) Antiglobulin test in low-ionic strength salt solution for rapid antibody screening and cross-matching. *Vox Sang* 26:53–61
- McDowall MJ, Lincoln PJ, Dodd BE (1978) Increased sensitivity of tests for the detection of blood group antigens in stains using a low ionic strength medium. *Med Sci Law* 18:16–23
- Outteridge RA (1962) Absorption-elution grouping of modifications and development of bloodstains. *Nature* 194:385–386
- Rand SP, Kloosterman A (1983) Rhesus grouping from dried bloodstains, a critical evaluation of two forensic science laboratories. Referate 10. Internationaler Kongress der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde, München, S 185–190
- Schleyer F, Oepen I (1977) Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung. Schmidt-Römhild, Lübeck
- Schwerd W, Fauner L (1980) Zum Nachweis von AB0-Substanzen in Spurenmaterial mit der Absorptions-Elutions-Methode. *Arch Kriminol* 165:143–147

Eingegangen am 1. Oktober 1985