

HLA-Typisierung von Blutspuren. Untersuchungen mit einem Absorptionstest

Vorläufige Mitteilung

J. Lötterle

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

HLA-Typing of Bloodstains. Investigations with an Absorption Test

Preliminary Report

Summary. Report on an absorption test, in which the antigens HLA-A1, -A3, -A9, -B7, and -B8 were investigated with four different antisera each. 0.5 mg bloodstain (on cotton thread; age: between 7 and 21 days) was added to 5 µl pretitrated antiserum. After incubation (14 h at 4°C) it was tested whether absorption had occurred or not: 1 µl antiserum was placed in a microtest plate and 1 µl target lymphocyte suspension was added. The further test followed the NIH-technique. The presence of an antigen is shown by a reduction of the complement-mediated cytotoxicity.

The results show that cross reactions play a more important role than in the NIH-test. In our investigations over 90% of the HLA-antigens were typed correctly.

Key words: Bloodstains, HLA typing – HLA typing, bloodstains

Zusammenfassung. Es wird ein Absorptionstest beschrieben, bei welchem die Antigene HLA-A1, -A3, -A9, -B7 und -B8 mit jeweils vier verschiedenen Antisera untersucht werden. Zu 5 µl entsprechend austitriertem Antiserum werden 0,5 mg Blutspur (auf Baumwollfaden; Spurenalter: zwischen sieben und 21 Tagen) gegeben. Nach etwa 14stündiger Inkubation bei 4°C wird untersucht, ob eine Absorption stattgefunden hat. 1 µl des Antisera wird in eine Mikrotestplatte gebracht, und 1 µl Testlymphozytensuspension wird zugegeben. Der weitere Untersuchungsablauf entspricht dem NIH-Test. Beim Vorliegen des entsprechenden Antigens war eine Verminderung der durch Komplement vermittelten zytotoxischen Reaktion zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen, daß Kreuzreaktionen eine weitaus größere Rolle als bei dem NIH-Test spielen. Eine richtige Zuordnung der HLA-Antigene war in mehr als 90% der Fälle möglich.

Schlüsselwörter: Blutspuren, HLA-Typisierung – HLA-Typisierung aus Blutspuren

Antigen	Phänotypfrequenz
HLA-A1	28,1%
HLA-A3	30,2%
HLA-A9	20,5%
HLA-B7	27,0%
HLA-B8	19,2%

Tabelle 1. Phänotypfrequenz der untersuchten HLA-Antigene in der deutschen Bevölkerung (Albert 1975)

Über den forensischen Nachweis von HLA-Antigenen in Blutspuren durch Absorptionsuntersuchungen berichteten als erste Rittner und Wayawuth (1974, 1975). Die Autoren legten Ergebnisse mit dem Mikrozytotoxizitätstest und dem Komplementfixationstest vor. Seit diesen ersten Untersuchungen ist die Problematik der HLA-Typisierung von Blutspuren lediglich von zwei weiteren Autoren (Newall 1979; Hodge et al. 1979) aufgegriffen worden. Während Rittner und Wayawuth die meisten der damals bekannten HLA-Antigene in ihre Untersuchungen einbezogen, wurden von Hodge et al. lediglich das Antigen HLA-A1, von Newall HLA-A2 und HLA-B5 untersucht.

Die Untersuchungsmethoden von Newall sowie von Hodge et al. unterscheiden sich nicht wesentlich, obwohl sie unabhängig voneinander entwickelt worden waren. Die Ergebnisse der beiden Autoren ließen es sinnvoll erscheinen, ihre Arbeitsvorschriften weitgehend unverändert zu übernehmen und den Absorptionstest auf weitere HLA-Antigene auszudehnen. Die Untersuchungen wurden auf gut definierte und häufig vorkommende Antigene beschränkt (Tabelle 1), welche mit jeweils vier verschiedenen, im NIH-Test (Terasaki und Park 1976) verlässlich reagierenden Anti-HLA-Seren getestet werden sollten. Allein die Untersuchung dieser fünf Antigene würde eine Differenzierung von Blutspuren ermöglichen, die von keinem bislang dazu verwendeten Blutgruppensystem erreicht wird.

Material und Methode

Für die Untersuchungstechnik sollten möglichst viele Schritte der NIH-Tests unverändert übernommen werden.

Testseren. Tabelle 2 gibt eine Aufstellung der verwendeten Testseren (unverdünnt eingesetzt) und ihrer Reaktionsweise im Lymphozytotoxizitätstest. Bei der Austestung und bei den Absorptionsuntersuchungen wurde die gleiche Charge Kaninchenkomplement (Pool von 200 Tieren, Lagerung bei -80°C) verwendet.

Gebrauchsverdünnung für den Absorptionstest. Zur Ermittlung der Verdünnung, bei welcher 1 µl Testserum noch ca. 2000 in 1 µl Hanks' Lösung suspendierte Testlymphozyten zu 90–100% lysierte, wurden Verdünnungsreihen der Seren hergestellt und mit den Lymphozyten jeweils mehrerer Personen der entsprechenden Spezifität getestet. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Titrationsuntersuchungen für das Antigen HLA-A1 exemplarisch angegeben.

Testlymphozyten. Die Lymphozyten von zwei Spendern mit dem HLA-Typ A3, A25; B7, B12 und A1, Aw23; B8, B12 wurden während der Versuchsreihen aus jeweils frisch entnommenen, defibrinierten Blutproben über einem Ficoll-Isopaque-Gradienten separiert und innerhalb der ersten 6 Std nach der Blutentnahme verwendet. Das Waschen und Aufbewahren der Zellen erfolgte in einer Mischung aus Hanks' Lösung und Trispuffer (pH 7,4) im Verhältnis 1:1.

Tabelle 2. Die im Absorptionstest verwendeten HLA-Antiseren und ihre Reaktionsweise im NIH-Test

Spezifität	Testserum	Panel	Reaktionen				
			++	falsch		--	
			+	-			
Anti-HLA-A1	A	Biotest 5036	100	27	2	0	71
	B	Behring 0105	100	27	1	0	72
	C	Gamel Pool ^a	100	25	0	2	73
	D	Würzburg 950109 ^a	62	16	1	0	50
Anti-HLA-A3	A	Biotest 517067	100	26	1	0	73
	B	Würzburg 950112 ^a	90	12	1	4	73
	C	Haas 815174 ^a	100	19	1	7	73
	D	Würzburg 153403 ^a	90	9	0	1	80
Anti-HLA-A9	A	Behring 20019	75	10	1	1	63
	B	Behring 0902	100	25	1	0	74
	C	Biotest 2116	100	25	1	0	74
	D	Bartes 10.77 ^a	100	25	0	0	75
Anti-HLA-B7	A	Behring 17497	75	23	5	0	47
	B	Fresenius 2260	100	21	1	2	76
	C	Würzburg 950115 ^a	75	21	1	1	52
	D	Würzburg 150316 ^a	90	12	1	1	76
Anti-HLA-B8	A	Würzburg 516942 ^a	90	11	0	3	76
	B	Gelbmann 388/3 ^a	100	23	1	0	76
	C	Öller 3/75 ^a	100	23	0	0	77
	D	Ladner 11/75 ^a	100	23	0	0	77

^a Frau Dr. med. Gossrau, Würzburg, und Herrn Prof. Dr. med. Mayr, Wien, bin ich für die Überlassung von Anti-HLA-Seren sehr zu Dank verpflichtet

Tabelle 3. Titration der Anti-HLA-A1-Seren gegen drei HLA-A1-positive Lymphozyten

Testzellen	Anti-HLA-A1-Seren									
	Biotest 5036					Behring 0105				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6
Titer	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6
A1, Aw24; B8, B13	5	5	4	4	3	5	5	4	4	3
A1, A2; B5, B8	5	2	2	1	1	5	4	1	1	1
A1, Aw23; B8, B12	5	5	3	2	1	5	5	3	3	1
Gamel Pool					Wü 950109					
Titer	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6	1:1	1:2	1:3	1:4	1:6
A1, Aw24; B8, B13	5	4	4	3	1	5	5	4	3	2
A1, A2; B5, B8	4	1	1	1	1	5	5	4	3	2
A1, Aw23; B8, B12	5	5	4	2	1	5	5	5	4	2

Blutspuren. Baumwollfäden von 2 m Länge wurden locker aufgerollt und in ein Uhrglas gelegt; anschließend wurde frisch abgenommenes, ungeronnenes Venenblut aufgetropft. Nach etwa 1 Std wurden die Fäden zum Trocknen aufgehängt und anhaftende Blutkoagel abgestreift. Im Anschluß an das Trocknen erfolgte die Lagerung der Spuren unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur. Das Spurenalter betrug zwischen sieben und 21 Tagen.

Tabelle 4. Untersuchungsablauf

5 µl Anti-HLA-A1-Serum Titer 1:1	0,5 mg Blutspur HLA-A1-positiv	Serum wird absorbiert	Testzellzugabe	Keine Zytolyse
	0,5 mg Blutspur HLA-A1-negativ	Serum wird nicht absorbiert	Testzellzugabe	Zytolyse
Im „Beckman Tube“	Zugabe der Spur	Absorptionsphase 14 h bei +4°C	NIH-Test mit HLA-A1-positiven Testlymphozyten	

Testablauf (Tabelle 4)

Von 25 Blutspuren wurden Untersuchungen durchgeführt.

a) *Absorptionsphase:* 3 cm bluibenetzter Faden (entsprechend 0,4–0,6 mg Bluttrockengewicht) wurde zu 5 µl Antiserum in ein „Reaktionsgefäß für Mikroliterbestimmungen“ (sog. „Beckman Tube“, Inhalt 0,4 ml) gebracht. Um ein Verdunsten des Antiseraums zu verhindern, wurde mit zwei Tropfen atoxischem Mineralöl überschichtet. Nach kurzem Zentrifugieren des „Beckman Tube“ bei 3000–4000 g war der Faden ganz mit Antiserum benetzt. Die Spur wurde zwischen 12 und 16 Std bei Kühlenschranktemperatur inkubiert.

b) *Zytotoxizitätstest:* Mit einer 25-µl-Spritze wurde das verbliebene Antiserum aus dem Mikrolitergefäß entnommen und in Portionen von 1 µl in Mikrotestplatten verbracht. Dann erfolgte die Zugabe von ca. 2000 entsprechenden Testlymphozyten in 1 µl Suspension; die weiteren Schritte entsprachen dem NIH-Test, wobei auf exakte Einhaltung der Reaktionszeiten und der Inkubationstemperatur während der Komplementeinwirkung (23°C) besonderer Wert gelegt wurde. Die Bewertung der Reaktionen erfolgte nach einer vierstufigen Skala (Tabelle 5).

Lysierte Zellen	Bewertungsstufe
bis 10%	1 (negativ)
11%–30%	2
31%–50%	3
51%–80%	4
über 80%	5

Tabelle 5. Bewertung der zytotoxischen Reaktion

Ergebnisse

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Absorptionsuntersuchungen angegeben.

Zwischenstufen bei der Bewertung des Grades der Zytolyse (z. B. 2/3) waren erlaubt und wurden auch häufig verwendet. War kein eindeutiges Ablesen möglich (z. B. bei Verschmutzungseffekten), wurde der Bewertungsgrad 0 angegeben. Für jedes Antigen einer Spur wurden die Bewertungen aus Tabelle 6 addiert und zu ganzen Zahlen aufgerundet (Bewertungssummen zwischen 4 und 20). Die Ergebnisse sind in Abb. 1 angegeben. In den zehn Fällen, in denen für ein Antigen die Reaktionen mit drei Antisera vorlagen, wurden die Ergebnisse interpoliert. Lagen für ein Antigen nur von zwei Antisera Ergebnisse vor, dann blieb dies in Abb. 1 unberücksichtigt.

Tabelle 6. Ergebnis der Absorptionsuntersuchungen

HLA-Typ der Blutspur	Anti-HLA-				A3 Serum				A9 Serum				B7 Serum				B8 Serum			
	A1 Serum			A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
A1, A3; B7, Bw49	1	1	1/2	1	1	1	1/2	1	1/2	2/3	5	4/5	2	1/2	1	1	4	4/5	3	3/4
A3, Aw30+w31; B17, B18	1	3	1	2	2	1/2	3	1/2	1	3	4/5	3/4	0	3	0	3	2/3	4/5	4	4
A2, A11; B17, Bw35	3	3	3	3/4	1	3	1	3	3	4	4/5	3	4	3	0	1/2	0	5	4/5	5
A2; B14, B27	4	3	3	3	4	2/3	3	3	3	5	5	5	3	4	3	3	4	5	5	3
A1, A2; B7, B8	2	1	1	1/2	2	2	2	2	1	1/2	5	3	1	1	1/2	1	1	1	1	1
A1, A2; B5, B8	1	1	1	1	2	1	4	3	1	1	5	5	4/5	2	2/3	2/3	1	1/2	1	1
A1; Aw24; B8, B13	1	1	1/2	1	0	2	3/4	2/3	1/2	1	4/5	1	4	3	4/5	4/5	1	1	1	1
A2; B15, B40	4	3/4	2	2	5	4/5	4/5	0	0	3/4	5	3	2	2/3	4/5	0	4	5	4/5	5
A2; B40	5	4/5	2/3	4/5	3	1	3	2	3/4	5	3	3	4	1/2	2/3	4	4/5	4/5	4	4
A3, A25; B7, B12	5	4/5	3/4	4	1/2	2	1/2	1/2	0	3	5	3/4	1/2	1/2	1	3	3/4	4	4	4
A1; Aw23; B8, B12	2	1	1	1/2	4	1	1	0	1	1	2/3	1	4/5	3	4/5	0	2	1	2/3	1
A1; Aw24; B5, Bw39	1	1	1	1	1/2	1/2	1/2	1	1	1	5	1	5	2	3	2/3	1	2	1	1
A2, A3; B5, B15	4	1/2	3	2	1/2	1	1/2	1	1/2	1/2	5	4/5	2/3	2	3	1	4	3	1	1
A2; Aw30+w31; B5, B7	4	4	4	3/4	2/3	3	2/3	2	3	5	3/4	2/3	1/2	2	3	4	4/5	4	3/4	4
A1, A2; B8	1	1/2	1	2	4/5	2	2/3	2/3	2	2/3	5	5	5	4/5	5	1	4	2/3	2/3	4
A2, A29; B7, B27	4/5	4	2/3	4	2/3	1	1	1	2	2/3	0	0	1	1	2	1	2	4/5	4/5	2/3
A2, A3; B7, B27	3	4	2	3	1	1	1/2	2	2	5	5	5	3	3	5	4	4/5	2/3	2	
A1, A2; B8, Bw50	1	1/2	1	1	2/3	2	3	3	2	1/2	5	4	4/5	4	4/5	5	1	1	1	
A1, A2; B7, B37	1	1	1	2	2	2	1	1	1/2	5	3	3/4	3	2	1	2/3	4	4/5	4	
A1; Aw24; B8, B13	1	1/2	1	1	3	1/2	2/3	2/3	1	2	5	2/3	5	2	2/3	2/3	2	1	1	1
A1, A3; B7, Bw49	1	1/2	1/2	1/2	2	1	1	1/2	1	1	5	3	1/2	1/2	1	1	2/3	4/5	4	2
A2; B14, B27	3	3	2/3	3	4	2/3	2/3	3	2	2/3	5	4	5	3	0	3	3	4	0	0
A2; B18	4	3	54	4	3	3	3	3	2	3	5	4	5	4	4	3	4	4	3	
A1; Aw24; B8, B15	2	2	3	2	2	2	4	3	2	2	5	2	5	4	3	1	2	2	2	
A26, A29; B12	3	4/5	2	3	3	2/3	2	2	3	3/4	5	3	4	3	4	0	2	4	0	0

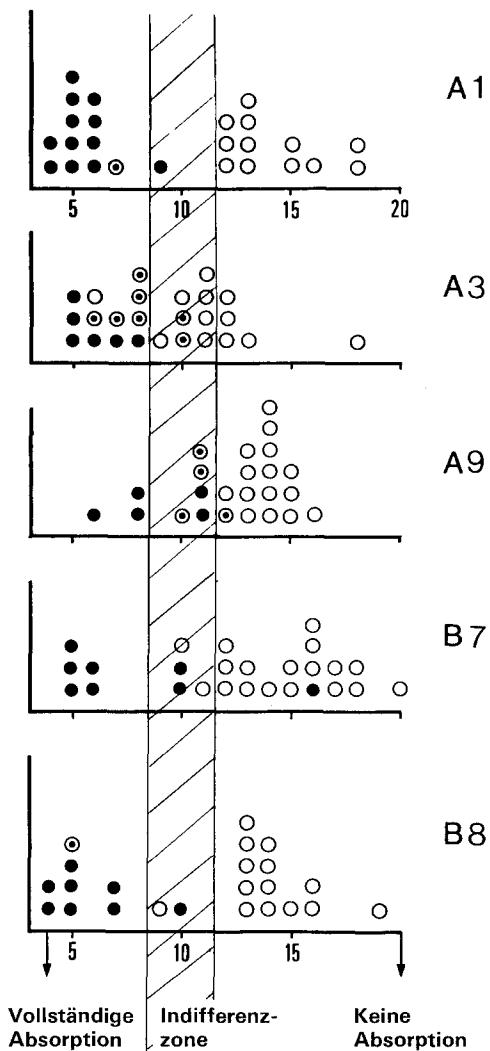


Abb. 1. Ergebnisse der Absorptionsuntersuchungen. ● Spur trägt das Antigen.
◎ Absorption durch Kreuzreaktion erkläbar. ○ Spur trägt das Antigen nicht

Diskussion

Die „Einstellung“ des Testsystems erfolgt durch Austitrieren der Testseren auf die entsprechenden Testzellen. Dabei ist zu beachten, daß Lymphozyten verschiedener Spender in bezug auf ein Anti-HLA-Serum unterschiedlich stark reagieren können. Als Beispiel dafür möge die in Tabelle 3 angegebene Titrationsuntersuchung dienen. Die Testzellen A1, Aw24; B8, B13 und A1, Aw23; B8, B12 reagieren mit allen vier Seren etwa gleich stark, während die Zellen des Spenders A1, A2; B5, B8 wesentlich schwächer reagierten. Lediglich das Antiserum Wü 950109 hatte zu allen drei Testzellen die gleiche Avidität. Es erscheint sinnvoll, die Testzellen so auszusuchen, daß sie mit den verwendeten Antiseren besonders gut reagibel sind, da dann die Anti-HLA-Seren für den Absorptionstest stärker

verdünnt werden können und somit für die Absorption geringere Spurenmengen ausreichend sind. Es muß auch hervorgehoben werden, daß verschiedene Komplementcharge unterschiedliche Aktivität besitzen und deshalb das Testsystem auf einen Pool Kaninchenkomplement ausgerichtet werden muß.

Da tiefgefrorene Lymphozyten beim Auftauen in ihrer Reagibilität verändert werden können (Mayr 1977), ist ihre Verwendung wohl weniger empfehlenswert; längere Zeit in Nährmedien aufbewahrte Lymphozyten können sich ebenfalls in ihrer Empfindlichkeit (geringfügig) verändern. Das beste Verfahren ist sicherlich die Verwendung frisch gewonnener Lymphozyten, wobei die Spenderauswahl keine großen Schwierigkeiten bereitet, wenn häufig vorkommende Antigene untersucht werden.

Beim Ablesen der zytotoxischen Reaktion wurde bewußt auf eine feinere Unterteilung der Ergebnisse (z. B. Angabe der toten Zellen in Prozent) verzichtet, da auch die Interpretation dem NIH-Test (vierstufige Skala und negatives Ergebnis) entsprechen sollte. Auch scheint es schwierig, den Prozentsatz an toten Zellen genauer als auf 10% zu schätzen.

Die Ergebnisse von Tabelle 6 und Abb. 1 zeigen, daß zwar eindeutige Resultate erzielt werden, allerdings kreuzreagierende Antigene (Mayr 1977) häufig, jedoch nicht regelmäßig falsch positive Reaktionen verursachen. Dabei ist bemerkenswert, daß auch normalerweise nur schwach kreuzreagierende Antigene im Absorptionstest starke Kreuzreaktionen zeigten; ein Ergebnis, das mit den Befunden von Newall (1979) in gutem Einklang steht.

Bei den vorliegenden Untersuchungen ließen sich die Antigene HLA-A1 und HLA-B8 am zuverlässigsten nachweisen. Bei HLA-A3 ergaben sich häufig falsch positive Befunde, die durch Kreuzreaktion mit HLA-A1 erklärbar sind. Alle vier Anti-HLA-A3-Seren erwiesen sich im nachhinein als etwas zu stark verdünnt, so daß beim Nichtvorliegen des Antigens oder kreuzreagierender Antigene die Bewertungsstufe 5 im zytotoxischen Test kaum erreicht wurde. Das Antiserum C der Spezifität Anti-HLA-A9 war zu wenig verdünnt worden und wurde nun von einer Spur mit dem Antigen HLA-Aw23 ausreichend absorbiert.

Wenn aufgrund der vorliegenden Untersuchungen Überlegungen zur praktischen Anwendbarkeit des Absorptionstestes vorgenommen werden sollen, so können die Kreuzreaktionen bei der Interpretation der Ergebnisse entweder berücksichtigt werden oder unbeachtet bleiben.

Berücksichtigt man z. B. die Kreuzreaktion zwischen HLA-A1 und HLA-A3 und zwischen HLA-Bw39 und HLA-B8 und definiert eine Spur als für ein Antigen positiv, wenn eine Bewertungssumme zwischen 4 und 8, und als negativ, wenn eine Bewertungssumme zwischen 12 und 20 erreicht wurde (Abb. 1), so können von den 122 Untersuchungen 103 als positiv oder negativ zugeordnet werden. Allerdings wäre *eine* Spur als falsch negativ und *eine* als falsch positiv bewertet worden. Die Richtigkeit der eindeutigen Untersuchungsergebnisse würde also mehr als 95% betragen. Berücksichtigt man die Kreuzreaktion jedoch nicht, so läge die Richtigkeit der eindeutigen Untersuchungsergebnisse nur etwas höher als 90%.

Es ist wahrscheinlich, daß durch Einsatz von mehr als vier sorgfältig ausgewählten und auf die Testlymphozyten austitrierten Antiseren zur Untersuchung je eines Antigens die Aussagekraft des Absorptionstestes von Blutspuren noch

gesteigert werden kann. Der limitierende Faktor kann dann allerdings die Größe der Blutspur sein. Auch das Einbeziehen weiterer Antigene erscheint sinnvoll, wenn sie häufig vorkommen und gut definiert sind.

Die Reaktionsweise bei Austestung der Antiseren an einer großen Zahl von Blutspuren wird erkennen lassen, welche Seren sich für die Typisierung von Blutspuren besonders eignen. Es erscheint somit erreichbar, daß bei weiterer Verbesserung der Testbedingungen und dem Einsatz besonders geeigneter Antiseren die Typisierung der HLA-Antigene von Blutspuren einen Grad an Sicherheit erreicht, wie er für andere Blutgruppensysteme in der kriminalistischen Routine zur Differenzierung von Blutspuren akzeptiert wird.

Literatur

- Albert ED, Scholz S, Bertrams J, Ewald RW, Westphal E, Ratschko KW, Spielmann W, Seidl S (1975) Representative HL-A phenotype and haplotype frequencies of the German population. *Z Immunol Forsch* 148:367-371
- Hodge D, Festenstein H, Wolf E, Lincoln P, Dodd B (1979) Results from a preliminary study of the detection of HLA antigens in bloodstains. 8. Intern Tag Ges Forens Blutgrkunde, London, S 175-182
- Mayr WR (1977) Probleme bei der Anwendung des HLA-Systems im Vaterschaftsgutachten. 7. Intern Tag Ges Forens Blutgrkunde, Hamburg, S 417-441
- Newall PJ (1979) The identification of HLA-A2 and HLA-B5 antigens in dried bloodstains. *Can Soc Forens Sci* 12:1-16
- Rittner C, Waiyawuth V (1974) HL-A typing in dried bloodstains. I. Specificity and reliability of the inhibition test. *J Immunogenet* 1:99-111
- Rittner C, Waiyawuth V (1975) HL-A typing in dried bloodstains. II. Comparative studies on microcytotoxicity and microcomplement fixation tests. *J Immunogenet* 2:211-222
- Terasaki PI, Park MS (1976) In: Ray JG, Hare DB, Pedersen PD, Mullally DI (Hrsg) Manual typing techniques. DHEW Publication No (NIH) 76-545, Bethesda (MD) 20014, pp 69-80

Eingegangen am 24. Februar 1981