

Die Aussagekraft humanspezifischer Bluttests zur Einschätzung des postmortalen Intervalls bei Knochenfunden

**Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von
Sarah Christina Kölzer (geb. Ebach)
aus Kirchen (Sieg)

Januar 2013

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Dettmeyer

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcel A. Verhoff
2. Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein

Tag der Disputation: 28.08.2013

Für Thomas

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung des PMI aus strafrechtlicher Sicht	1
1.2	Der Einfluss des Liegemilieus als Problem bei der Bestimmung des PMI	1
1.3	Die Bedeutung humanspezifischer Bluttests für die Forensik	3
2	Zielsetzung der Arbeit	5
3	Eigene Arbeiten	7
3.1	Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben: Ein Vergleich der Luminolmethode, des Hexagon-OBTI®-Tests und des Combur®-Tests	7
3.2	Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI®, and Combur® tests	7
3.3	Die Anwendung des Hexagon-OBTI®-Tests und des RSID®-Bluttests im Kontext der Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben	8
4	Diskussion	9
5	Zusammenfassung	17
6	Summary	19
	Literaturverzeichnis	20
	Ehrenwörtliche Erklärung	25
	Danksagung	26
	Eigene Publikationen als Bestandteil der vorliegenden Arbeit	27

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung des PMI aus strafrechtlicher Sicht

Die Bestimmung bzw. Schätzung des postmortalen Intervalls (im Folgenden mit „PMI“ abgekürzt) von Knochenfunden, auch als Liegezeit bezeichnet, stellt seit jeher eine der größten Herausforderungen für die forensische Osteologie dar [16, 24, 34]. Definiert ist das PMI als Zeitabstand vom Todeseintritt bis zum Zeitpunkt der Untersuchung [50]. Werden Knochen im Freien aufgefunden, muss zunächst die Humanspezifität gesichert sein, bevor weitere forensisch-osteologische Untersuchungen angestellt werden. Hier steht die Frage im Vordergrund, ob sich die Liegezeit innerhalb des sogenannten forensisch relevanten Zeitraums befindet, für den einige Autoren eine Zeitspanne von 50 Jahren vorgeschlagen haben [8, 9, 50]. Die Definition des forensisch relevanten Zeitraums hängt von der Art des Delikts und den entsprechenden Verjährungsfristen ab, die sich im internationalen Vergleich z.T. erheblich unterscheiden. Geht man von Delikten ohne Verjährungsfrist – z.B. Mord im deutschen Strafgesetzbuch – aus, ist es dennoch unwahrscheinlich, einen Täter 50 Jahre oder länger nach einem Kapitalverbrechen noch zur Rechenschaft ziehen zu können [50]. Könnte man als Untersucher also sicher eine Liegezeit von unter 50 Jahren ausschließen, könnte das laufende Ermittlungsverfahren eingestellt bzw. würde erst gar nicht begonnen werden [48].

1.2 Der Einfluss des Liegemilieus als Problem bei der Bestimmung des PMI

Die Hauptproblematik bei der Bestimmung des PMI besteht darin, dass eine große Anzahl an komplexen äußeren Einflussfaktoren auf die Dekompositionsvorgänge des Knochens einwirken, die selbst bei durchgehender Lagerung im Erdreich kaum zu kalkulieren sind und sich im Einzelfall auch gegenseitig beeinflussen [18]. Die meisten dieser Einflussfaktoren lassen sich unter dem Begriff „Liegemilieu“ zusammenfassen, welches sich hauptsächlich aus der Bodenbeschaffenheit ergibt [24]. Diese Umstände führen insgesamt dazu, dass eine korrekte Einschätzung des PMI oft nur sehr schwer oder gar nicht möglich ist. Selbst wenn man das Problem darauf beschränkt, zwi-

schen „historischen“ Knochenfunden und Knochenfunden mit einer „rezenten“ – das heißt für die Ermittlungsbehörden noch relevanten – Liegezeit zu unterscheiden, erweist sich die Differenzierung als schwierig [22, 49, 50].

Man ist in den forensischen Wissenschaften daher schon lange darum bemüht, geeignete Untersuchungsmethoden für eine zuverlässige Bestimmung des PMI an Knochenfunden zu entwickeln [50]. Es gibt verschiedene Ansätze und Methoden, mit deren Hilfe man versucht hat, eine zuverlässige Aussage über das PMI treffen zu können. Trotz aller methodischen Einschränkungen steht in der forensisch-osteologischen Analyse an erster Stelle die makroskopische Untersuchung des Knochens, die in der Regel mit der Beurteilung der frischen Sägefläche und der Prüfung der UV-Fluoreszenz an derselben [49] beginnt. Im nächsten Schritt folgen unter Umständen mikroskopische Untersuchungen, die mit verschiedenen Färbungen [7] sowie rasterelektronenmikroskopisch [4] durchgeführt werden können. Weiterhin können zusätzlich physikalische, chemische bzw. apparativ aufwendigere Methoden [5] zum Einsatz kommen, z.B. Ultraschalluntersuchungen [6], Bestimmung des Aminosäurespektrums [3], atomabsorptionsspektrometrische Untersuchung des Gehalts an anorganischen Substanzen [16], komplexe Bestimmungen von Ionen, Lipiden und Proteinen [10] oder Untersuchungen des Stickstoffgehalts [28]. All diese Methoden erfassen Veränderungen, die im Laufe der Dekompositionsvorgänge der Knochensubstanz entstehen.

Die sogenannte Luminolmethode wurde bereits 1937 von Specht [45] zur Auffindung von Blutproben beschrieben. Später wurde der Luminoltest zur Schätzung des PMI an Knochenproben eingesetzt [26, 39]. Diese Methode ist relativ günstig und schnell durchführbar. Hierfür wird das Knochenmehl verwendet, das beim Anfertigen des frischen Sägeschnitts entsteht. Die Luminolmethode erwies sich in vorangegangenen Studien als alleinige Methode zur Schätzung eines forensisch relevanten PMI als nur eingeschränkt valide, da unter anderem die Wahrscheinlichkeit für ein falsch-negatives Ergebnis im Kontext forensischer Fragestellungen zu hoch ist. Sie ist jedoch in der Kombination mit anderen Verfahren sehr wertvoll, da die Intensität der Chemilumineszenz einen guten Zusammenhang mit dem PMI zeigt [14, 38, 39].

Derzeit könnten nur Radionuklidmethoden grundsätzlich den Anspruch erfüllen, das PMI an Knochenproben unabhängig von äußeren Einflüssen, wie z.B. klimatischen Faktoren, zu bestimmen [35, 50]. Bisher bringen sie den Nachteil mit sich, dass sie teuer und aufwendig und darüber hinaus nur eingeschränkt einsetzbar sind [50]. Die wohl bekannteste und darüber hinaus bisher etablierteste Messmethode ist die Radiocarbon(^{14}C)-Bestimmung [31]. Für Knochenfunde mit einem PMI von bis zu 100 Jahren ist diese Messmethode aber aufgrund der vergleichsweise hohen Halbwertszeit des ^{14}C von 5730 Jahren zu ungenau [47]. Dennoch legen neuere Studien, wie z.B. die Bestimmung von Strontium-90 [32], Plutonium [46] und die

Radionuklidanalyse von ^{228}Th und ^{228}Ra [52], für Knochenfunde rezenten Alters ein möglicherweise hohes forensisches Potenzial nahe.

Weiterhin existiert ein vielversprechender Forschungsansatz, der auf der Bestimmung des Citratgehalts in Knochenfunden beruht und sich insbesondere mit Knochenfunden von einer kürzeren Liegezeit und somit mit der Frage nach der Unterscheidung von forensisch-relevant und nicht-relevant beschäftigt. Dennoch sind auch hier einige Faktoren vorhanden, die den Einsatz dieser Methode bedeutend limitieren. So ist die Bestimmung des Citratgehalts beispielsweise lediglich für Knochenfunde möglich, die während ihrer Liegezeit nur Temperaturen $> 0^\circ\text{C}$ ausgesetzt waren [42].

1.3 Die Bedeutung humanspezifischer Bluttests für die Forensik

Schnelltests zum Blutnachweis sind in der forensischen Spurenkunde bereits seit längerer Zeit etabliert und basieren in viele Fällen auf dem Nachweis von Hämoglobin (Hb). So wird der Hexagon-OBTI[®]-Test [23], der ursprünglich für die klinische Medizin zum Nachweis okkulten Blutes im Stuhl im Rahmen der Kolonkarzinom-Vorsorge entwickelt wurde, seit einigen Jahren auch als humanspezifischer Test zur Unterscheidung von menschlichem/nicht-menschlichem Blut und somit zur Blutartbestimmung herangezogen [20, 29]. Das Prinzip des Hexagon-OBTI[®]-Tests basiert auf Antikörpern gegen humanes Hämoglobin. Die Nachweisgrenze beginnt laut Hersteller bereits bei 0,88 mg Hb/g Stuhl bzw. Testsubstanz [23].

Neben dem Hexagon-OBTI[®]-Test wurde lange Zeit der sogenannte Sangur[®]-Test zum Blutnachweis verwendet [13, 29], der seit einigen Jahren nur noch als Kombinations-Teststäbchen Combur[®] zusammen mit Eiweiß, Glukose, Nitrit u.a. angeboten wird. Ursprünglich wurde das Teststäbchen zum Testen von Urin auf Blut und dessen Bestandteile entwickelt. Die Combur[®]-Teststäbchen enthalten organisches Wasserstoffperoxid, mit dem vorhandenes Hämoglobin die Indikatoroxidation katalysiert. Die Nachweisgrenze liegt hier sehr viel niedriger als beim Hexagon-OBTI[®]-Test (0,03 mg Hb/dl Testsubstanz) [41]. Als weiterer Schnelltest, der zum Nachweis geringster Spuren menschlichen Blutes entwickelt wurde, stand der RSID[®]-Bluttest [25] zur Verfügung. Sein Testprinzip beruht wie beim Hexagon-OBTI[®]-Test auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Schnelltest enthält allerdings keinen Antikörper gegen Hämoglobin, sondern zwei Antikörper gegen Glykophorin A, ein spezifisches Membranprotein auf Erythrozyten [2]. Jeder der beiden Antikörper erkennt ein Epitop auf dem Glykophorin A-Protein [17]. Hier liegt die Sensitivität bei 1 μl menschlichen Blutes, die vom Hersteller bewusst so angepasst wurde, dass ein

positives Testergebnis mit der Wahrscheinlichkeit, ein DNA-STR-Profil zu erhalten, korrelieren soll [1].

2 Zielsetzung der Arbeit

Bislang existiert in der forensischen Praxis noch keine ausreichend valide Methode, mit der man das postmortale Intervall an Knochenfunden hinreichend präzise eingrenzen kann – insbesondere im Hinblick auf den Ein- oder Ausschluss eines forensisch relevanten Zeitraums – und die zudem günstig, schnell, überall verfügbar und einfach in der Durchführung ist, um in einem breiten Spektrum Anwendung finden zu können. Diese Tatsache gab Anlass dazu, herauszufinden, ob Schnelltests, die eigentlich auf dem Nachweis von Blut bzw. seinen Bestandteilen beruhen, für diese Fragestellung geeignet sind. Die vorliegende Versuchsreihe basiert auf der Annahme, dass die mit dem PMI zusammenhängende Chemilumineszenz der Luminolreaktion auf dem Vorhandensein von verbliebenem Hämin bzw. Hämoglobin in der Knochensubstanz beruht. Gegenstand der Untersuchung waren insgesamt 39 humane Langknochen mit bekanntem PMI, akquiriert aus den Instituten für Rechtsmedizin Gießen und Frankfurt/Main.

Zu diesem Zweck sollten im ersten Schritt des Experiments 16 humane Langknochen mit zwei zur Einschätzung des PMI etablierten Methoden (UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche und Luminol-Test) und zwei erstmals unter dieser Fragestellung eingesetzten Methoden (Hexagon-OBTI[®]-Test und Combur[®]-Test) verblindet untersucht werden [14](1).¹

Im zweiten Schritt wurde die Versuchsreihe um 23 humane Langknochenproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Frankfurt/Main erweitert und an diesen außerdem ein Inter-Observer-Test vorgenommen. Im Übrigen erfolgte eine statistische Aufbereitung der Testergebnisse mittels der Statistik-Software SPSS[®] Vers. 17.0 und Statistica Vers. 9.0. [38](2).

Zuletzt wurden aus den vorangehenden Versuchsreihen fünf Langknochen aus verschiedenen Liegezeitperioden ausgewählt und einerseits erneut mit dem Hexagon-OBTI[®]-Test und zusätzlich mit dem RSID[®]-Bluttest verblindet untersucht. Insgesamt wurden fünf Versuchsreihen sowohl nach Packungsanleitung als auch unter Abwandlung der Standardprotokolle der Hersteller durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob einerseits mit einer vorangehenden Bearbeitung der Knochenproben mit 5%-iger Ammoniaklösung und andererseits mit einer deutlich längeren Inkubationszeit (zwei Stunden statt fünf Minuten) Hämoglobin bzw. seine Bestandteile aus

¹Ziffern in () bezeichnen eigene Publikationen als Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

dem Knochen gelöst werden und in Abhängigkeit des PMI positive Testergebnisse resultieren können [15](3).

3 Eigene Arbeiten

3.1 Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben: Ein Vergleich der Luminolmethode, des Hexagon-OBTI[®]-Tests und des Combur[®]-Tests

Der erste Teil der Versuchsreihe bestand darin, an 16 humanen Langknochen zwei bisher etablierte Versuchsmethoden zur Einschätzung des PMI (UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche und Luminol-Test) sowie zwei erstmals unter dieser Fragestellung eingesetzte Methoden (Hexagon-OBTI[®]-Test und Combur[®]-Test) verblindet anzuwenden. Die positive Korrelation zwischen UV-Reflexion und PMI war hier deutlich erkennbar. Der Luminol-Test verlief bei den jüngeren Knochenproben (PMI < 20 Jahre) positiv (++) bis stark positiv (+++). In dem kritischen Zeitraum von 50-150 Jahren zeigten nahezu alle Proben eine schwach-positive (+) bis positive (++) Reaktion. In dem PMI-Intervall von mehr als 100 – jedoch deutlich weniger als 1000 – Jahren standen nur drei Proben zur Verfügung, wobei das längste PMI 200 Jahre betrug. In dieser Gruppe zeigte sich jeweils ein positiver Luminol-Test. Bei den drei historischen Knochenproben mit einem PMI von zweimal etwa 1000 und einmal ca. 2000 Jahren verlief der Luminol-Test durchgehend negativ.

Der Combur[®]-Test und der Hexagon-OBTI[®]-Test verliefen bei allen untersuchten Knochenproben durchweg negativ.

3.2 Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI[®], and Combur[®] tests

Im zweiten Teil wurde das Probenkollektiv um 23 Knochenproben aus dem Institut für Rechtsmedizin Frankfurt/Main erweitert und eine Unterteilung der nun insgesamt 39 Proben in fünf PMI-Klassen vorgenommen. Für die UV-Reflexion ergab

sich auch hier, dass das Ausmaß der Reflexion einen starken Zusammenhang mit dem PMI zeigte.

Darüber hinaus erfolgte eine statistische Auswertung der Ergebnisse mittels der Statistik-Programme SPSS® Vers. 17.0 und Statistica Vers. 9.0. Der Grad des Zusammenhangs zwischen Intensität der Lumineszenz der Luminol-Reaktion und der PMI-Klasse wurde mithilfe des Gamma-Tests bestimmt. Hieraus ergab sich ein Fehlerreduktionsmaß von $g = 0.68$ ($p < 0.00$), was für einen starken Zusammenhang der beiden Variablen spricht.

Für den Inter-Observer-Test, der an den Proben aus dem Institut für Rechtsmedizin Frankfurt/Main durchgeführt wurde, ergab sich sowohl für den Luminol-Test (Fleiss-kappa₁ = 0.96) als auch für das Ausmaß der UV-Reflexion (Fleiss-kappa₂ = 0.92) eine hohe Reliabilität.

Der Hexagon-OBTI®-Test und der Combur®-Test erbrachten für die insgesamt 39 Proben ein negatives Ergebnis.

3.3 Die Anwendung des Hexagon-OBTI®-Tests und des RSID®-Bluttests im Kontext der Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben

Im letzten Versuchsteil erfolgte eine Auswahl von fünf Langknochen anhand unterschiedlicher Liegezeitperioden aus den vorangehenden Versuchsteilen. Diese wurden erneut mit dem Hexagon-OBTI®-Test und zusätzlich mit dem RSID®-Bluttest verblindet untersucht. Mit weiteren fünf Versuchsreihen, in denen die Durchführung sowohl nach Standardprotokollen der Hersteller als auch mit Modifikationen derselben erfolgte, sollte überprüft werden, ob Hämoglobin bzw. seine Bestandteile aus dem Knochen gelöst werden und in Abhängigkeit des PMI positive Testergebnisse resultieren können. Vier der insgesamt fünf Versuchsreihen erbrachten trotz der Modifikation mit längerer Inkubationszeit und Bearbeitung mit 5%-iger Ammoniaklösung für alle Proben ein negatives Ergebnis. Eine Versuchsreihe, in der der RSID®-Bluttest mit dem Puffersystem des Hexagon-OBTI®-Tests durchgeführt wurde, ergab für alle Proben ein gleichmäßiges schwach-positives Resultat.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus drei Abschnitten einer Versuchsreihe zusammen: Im ersten Abschnitt des Experiments wurden 16 humane Knochenproben mit bekannter Liegezeit im Erdlager mit zwei Methoden, die bereits zur Einschätzung des PMI etabliert sind (UV-Fluoreszenz der frischen Sägefläche und die Luminol-Methode), und zwei Testverfahren, die unter dieser Fragestellung erstmals eingesetzt wurden (Hexagon-OBTI[®]-Test und Combur[®]-Test), verblindet untersucht. Im zweiten Abschnitt wurden die Ergebnisse dieses Versuchsabschnitts aus dem Institut für Rechtsmedizin Frankfurt/Main in die Auswertung miteinbezogen und eine statistische Analyse derselben vorgenommen. Im dritten und letzten Versuchsabschnitt wurden aus dem Probenkollektiv des vorherigen Abschnitts fünf Knochen aus verschiedenen Liegezeitperioden ausgewählt, an denen zum einen eine Modifikation des Hexagon-OBTI[®]-Tests vorgenommen wurde und zum anderen der RSID[®]-Bluttest ebenfalls erstmals unter dieser Fragestellung zum Einsatz kam.

Aus den ersten beiden Versuchsabschnitten geht hervor, dass die UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche einen starken Zusammenhang des Ausmaßes der Reflexion mit dem PMI zeigt. Es konnte bestätigt werden, dass diese Methode gut zum Ausschluss eines forensisch relevanten PMI von unter 50 Jahren geeignet ist [49]. Diese Schlussfolgerung ist allerdings nur valide in Fällen mit einer deutlichen Reduktion der Reflexion, insbesondere, wenn der sogenannte Sandwich-Effekt beobachtet wird, der eine Zone von abgeschwächter Reflexion zwischen Spongiosa und Compacta sowie zwischen Spongiosa und Periost zeigt. Umgekehrt stellt eine komplette Reflexion immer einen starken Indikator für ein forensisch relevantes PMI dar.

Der Luminol-Test zeigte bei nahezu allen (14 von 16) Proben im kritischen Zeitraum von 10-100 Jahren eine schwach-positive bis stark-positive Reaktion. Dass 30% der Knochenproben in der Gruppe mit einem PMI >100 Jahren (>1000 Jahre eingeschlossen) ein positives Ergebnis beim Luminol-Test lieferten, sollte unter Berücksichtigung der geringen Probenanzahl kritisch bewertet werden, steht aber dennoch nicht im Widerspruch zur Erwartung eines negativen Ergebnisses. Bezieht man die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses für rezente Knochenfunde mit ein, sind die Ergebnisse gut mit zuvor publizierten Studien vereinbar [26, 39].

Einige der „falsch“-positiven Ergebnisse können mit Bestattungsbedingungen er-

klärt werden. Wie bei anderen Autoren bereits erwähnt, kann aufgrund einer großen Vielzahl an Umwelteinflüssen sowie anthropogenen Faktoren und diagenetischen Prozessen zwischen Knochen und Boden während der Liegezeit im Erdreich eine Chemilumineszenz resultieren, ohne dass tatsächlich Hämoglobin oder dessen Abbauprodukte vorhanden sind [11, 33, 36].

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Aussagekraft eines negativen Testergebnisses, das ein forensisch nicht-relevantes PMI nahelegt, höher zu bewerten ist als die Aussagekraft eines positiven Testergebnisses, das für ein forensisch relevantes PMI spricht.

Sowohl der Combur[®]- als auch der Hexagon-OBTI[®]-Test wurden zum Nachweis menschlichen Blutes entwickelt, wobei der Hexagon-OBTI[®]-Test laut Hersteller humanspezifisch sein soll [23]. Beide Schnelltests lieferten bei allen Proben durchweg negative Ergebnisse und wurden mithilfe einer Positiv-Kontrolle auf ihre Funktionstüchtigkeit hin überprüft. Eine zu geringe Probenmenge als Erklärung für die negativen Ergebnisse konnte nahezu ausgeschlossen werden, indem mit jener Probe, die beim Luminol-Test die stärkste Chemilumineszenz gezeigt hatte, der Hexagon-OBTI[®]-Test mit der zehnfachen Menge an Knochenmehl wiederholt wurde; mit dieser Maßnahme konnte ebenfalls kein positives Ergebnis erzielt werden. Auch die Knochenproben von Schwein und Pferd erbrachten kein positives Testergebnis, was bei der vom Hersteller deklarierten Humanspezifität des Hexagon-OBTI[®]-Tests nicht überraschte.

Zunächst sollte die Frage diskutiert werden, welcher Bestandteil der Knochensubstanz eine Chemilumineszenz bei der Luminol-Reaktion hervorruft. Mit dieser Frage beschäftigte sich Specht bereits 1937 [45]. Er beschrieb die Hämine als Katalysatoren der Luminol-Reaktion und fand experimentell heraus, dass mit zunehmendem Alter der Blutspur auch die Intensität der Chemilumineszenz zunahm. Specht postulierte, dass das aus dem Blut im Laufe der Alterung abgespaltene Hämatin für diesen Umstand verantwortlich sei. Weber [51] sah Häminproteine ebenso als Katalysatoren der Luminol-Reaktion an, u.a. das Methämoglobin, wobei es für die Reaktion selbst keinen wesentlichen Unterschied mache, ob frisches oder altes Blut getestet werde, da die alkalische Komponente des Luminolreagens eine rasche Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin bewirke. Die Sensitivität der Luminol-Reaktion (entspricht der Grenzkonzentration von Blut) wird von Weber [51] mit 1 : 10.000.000 und von Introna et al. [26] und Zweidinger et al. [53] in einer Spanne von 1 : 10.000 bis 1 : 5.000.000 angegeben. Mit dem Luminol-Test allein kann man also nicht ausschließen, dass in den Knochen womöglich doch Hämoglobin enthalten ist. Bezieht man jedoch die durchweg negativen Ergebnisse des Hexagon-OBTI[®]-Tests mit ein, führt

dies zunächst zu der Annahme, dass in den Knochen kein Hämoglobin als solches vorhanden war, da beide Tests spezifisch für Hämoglobin sind und dieses sogar noch in sehr geringen Konzentrationen messen. Eine Dysfunktion der Tests konnte durch die Positiv-Kontrolle mit frischem Blut ausgeschlossen werden. Im Mittelpunkt steht also die Frage, nach welcher Zeitspanne kein Hämoglobin mehr in der Knochen substanz nachweisbar ist. Das wenige Monate alte Exemplar der Versuchsreihe (Ifd. Nr. 9 in [38]) zeigte weder im Combur[®]-Test noch im Hexagon-OBTI[®]-Test eine positive Reaktion für Hämoglobin.

Unsere Literaturrecherche ergab hierzu, dass Hämoglobin an sich bereits nach wenigen Tagen in Methämoglobin umgewandelt werden soll [53]; diese Angabe bezog sich aber auf die Altersbestimmung von Blutspuren in lufthaltigem Milieu. Hochmeister et al. [21] liefern in ihrer 1999 publizierte Validierungsstudie über den Hexagon-OBTI[®]-Test einen bedeutenden Ansatzpunkt: Bereits 15 Jahre alte menschliche Blutspuren, die über diesen Zeitraum bei Raumtemperatur, auf Stoff befindlich, gelagert worden waren, reagierten im Hexagon-OBTI[®]-Test positiv, obwohl das Hämoglobin sich bei fünf der acht Proben zunächst nicht in Wasser oder dem Tris-Puffer, sondern nur mithilfe von 5%-iger Ammoniak-Lösung lösen ließ. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass bei älteren Blutproben Ammoniak möglicherweise benötigt werde, um altes Hämoglobin zu lösen. In der Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Hexagon-OBTI[®]-Test nicht ausschließlich auf Blut reagiert, sondern auch auf einige andere getestete menschliche Flüssigkeiten wie Speichel, Urin, Stuhl, Vaginalsekret und Sperma. Muskelgewebe reagierte ebenfalls positiv. Des Weiteren testeten Hochmeister et al. Blutspuren und auch Proben des Muskelgewebes, die über einen Monat unter verschiedensten Bedingungen gelagert worden waren (u.a. vergraben im Erdboden in 50 cm Tiefe); auf diese reagierte der Hexagon-OBTI[®]-Test ebenfalls positiv. Demnach schien ein positives Resultat im Hexagon-OBTI[®]-Test für die Proben unserer Versuchsreihe (insbesondere die Proben mit kürzeren PMI) nicht unwahrscheinlich.

Ein weiterer Diskussionspunkt könnte darin bestehen, dass das Knochenmehl womöglich nicht lange genug im Tris-Puffer inkubierte, sodass das Hämoglobin herausgelöst werden konnte. Hochmeister et al. lösten ihre Testsubstanzen zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und nicht – wie in der Packungsanleitung für Stuhlproben angegeben – nur fünf Minuten [21].

Was die durchweg negativen Ergebnisse des Combur[®]-Tests angeht, ist auch hier sicherlich zu diskutieren, ob es - wie beim Hexagon-OBTI[®]-Test - daran lag, dass sich das Hämoglobin nicht im Tris-Puffer lösen ließ. Da die Nachweisgrenze für Hämoglobin sogar noch sehr viel niedriger liegt (0,03 mg Hb/dl) [41] als beim Hexagon-OBTI[®]-Test (0,88 mg Hb/g), erscheint es eher unwahrscheinlich, dass es an einer zu gering vorhandenen Menge Hämoglobin im Knochen lag.

Es lässt sich nicht endgültig klären, ob nicht auch Hämoglobin-Abbauprodukte eine positive Reaktion beim Hexagon-OBTI[®]-Test hervorrufen können. Rauschke fand 1951 in seinem Experiment zur Altersbestimmung von Blutspuren [40] heraus, dass sich in allen untersuchten Blutproben bereits nach 19-24 Stunden ein deutlicher Methämoglobinnachweis erbringen ließ; lediglich in den Proben, die im Eisschrank oder in einer verschlossenen Flasche gelagert worden waren, ließ sich mit den damaligen Methoden (einfaches Spektroskop) selbst nach Monaten noch kein Methämoglobin nachweisen. Inwiefern sich diese Erkenntnisse auf den Hämoglobinabbau im Knochen übertragen lassen, bleibt zu untersuchen. Die uns zugängliche Literatur lieferte zu dieser Fragestellung keine Erkenntnisse.

Aufgrund der Studienergebnisse von Hochmeister et al. [21] erschien uns eine experimentelle Weiterführung für unsere Fragestellung sinnvoll. Interessant schien der Aspekt, insbesondere die Knochenproben für das Fortsetzungsexperiment auszuwählen, die sich hinsichtlich ihres PMI innerhalb des forensisch relevanten Zeitraums von 50 Jahren befinden. Mit diesen fünf ausgewählten Proben, die jeweils eine Liegezeitperiode vertreten, sollte der Hexagon-OBTI[®]-Test und der Combur[®]-Test in Analogie zu Hochmeister et al. [21] wiederholt werden: Einerseits sollten die Proben deutlich länger als in der gegenständlichen Versuchsreihe im Tris-Puffer inkubieren und andererseits vor Durchführung beider Tests mit 5%-iger Ammoniak-Lösung versetzt werden.

Darüber hinaus sollte der RSID[®]-Test als weiterer Schnelltest mit derselben Fragestellung eingesetzt werden, wobei dieser einmal nach Standardprotokoll des Herstellers, einmal mit 5%-iger Ammoniak-Lösung und einmal mit dem Puffersystem des Hexagon-OBTI[®]-Tests durchgeführt wurde. Geht man davon aus, dass durch den zusätzlichen Reaktionsschritt mit der 5%-igen Ammoniak-Lösung bei Hochmeister et al. alle älteren Blutspuren positiv getestet wurden, die mit dem Standardprotokoll (aber bei verlängerter Inkubationszeit) noch negativ gewesen waren, wäre zumindest bei den jüngeren Knochenproben unserer Versuchsreihe ein positives Ergebnis zu erwarten gewesen.

Einen weiteren Hinweis auf eine lange Stabilität des Hämoglobin-Moleküls kann man in einer Validierungsstudie zum SERATEC[®] HemDirect Hämoglobintest finden, der wie der Hexagon-OBTI[®]-Test ursprünglich entwickelt wurde, um okkultes Blut im Stuhl nachzuweisen, in der Forensik aber auch zur Identifikation menschlicher Blutspuren eingesetzt wird. Dieser wurde von Misencik et al. in einer Validierungsstudie erfolgreich getestet; dort erbrachten 31 Jahre alte Blutspuren nach 24-stündiger Inkubationszeit im Puffer ein positives Resultat [30].

Dass trotz der Modifikation des Standardprotokolls beim Hexagon-OBTI[®]-Test die vorliegenden Experimente negativ ausfielen, erhärtet den Verdacht, dass Häm-

globin selbst im Knochen nicht mehr vorhanden war, sondern lediglich seine Abbauprodukte wie Hämine und Hämatine [14, 38]. Es muss sicherlich diskutiert werden, ob Schnelltests, die auf dem Nachweis von Hämoglobin basieren, wie der von uns verwendete Hexagon-OBTI[®]-Test oder der oben erwähnte SERATEC[®] HemDirect Hämoglobintest, wirklich nur spezifisch für Hämoglobin sind oder auch auf dessen Abbauprodukte positiv reagieren können. Dass Proteine durch vielfältige Einflüsse denaturiert werden können, liegt angesichts der Dekompositionsvorgänge nahe. Abgesehen davon ist das Hämoglobinmolekül während des Abbauprozesses verschiedensten Oxidationsvorgängen ausgesetzt, weshalb es fraglich erscheint, ob in 15 [21] bzw. 31 [30] Jahre alten Blutspuren noch das physiologische Hämoglobinmolekül vorhanden ist.

Creamer und Buck untersuchten Knochenproben innerhalb einer PMI-Spanne von 0,5 - 375 Jahren mit einem Elektronenspinresonanz-Spektrometer auf ihren Gehalt an Hämoglobin, wobei die Untersuchung durchgehend positive Ergebnisse erbrachte [11]. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass diese Messung lediglich einen qualitativen Aussagewert besitzt und ihre Spezifität nicht näher geklärt wurde. Weiterhin untersuchten Creamer et al. [12] in einer früheren Studie die Möglichkeit, ob dieses Hämoglobin auch verantwortlich für die Lumineszenz bei der Luminol-Reaktion sein könnte. Hierfür verglichen sie die emittierte Wellenlänge des Lichts der Luminolreaktion mit dem Literaturwert für Hämoglobin. Das Resultat wurde als Übereinstimmung gewertet (gemessener Wert: 435 ± 28 nm, Literaturwert 438 ± 2 nm [12]). Dies könnte dafür sprechen, dass Hämoglobin im Knochen vorhanden sein muss und dieses auch die Chemilumineszenz bei der Luminolreaktion auslöst. Nach dieser Versuchsreihe bleibt es weiterhin unklar, ob nicht die Abbauprodukte des Hämoglobins wie Hämine und Hämatine oder das Methämoglobin die eigentliche Chemilumineszenz bei der Luminol-Reaktion bewirken [45] und eine nahezu identische Wellenlänge generieren.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die negativen Ergebnisse des Hexagon-OBTI[®]-Tests stellt der sogenannte High-Dose-Hook-Effekt dar [21, 44]. Hierunter versteht man allgemein die falsch-niedrige bzw. falsch-negative Bestimmung von Analyten, die in sehr hoher Konzentration in Proben vorkommen. Sobald die Konzentration des Analyten zu hoch ist, können alle Antikörper-Bindungsstellen mit Analyt belegt sein und die zusätzlichen Analyt-Moleküle werden nicht mehr im Rahmen der Bindungskurve ermittelt. Auf diese Weise kommt es zu falsch-niedrigen bzw. falsch-negativen Messwerten. Übertragen auf den Hexagon-OBTI[®]-Test bedeutet dies, dass zu viel freies Hämoglobin, das nicht an den goldmarkierten Antikörper gebunden ist, in die Testlinienregion gelangt. Ist die Menge des Hämoglobins sehr hoch, wird der dort fixierte Antikörper mit freiem Hämoglobin abgesättigt und ist nicht mehr in der Lage, den farbigen Komplex aus goldmarkiertem Antikörper und

Hämoglobin zu binden. In diesem Fall würde die Ausbildung der Testergebnislinie unterdrückt, sodass das Testergebnis trotz des Vorhandenseins von Hämoglobin in der Probe negativ ausfällt [21, 44]. Bezogen auf unser Experiment sprechen allerdings einige Punkte dagegen, dass der High-Dose-Hook-Effekt die Ursache für alle negativen Ergebnisse sein kann: Der Hersteller gibt an, dass dieser beim Hexagon-OBTI[®]-Test erst ab einer Hämoglobinmenge von $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ auftritt; diese Angabe konnte von Hochmeister et al. in ihrer Validierungsstudie [21] bestätigt werden. Sie führten weiterhin aus, dass man für den Test eine Blutverdünnung von mindestens 1:100 zur Vermeidung des High-Dose-Hook-Effekts verwenden sollte. Als wichtigen optischen Anhaltspunkt für eine ausreichende Verdünnung gaben sie an, dass Hämoglobin seine sichtbar rote Farbe bei einer Vollblutverdünnung von 1:1000 verliert. Bei den untersuchten Knochenproben im vorliegenden Experiment war keine Rotfärbung des Puffers nach der Inkubation zu beobachten. Dies könnte ebenfalls gegen die Möglichkeit eines High-Dose-Hook-Effekts sprechen.

Der RSID[®]-Bluttest hat im Vergleich zum Hexagon-OBTI[®]-Test bei der vorliegenden Fragestellung den Vorteil, dass keine falsch-negativen Ergebnisse aufgrund dieses High-Dose-Hook-Effekts resultieren können. Schweers et al. untersuchten diesen Aspekt mit einer aufsteigenden Verdünnungsreihe in einer Validierungsstudie [43]. Bei keiner Verdünnung konnte ein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet werden [43]. Zu berücksichtigen ist allerdings die eingeschränkte Vergleichbarkeit mit dem Hexagon-OBTI[®]-Test, da der RSID[®]-Bluttest nicht auf Antikörpern gegen humanes Hämoglobin, sondern gegen Glykophorin A basiert. In der uns zugänglichen Literatur findet sich keine Angabe darüber, wie lange Membranproteine von Erythrozyten bzw. Proteine allgemein postmortal stabil bleiben; einen Hinweis könnten jedoch Rachmilewitz et al. mit ihrer Studie über die Stabilität von Oxyhämoglobin A, seinen konstituierenden Ketten und ihren Derivaten [37] liefern: Methämoglobin A – bei 4°C für sieben Monate inkubiert – war nur ungefähr zur Hälfte zu sogenannten „Hemichromes“ degradiert worden. Hemichromes sind sogenannte low spin-Derivate von Methämoglobin, die bei diskreten reversiblen und irreversiblen Veränderungen der Proteinkonformation dadurch entstehen, dass sich Atome, die sich innerhalb der Hämoglobin-Proteinketten befinden, als sechster Ligand an das Eisen des Häms binden [19, 37]. Vereinfacht kann man sie als Intermediärprodukte bei der Oxidation von Hämoglobin bezeichnen. Dies lässt den Schluss zu, dass Methämoglobin bzw. seine Proteinketten relativ lange stabil bleiben können, wobei sich die Frage stellt, inwiefern diese Erkenntnis auf die Stabilität von Membranproteinen übertragbar ist. Jarolim et al. [27] konnten experimentell nachweisen, dass diese Hemichromes einen destabilisierenden Effekt auf das Membranskelett von Erythrozyten haben. Hierbei unterscheidet man zwischen reversiblen und irreversiblen Hemichromes (rHCRs und iHCRs), wobei gezeigt werden konnte, dass bereits die

rHCRS zur Freisetzung von Häm in führten, was wiederum zur Hämolyse, also zur Zerstörung der Zellmembran der Erythrozyten führte. Methämoglobin hatte dagegen einen stabilisierenden Einfluss auf das Membranskelett der Erythrozyten (Abb. 5 in (3)). Die referierten Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass das Glykophorin A nicht mehr nachweisbar ist und somit der RSID[®]-Bluttest negativ ausfallen musste. Wie lange es insgesamt dauert, bis kein Methämoglobin mehr vorhanden ist, bzw. bis alle Proteine oder Proteinketten in Erythrozyten respektive am Hämoglobin vollständig denaturiert sind, bleibt letztlich ungeklärt. Dies hängt nicht zuletzt von den zahlreichen verschiedenen postmortalen Dekompositionsprozessen ab sowie von der Tatsache, dass der postmortale Hämoglobinabbau nicht mit Versuchsbedingungen vergleichbar ist, wie sie beispielsweise bei Rachmilewitz et al. [37] beschrieben wurden.

Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass Schweers et al. in ihrer Validierungsstudie zum RSID[®]-Bluttest [43] nicht ausführen, ob Blutspuren verschiedenen Alters getestet wurden. Es ist lediglich die Rede von getrockneten menschlichen Blutspuren, was eine Übertragbarkeit auf Knochenproben nicht zulässt. Weiterhin kann ausgeschlossen werden, dass das Ammoniak für die negativen Testergebnisse beim RSID[®]-Bluttest verantwortlich ist, da Schweers et al. auch diese Möglichkeit in ihrer Validierungsstudie ausschließen konnten, indem sie Blutspuren testeten, die trotz Behandlung mit ammoniakhaltigem Bodenreiniger ein positives Ergebnis zeigten. Darüber hinaus erbrachte die RSID[®]-Bluttest-Reihe, die ohne Ammoniak durchgeführt wurde, ebenfalls nur negative Ergebnisse. Berücksichtigt man, dass in der Validierungsstudie [43] der RSID[®]-Bluttest für Blut von verschiedenen Oberflächen und Blut in Kombination mit anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Sperma und Urin positiv reagierte, ist keine Störung des Tests durch Knochensubstanzen zu erwarten.

Ein letzter zu diskutierender Punkt ist, dass der RSID[®]-Bluttest mit dem Puffer des Hexagon-OBTI[®]-Tests bei allen Proben schwach positive Ergebnisse zeigte. Der Hersteller des SERATEC[®] HemDirect Hämoglobintests gibt in der Produktbeschreibung an, dass für diesen auch andere Puffer im neutralen pH-Bereich verwendet werden können, ohne das Testergebnis zu beeinflussen [44]. Der Hersteller des RSID[®]-Bluttests macht hierzu zwar keine Angaben, dennoch erschien es uns sinnvoll, diesen Aspekt ebenfalls zu untersuchen. Da alle Ergebnisse gleichartig schwach positiv ausfielen, scheint es sich in diesem Zusammenhang um ein unspezifisches Phänomen zu handeln. Eine Durchführung des RSID[®]-Bluttests mit dem Puffer des Hexagon-OBTI[®]-Tests erscheint demnach nicht sinnvoll.

Insgesamt legen die vorgebrachten Ergebnisse nahe, dass Schnelltests, die auf dem Nachweis von Blut und dessen Bestandteilen beruhen, zur Eingrenzung des PMI von

Knochenfunden auch unter Abwandlung der Standardprotokolle nicht geeignet sind. Zu dem offenbar kritischen Problem des postmortalen Abbaus von Hämoglobin in Knochen sind weitere, grundlegende Experimente notwendig.

5 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, neue, praktisch anwendbare Methoden zur Einschätzung des Postmortal-Intervalls (PMI) zu erhalten, wurden im ersten Teil einer Versuchsreihe 39 humane und fünf tierische Langknochen mit bekanntem PMI im Erdlager (0,2 bis ca. 2000 Jahre) mit zwei zur Einschätzung des PMI etablierten Methoden (UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche und Luminol-Test) und zwei erstmals unter dieser Fragestellung eingesetzten Methoden (Hexagon-OBTI[®]-Test und Combur[®]-Test) verblindet untersucht. Die dem Experiment zugrunde liegende Hypothese bestand in der Annahme, dass die mit dem PMI zusammenhängende Chemilumineszenz der Luminolreaktion auf dem Vorhandensein von verbliebenem Hämin bzw. Hämoglobin in der Knochensubstanz beruht.

Die Ergebnisse bestätigten, dass das Fehlen von Chemilumineszenz und eine deutliche Reduktion der UV-Fluoreszenz eine stärkere Aussagekraft bezüglich des Ausschlusses eines forensisch relevanten PMI besitzen als umgekehrt eine positive Luminolreaktion und eine vollständige UV-Fluoreszenz. In beiden Fällen wurden die Grenzen der Methoden unter dieser Fragestellung deutlich. Insbesondere für Proben mit einer positiven Luminolreaktion könnte die Anwendung von unbedingten Methoden zur Schätzung des PMI angezeigt sein. Entgegen unserer Erwartungen lieferten sowohl der Combur[®]-Test als auch der Hexagon-OBTI[®]-Test, die beide ursprünglich zum Blutnachweis konzipiert wurden, für alle Proben ein negatives Ergebnis.

Daher wurden im zweiten Versuchsteil fünf der vorher 39 Knochenproben aus fünf Liegezeiten im Erdlager (ebenfalls 0,2 bis ca. 2000 Jahre) ausgewählt und erneut mit dem Hexagon-OBTI[®]-Test und zusätzlich mit dem ebenso für den Nachweis von Blutspuren entwickelten RSID[®]-Bluttest verblindet untersucht. An den Proben wurden insgesamt fünf Versuchsreihen nach Packungsanleitung und unter Abwandlung der Standardprotokolle der Hersteller durchgeführt. Hierbei sollte geprüft werden, ob mit vorgeschalteten Reaktionsschritten bzw. längerer Inkubationszeit das Hämoglobin oder seine Bestandteile aus dem Knochen gelöst werden und somit in Abhängigkeit des PMI positive Testergebnisse resultieren können. Vier Versuchsreihen erbrachten für alle Proben ein negatives Ergebnis und eine Versuchsreihe für alle Proben ein gleichermaßen schwach-positives Resultat.

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich konstatieren, dass die hier verwendeten Schnell-

tests, die auf dem Nachweis von Blut beruhen, zur Eingrenzung des postmortalen Intervalls von Knochenfunden trotz Abwandlung der Standardprotokolle nicht geeignet sind. Zur Frage des postmortalen Abbaus von Hämoglobin in Knochen sind weitere, grundlegende Untersuchungen notwendig.

6 Summary

With the goal of obtaining additional practically applicable methods for estimating the postmortem interval (PMI) of skeletal remains, 39 samples of human and five samples of domestic animal long bones with known PMI (PMI=0.2 to approximately 2000 years) were tested with two established methods (UV-fluorescence of a freshly sawn cross-section and the luminol test) and two screening tests (Hexagon-OBTI[®] test and Combur[®] test) that were being tried out in this context for the first time. The hypothesis underlying this experiment was the supposition that the PMI-related chemiluminescence of the luminol reaction for bone is based on the presence of persisting hemin from hemoglobin molecules in bone.

Our results showed that lack of luminescence and reduced UV-fluorescence were more meaningful results for estimating PMI and excluding forensic relevance than a positive luminol reaction or strong UV-fluorescence, as both of the latter findings revealed the limitations of these methods in this particular context. Particularly for cases showing a positive luminol reaction, the use of additional absolute dating methods may be indicated. Against our expectations, both the Combur[®] test strips and the Hexagon-OBTI[®] test, which were both devised to demonstrate blood, delivered negative results for all samples.

Therefore, in a second step of this serial experiment, five out of the 39 bone samples from five different epochs (also 0.2 to approximately 2000 years) were selected and tested again in a blind setup with the Hexagon-OBTI[®] test and additionally with the RSID[®] blood test, which was also originally developed for the identification of human blood. Five test series were conducted applying modified standard protocols of the manufacturers. The aim was to find out whether hemoglobin or its metabolites can be dissolved from the bone with prior reaction steps or a prolonged time of incubation and if positive test results can be achieved dependent on the PMI. Four test series yielded negative results for all bone samples and one test series gave a uniformly weak positive result.

It can be stated that rapid tests based on the detection of blood are not suitable for the determination of the PMI of bone samples despite the modification of the standard protocols. Further thorough research is required to clarify the postmortem degradation of hemoglobin in bones.

Literaturverzeichnis

- [1] ABACUS DIAGNOSTICS® (1999): ABACard® HemaTrace® for the forensic identification of human blood (product insert), catalog #708424
- [2] ANSTEE, DJ (1990): Blood group-active surface molecules of the human red blood cell. In: *Vox Sang* 58:1-20
- [3] ARMSTRONG, WG ; TARLO, LBH (1966): Amino acid components in fossil calcified tissues. In: *Nature* 210:481-482
- [4] BELL, LS ; SKINNER, MF ; JONES, SL (1996): The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. In: *Forensic Sci Int* 82:129-140
- [5] BERG, S ; PROTSCH VON ZIETEN, R (1998): Die Datierung von Skelettfunden. In: LEOPOLD, D (Hrsg.): *Identifikation unbekannter Toter*. Schmidt-Römhild, Lübeck, S. 107-128
- [6] BERG, S ; SPECHT, W (1958): Eine neue Technik als naturwissenschaftlicher Beitrag zur Altersbestimmung von Knochenfunden. In: *Arch Kriminol* 122:43-65
- [7] BERG, S ; SPECHT, W (1958): Untersuchungen zur Bestimmung der Liegezeit von Skeletteilen. In: *Dtsch Z Ger Med* 47:209-241
- [8] BONTE, W ; JOHANSSON, J ; GARBE, G ; BERG, S (1976): Die Bestimmung des Aminosäurespektrums als Hilfsmittel bei der Datierung von Skelettfunden. In: *Arch Kriminol* 158(5-6):163-174
- [9] BYERS, SN (2002): *Introduction to forensic anthropology - a textbook*. Allyn & Bacon, Boston
- [10] CASTELLANO, M ; VILLANUEVA, EC ; VON FRENCKEL, R (1984): Estimating the date of bone remains. A multivariate study. In: *J Forensic Sci* 29:527-534
- [11] CREAMER, JI ; BUCK, AM (2009): The assaying of haemoglobin using luminol chemiluminescence and its application to the dating of human skeletal remains. In: *Luminescence* 24:311-316

- [12] CREAMER, JI ; QUICKENDEN, TI ; APANAH, MV ; KERR, KA ; ROBERTSON, PA (2003): A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. In: *Luminescence* 18:193-198
- [13] DE WAEL, K ; LEPOT, L ; GASON, F ; GILBERT, B (2008): In search of blood - detection of minute particles using spectroscopic methods. In: *Forensic Sci Int* 180:37-42
- [14] EBACH, SC ; RAMSTHALER, F ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2010): Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben: Ein Vergleich der Luminolmethode, des Hexagon-OBTI[®]-Tests und des Combur[®]-Tests. In: *Arch Kriminol* 226(1-2):38-47
- [15] EBACH, SC ; RAMSTHALER, F ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2011): Die Anwendung des Hexagon-OBTI[®]-Tests und des RSID[®]-Bluttests im Kontext der Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben. In: *Arch Kriminol* 228(3-4):114-125
- [16] FÖLDES, V ; KÓSA, F ; VIRÁGOS-KIS, E ; RENGEI, B ; FERKE, A (1980): Atomabsorptions-spektrometrische Untersuchung des Gehaltes an anorganischen Substanzen von Skelettfunden zur Ermittlung der Dauer des Begrabenseins in der Erde. In: *Arch Kriminol* 166(3-4):105-111
- [17] GARDNER, B ; PARSONS, SF ; MERRY, AH ; ANSTEE, DJ (1989): Epitopes on sialogly-Coprotein α : evidence for heterogeneity in the molecule. In: *Immunology* 68:283-289
- [18] HAGLUND, WD ; SORG, M (1998): Method and theory of forensic taphonomy research. In: HAGLUND, WD ; SORG, M (Hrsg.): *Forensic taphonomy*. CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 13–26
- [19] HANSON, EK ; BALLANTYNE, J (2010): A Blue Spectral Shift of the Hemoglobin Soret Band Correlates with the Age (Time Since Decomposition) of Dried Bloodstains. In: *PLoS ONE* 5(9). – e12830. doi:10.1371/journal.pone.0012830
- [20] HERMON, D ; SHPITZEN, M ; OZ, C ; GLATTSTEIN, B ; AZOURY, M ; GAFNY, R (2003): The Use of the Hexagon OBTI Test for Detection of Human Blood at Crime Scenes and on Items of Evidence. Part I: Validation Studies and Implementation. In: *J Forensic Identification* 53:566-575
- [21] HOCHMEISTER, MN ; BUDOWLE, B ; SPARKES, R ; RUDIN, O ; GEHRIG, C ; THALI, M ; SCHMIDT, L ; CORDIER, A ; DIRNHOFER, R (1999): Validation

- studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. In: *J Forensic Sci* 44:597-602
- [22] HOLLEY, S ; FIEDLER, S ; GRAW, W (2008): Makroskopische Abschätzung des postmortalen Intervalls (PMI) und Ausschluss einer forensisch relevanten Liegezeit - ein Vergleich von Literaturangaben mit rezenten osteologischen Funden. In: *Arch Kriminol* 221(5-6):175-184
- [23] HUMAN GESELLSCHAFT FÜR BIOCHEMICA UND DIAGNOSTICA MBH (2006): Hexagon OBTI Immunochromatographic Test for Confirming the Presence of Human Blood Traces (product insert), REF HU-829
- [24] HUNGER, H (1978): Methoden zur Liegezeitbestimmung menschlicher Knochen. In: HUNGER, H ; LEOPOLD, D (Hrsg.): *Identifikation*. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, S. 63-99
- [25] INDEPENDENT FORENSICS: 4600 West Roosevelt Road, Hillside, IL 60162 (USA), brett@ifi-test.com
- [26] INTRONA, F J. ; DI VELLA, G ; CAMPOBASSO, CP (1999): Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. In: *J Forensic Sci* 44:535-538
- [27] JAROLIM, P ; LAHAV, M ; LIU, SC ; PALEK, J (1990): Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin. In: *Blood* 76:2125-2131
- [28] JARVIS, DR (1997): Nitrogen levels in long bones from coffin burials interred for periods of 26-90 years. In: *Forensic Sci Int* 85:199-208
- [29] LASSEN, C ; KAUP, L (2007): Forensische Untersuchung von Blut- und Sekretspuren, Epithelzellspuren, Urin, Kots Spuren, Haaren, Knochen, Zähnen sowie Vergleichsmaterial. In: HERMANN, B ; SATERNUS, K.-S. (Hrsg.): *Biologische Spurenkunde, Bd. 1: Kriminalbiologie*. Springer, Berlin, S. 259-278
- [30] MISENČIK, A ; LAUX, DL (2007): Validation Study of the Seratec HemDirect Hemoglobin Assay for the Forensic Identification of Human Blood. In: *Newsletter Spring*. - Midwestern Association of Forensic Science
- [31] MÜNNICH, KO (1960): Die C¹⁴-Methode. In: *Geologische Rundschau* 49:237-244

- [32] NEIS, P ; HILLE, R ; PASCHKE, M ; PILWAT, G ; SCHNABEL, A ; NIESS, C ; BRATZKE, H (1999): Strontium90 for determination of time since death. In: *Forensic Sci Int* 99:47-51
- [33] PATE, FD ; HUTTON, JT (1988): The use of soil chemistry data to address post-mortem diagenesis in bone mineral. In: *J Archaeol Sci* 15:729-739
- [34] PENNING, R ; RIEPERT, T (2003): Identifikation und forensische Osteologie. In: MADEA, B ; BRINKMANN, B (Hrsg.): *Handbuch gerichtliche Medizin*. Springer, Berlin/Heidelberg, Bd. II, S. 1117–1270
- [35] PRIETO, JL ; MAGANA, C ; UBELAKER, DH (2004): Interpretation of Post-mortem Change in Cadavers in Spain. In: *J Forensic Sci* 49:918-923
- [36] QUICKENDEN, TI ; CREAMER, JI (2001): A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. In: *Luminescence* 16:295-298
- [37] RACHMILEWITZ, EA ; PEISACH, J ; BLUMBERG, WE (1971): Studies on the Stability of Oxyhemoglobin A and Its Constituent Chains and Their Derivatives. In: *J Biol Chem* 246:3356-3366
- [38] RAMSTHALER, F ; EBACH, SC ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2011): Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI[®], and Combur[®] tests. In: *Forensic Sci Int* 209(1-3):59-63
- [39] RAMSTHALER, F ; KREUTZ, K ; ZIPP, K ; VERHOFF, MA (2009): Dating skeletal remains with luminol-chemiluminescence. Validity, intra- and interobserver error. In: *Forensic Sci Int* 187:47-50
- [40] RAUSCHKE, J (1951): Beitrag zur Frage der Altersbestimmung von Blutspuren. In: *Dtsch Z Ges Gerichtl Med* 40:578-584
- [41] ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH: Emil-Barell-Str. 1, 79639 Grenzach-Wyhlen (Deutschland), grenzach.allgemein@roche.com
- [42] SCHWARCZ, HP ; AGUR, K ; JANTZ, LM (2010): A New Method for Determination of Postmortem Interval: Citrate Content of Bone. In: *J Forensic Sci* 55(6):1516-1522
- [43] SCHWEERS, BA ; OLD, J ; BOONLAYANGOOR, PW ; REICH, KA (2008): Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (Rapid Stain Identification–Blood). In: *Forensic Sci Int Genet* 2(3):243-247

- [44] SERATEC® GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGIE MBH (2004): SERATEC® HemDirect Hemoglobin Assay (product insert). REF HbF07
- [45] SPECHT, W (1937): Die Chemilumineszenz des Hämins, ein Hilfsmittel zur Auf-
findung und Erkennung forensisch wichtiger Blutspuren. In: *Dtsch Z Gesamte
Gerichtl Med* 28:225-234
- [46] SWIFT, B ; LAUDER, I ; BLACK, S ; NORRIS, J (2001): An estimation of
the post-mortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace
element approach. In: *Forensic Sci Int* 117:73-87
- [47] TAYLOR, RE ; SUCHERY, JM ; PAYEN, CA ; SLOTA JR, PJ (1989): The use
of radiocarbon (C-14) to identify skeletal materials of forensic science interest.
In: *J Forensic Sci* 34:1196-1205
- [48] VERHOFF, MA ; KREUTZ, K (2002): *Forensische Anthropologie*. Lehmanns
Media, Berlin
- [49] VERHOFF, MA ; WIESBROCK, UO ; KREUTZ, K (2004): Makroskopische Be-
funde zum Ausschluss einer forensisch relevanten Liegezeit bei Knochenfunden
– eine Literaturlauswertung. In: *Arch Kriminol* 213(1-2):1-14
- [50] VERHOFF, MA (2008): *Forensische Osteologie – Problematische Fragestellun-
gen*. Lehmanns Media, Berlin
- [51] WEBER, K (1966): Die Anwendung der Chemilumineszenz des Luminols in
der gerichtlichen Medizin und Toxikologie. I. Der Nachweis von Blutspuren. In:
Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med 57:410-423
- [52] ZINKA, B ; KANDBINDER, R ; HAAS, G ; SCHUPFNER, R ; WOLFBEIS, O ;
GRAW, M (2011): Radionuklidanalyse von ²²⁸Th und ²²⁸Ra – Neue Methode
zur Liegezeitbestimmung. In: *Rechtsmedizin* 21(2):124-130
- [53] ZWEIDINGER, RA ; LYTLE, LT ; PITT, CG (1973): Photography of bloodstains
visualized by luminol. In: *J Forensic Sci* 18:296-302

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht-veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiats-erkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, den

Sarah Christina Kölzer

Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Verhoff für sein stets offenes Ohr und die vielen guten Ideen bedanken, die diese Arbeit überhaupt erst ins Rollen gebracht haben. Seine Begeisterung für dieses großartige Fachgebiet hat auch mich vom Anbeginn meiner Arbeit an angesteckt.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Team der Rechtsmedizin Gießen bedanken: Für die stets offenen Türen, die gute Laune und die familiäre Atmosphäre, in die ich ein Stück weit mit aufgenommen werden durfte. Hier gilt ein besonderer Dank Nicole Graf, Dr. Christoph „Birni“ Birngruber, Prof. Dettmeyer, Steffi Spahr, Regina Dickey und Dr. rer. nat. Freidoon Erdmann.

Meiner Familie möchte ich von Herzen danken, dass sie den Grundstein meines Weges gelegt hat, mich auf vielfältigste Weise unterstützt und immer an mich und meine Pläne und Ziele geglaubt hat. Dank euch darf ich meinen Traum leben.

Ein besonders großer Dank gilt meinem Mann Thomas, der mir von Anfang an immer zur Seite stand. Mit seinem informatischen Fachwissen, aber vor allem mit seiner grenzenlosen Geduld hat er alle Probleme immer meisterhaft gelöst und all meine Höhen und Tiefen bei der Entstehung dieser Arbeit mitgetragen.

Eigene Publikationen als Bestandteil der vorliegenden Arbeit

- (1) EBACH, SC ; RAMSTHALER, F ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2010): Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben: Ein Vergleich der Luminolmethode, des Hexagon-OBTI[®]-Tests und des Combur[®]-Tests. In: *Arch Kriminol* 226(1-2):38-47

- (2) RAMSTHALER, F ; EBACH, SC ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2011): Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI[®], and Combur[®] tests. In: *Forensic Sci Int* 209(1-3):59-63

- (3) EBACH, SC ; RAMSTHALER, F ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2011): Die Anwendung des Hexagon-OBTI[®]-Tests und des RSID[®]-Bluttests im Kontext der Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben. In: *Arch Kriminol* 228(3-4):114-125

- (1) EBACH, SC ; RAMSTHALER, F ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2010): Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben: Ein Vergleich der Luminolmethode, des Hexagon-OBTI[®]-Tests und des Combur[®]-Tests. In: *Arch Kriminol* 226(1-2):38-47

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Gießen¹
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. R. Dettmeyer)
und dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Frankfurt am Main²
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Bratzke)

Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben: Ein Vergleich der Luminolmethode, des Hexagon-OBTI®-Tests und des Combur®-Tests

Von

Sarah C. Ebach¹, Dr. med. **Frank Ramsthaler**²,
Dr. med. **Christoph G. Birngruber**¹ und Prof. Dr. med. **Marcel A. Verhoff**¹

(Mit 3 Abbildungen und 1 Tabelle)

1. Einleitung

Die Bestimmung des postmortalen Intervalls (PMI) von Knochenproben ist seit jeher eine große Herausforderung für die forensische Osteologie. Werden die menschlichen Überreste im Freien aufgefunden, ist es nahezu aussichtslos, eine konkrete Aussage zu treffen. Sogar bei durchgehender Bodenlagerung existiert eine große Zahl an kaum kalkulierbaren äußeren Einflüssen, die auf den Knochen und seine Zersetzung einwirken können [6, 12].

Dies führt dazu, dass eine korrekte Einschätzung des PMI oft nur sehr schwer oder gar nicht möglich ist. Selbst wenn man das Problem auf den Ein- oder Ausschluss des forensisch relevanten PMI von 50 Jahren reduziert, bleibt die Differenzierung schwierig [4, 12]. Liegemilieu-unabhängige Bestimmungen bzw. Schätzungen des PMI ermöglichen bislang nur Radionuklidmethoden. Diese sind jedoch aufwändig, teuer und nicht uneingeschränkt einsetzbar.

In der forensisch-osteologischen Analyse zur Schätzung des PMI steht am Anfang die makroskopische Untersuchung, an Langknochen mit Beurteilung der frischen Sägefläche und der Prüfung der UV-Reflexion an derselben [12]. Nachfolgen können mikroskopische Untersuchungen an Schliff- oder Schnittpräparaten, die jedoch wieder einen gewissen Zeitaufwand beinhalten. Einen weiteren Ansatz bieten che-

mische Analysen, wie z. B. die Prüfung der Anfärbbarkeit mithilfe von Indophenol und Nilblau [1] sowie die Fluoreszenzeigenschaften des Knochens [8].

Die sog. Luminolmethode wurde bereits 1937 von Specht [11] zur Erkennung von Blutspuren beschrieben. Später wurde der Luminoltest zur Schätzung des PMI an Knochenproben eingesetzt [5, 9]. Hierfür wird Knochenmehl eingesetzt, das beim Anfertigen eines frischen Sägeschnitts entsteht.

Es stellt sich die Frage, ob weitere Testverfahren, die eigentlich für den Nachweis von Blut konzipiert wurden, zur Schätzung des PMI eingesetzt werden können. In der forensischen Spurenkunde wurde lange Zeit der sog. Sangur®-Test verwendet [2, 7], der seit einigen Jahren nur noch als Kombinations-Teststäbchen Combur® (zur Prüfung auf Blut, Eiweiß, Glukose, Nitrit u. a.) angeboten wird. Eigentlich wurde das Teststäbchen für die Untersuchung von Urin entwickelt. Ein weiterer, ursprünglich für die klinische Medizin (Nachweis von okkultem Blut im Stuhl) konzipierter, jedoch in der forensischen Spurenkunde zum Blutnachweis eingesetzter Schnelltest ist der Hexagon-OBTI®-Test.

Das Prinzip des Hexagon-OBTI®-Tests basiert auf Antikörpern gegen humanes Hämoglobin. Die Nachweisgrenze beginnt laut Hersteller bereits bei 0,88 mg Hb/g Stuhl. Die Combur®-Teststäbchen enthalten organisches Wasserstoffperoxid, mit dem vorhandenes Hämoglobin die Indikatoroxidation katalysiert. Die Nachweisgrenze liegt hier sehr viel niedriger als beim Hexagon-OBTI-Test (0,03 mg Hb/dl Testsubstanz).

Im vorgestellten Experiment sollten die UV-Reflexion an der frischen Sägefläche sowie der Luminoltest, der Hexagon-OBTI®-Test und der Combur®-Test an Knochen mit bekanntem PMI nach Bodenlagerung eingesetzt und verglichen werden.

2. Material und Methoden

Zur Verfügung standen humane Langknochen von 16 Individuen, die nach der Beisetzung das vollständige PMI bis zum Auffinden im Erdlager verbracht hatten (Tab. 1). Die Feststellung des PMI war mithilfe der Ermittlungen und ggf. durch Identifizierung des Individuums erfolgt. In anderen Fällen – bei allen historischen Knochen – war die Absicherung bzw. Bestimmung des PMI durch eine Radiocarbonatierung erfolgt. Somit mussten in Tab. 1 für das PMI auch Zeitspannen bzw. ungefähre Zeiten eingetragen werden. Zum Vergleich wurden zwei nicht-menschliche Säugetierknochen mit untersucht.

Die überprüften Knochen waren nach ihrem Auffinden bis zur Untersuchung für das gegenständliche Experiment im Gießener Institut für Rechtsmedizin 1 bis 9 Jahre gelagert. Diese Latenzzeit (Tab. 1) wurde nicht zum PMI addiert. Die Lagerung war in einem speziellen Trockenraum bei 16–18 °C erfolgt. Nur in einem Fall (Ifd. Nr. 2) war der Knochen 30 Jahre lang im Asservatenraum einer Behörde gelagert worden, bevor er an das Institut für Rechtsmedizin überstellt wurde.

Die zu untersuchenden Knochen wurden lediglich mit einer randomisiert vergebenen, laufenden Nummer bezeichnet und waren somit für die Untersucher verblindet. An allen Knochen wurde für die Untersuchung ein frischer Sägeschnitt mit einer medizinischen Knochensäge gesetzt. Das dabei entstandene Sägemehl wurde für den Luminol-, den Hexagon-OBTI®- und den Combur®-Test eingesetzt.

Tab. 1: Ergebnisse der Luminolreaktion und des UV-Reflexions-Tests für alle untersuchten Individuen (lfd. Nr.). „Latenz“ bezeichnet die Zeit zwischen dem Auffinden und der aktuellen Untersuchung. Diese Zeit ist im PMI nicht mit berücksichtigt. PMI meint in diesem Zusammenhang den Zeitraum vom Todeseintritt bis zum Auffinden. „(R)“ hinter dem PMI-Wert steht für eine durchgeführte Radiocarbonatierung. T1 stammt von einem Schwein und T2 von einem Pferd.

Lfd. Nr.	Probe	Latenz [J.]	PMI [J.]	Luminol	UV-Reflexion
1	Tibia	1	ca. 200 (R)	+	Sandwicheffekt
2	Tibia	30	Ca. 50	+	Sandwicheffekt
3	Tibia	2	ca. 1000 (R)	-	Sandwicheffekt
4	vollst. Skelett	3	4	++	vollständig
5	Tibia	4	ca. 2000 (R)	-	noch minimale Reste
6	Femur	4	ca. 150	+	Sandwicheffekt
7	Femur	6	50–64	++	fleckige Reste
8	Femur	5	50–70	+++	fast vollständig
9	Humerus	5	0,2	++	vollständig
10	versch.	7	40	+	fleckige Reduktionen
11	Femur	3	5–20	+++	vollständig
12	Humerus	5	3	++	vollständig
13	Femur	3	145–160	++	nur noch geringe Reste
14	Ulna	7	37	++	vollständig
15	Humerus	2	ca. 1000 (R)	-	nur noch geringe Reste
16	Humerus	9	> 50	++	reduziert, angedeuteter Sandwicheffekt
T1	Humerus	2	2–5	+++	vollständig
T2	Femur	1	1–3	++	vollständig

Vor dem Setzen des Sägeschnitts wurde die Knochenoberfläche in der Schaftmitte jeweils mit frischem Schmirgelpapier gereinigt. Das Sägemehl wurde vollständig mit einem jeweils unbenutzten weißen DIN-A4-Papier aufgefangen und in ein Probenröhrchen gegeben. Die Beurteilung der UV-Reflexion erfolgte in einer Dunkelkammer mit einer UV-Lampe bei Wellenlängen von 254 nm und 366 nm.

Der Luminol-Test fand ebenfalls in der Dunkelkammer statt. In 19 Reagenzgläsern waren jeweils 10 ml einer frisch nach Weber [13] hergestellten Luminol-Lösung vorgelegt. Die Positivkontrolle erfolgte mit einem Tropfen Blut, der mit 2 Tropfen Wasserstoffperoxid eine maximale Fluoreszenz zeigte. Von jeder Knochenmehlprobe waren zuvor 50 mg abgewogen worden. Diese wurden nacheinander in die Luminollösung gegeben, mit 2 Tropfen Wasserstoffperoxid versetzt, mit einem Schraubdeckel verschlossen und geschüttelt. Die Intensität der Chemilumineszenz wurde zur besseren Abgrenzung in negativ (-), schwach positiv (+), positiv (++) und stark positiv (+++) eingeteilt. UV-Reflexion und Luminol-Test wurden von 2 Untersuchern (SCE und MAV) unabhängig voneinander beurteilt.

Für den Versuchsteil des Hexagon-OBTI®-Tests (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden) wurden die Behältnisse mit dem Tris-Puffer (pH = 7,5) aus dem Testkit mit 50 mg aus der jeweiligen Knochenpulverprobe befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde der Test weiter nach Herstellerangaben durchgeführt.

Das genaue Prinzip des Hexagon-OBTI®-Tests wurde von Hochmeister et al. [3] beschrieben. Die Positivkontrolle erfolgte mit einem Tropfen Blut.

Im Anschluss an den Hexagon-OBTI®-Test wurde in die übrig gebliebene Tris-Puffer-Lösung jeweils ein Combur®-Teststäbchen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für 3 Sekunden getaucht und die Färbung des unteren, auf Blut reagierenden Feldes mit der auf der Verpackung des Tests aufgedruckten Tafel verglichen.

3. Ergebnisse

Die Resultate des UV-Fluoreszenz- und des Luminol-Tests sind in Tab. 1 aufgeführt. Sowohl der Hexagon-OBTI®-Test als auch der Combur®-Test verliefen mit allen untersuchten Knochenproben negativ (Abb. 1 und 2). Die Positiv-Kontrollen erbrachten mit dem Luminol-, dem Hexagon-OBTI®- und dem Combur®-Test positive Ergebnisse.



Abb. 1: Hexagon-OBTI®-Test, links mit der Positivkontrolle und daneben zwei negative Ergebnisse aus der Versuchsreihe. Die Bande „C“ zeigt an, dass ausreichend Substrat aufgebracht und der Test nicht überlagert wurde. Zum Nachweis von humanem Blut muss sich eine Bande neben „T“ darstellen.

4. Diskussion

In der vorgestellten Versuchsreihe wurden 16 humane Knochenproben mit bekannter Liegezeit im Erdlager mit zwei zur Einschätzung des PMI etablierten Methoden (UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche und Luminol-Test) und zwei erstmals unter dieser Fragestellung eingesetzten Testverfahren (Hexagon-OBTI®-Test und Combur®-Test) verblindet untersucht.

Die UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche zeigte einen guten Zusammenhang des Ausmaßes der Reflexion mit dem PMI. Es bestätigte sich, dass diese Methode gut zum Ausschluss eines forensisch relevanten PMI von unter 50 Jahren geeignet ist [12]. Für diese Aussage ist jedoch eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz zu fordern. Wie der Fall mit lfd. Nr. 10 (Tab. 1) belegt, kann eine geringgradige Reduktion

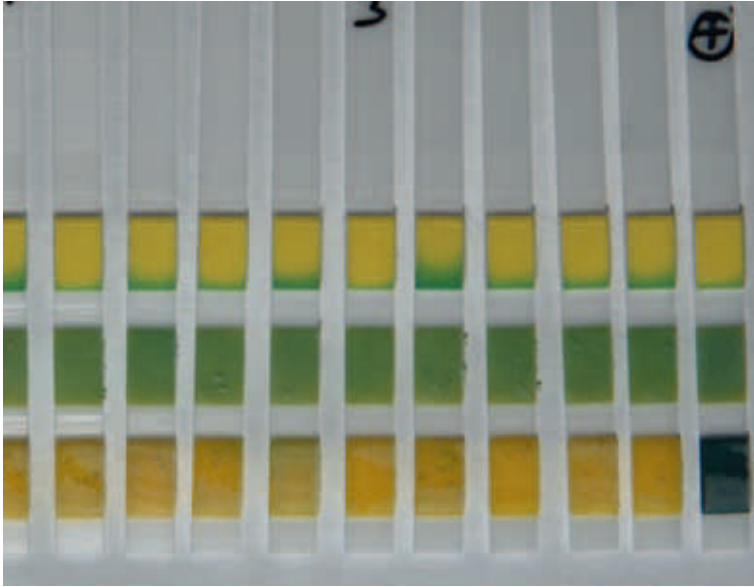


Abb. 2: Auswahl von Teststreifen des Combur®-Tests. Das unterste Feld zeigt Blut an. Rechts ist die Positivkontrolle platziert.

bereits nach 40 Jahren beobachtet werden. Umgekehrt wird man eine vollständige UV-Fluoreszenz als deutlichen Hinweis auf ein forensisch relevantes PMI ansehen müssen.

Der Luminol-Test verlief bei den jüngeren Knochenproben (PMI < 20 Jahre) positiv (++) bis stark positiv (+++). Im kritischen Zeitraum von 50–150 Jahren zeigten nahezu alle Proben eine schwach-positive (+) bis positive (++) Reaktion. Im PMI-Intervall von mehr als 100, jedoch deutlich weniger als 1000 Jahren standen nur 3 Proben zur Verfügung (lfd. Nr. 1, 6 und 13), wobei das längste PMI 200 Jahre betrug. Dass sich in dieser Gruppe jeweils ein positiver Luminol-Test zeigte, ist aufgrund der ungenügenden Probenzahl sehr kritisch zu bewerten. Unter demselben Aspekt sind die 3 historischen Knochenproben mit einem PMI von zweimal etwa 1000 und einmal ca. 2000 Jahren zu betrachten, bei denen der Luminol-Test durchgehend negativ verlief. Diese Ergebnisse können jedoch als Hinweis darauf gewertet werden, dass ein positiver Luminol-Test eine kurze Liegezeit nicht beweist, ein negativer jedoch eine höhere Aussagekraft bezüglich des Ausschlusses eines forensisch relevanten PMI besitzt.

Der Combur®- und der Hexagon-OBTI®-Test sind eigentlich für den Nachweis von Blut entwickelt worden, wobei der Hexagon-OBTI®-Test humanspezifisch sein soll. Beide Tests verliefen für alle untersuchten

Proben von Knochenmehl negativ. Dass die Tests funktionstüchtig waren, konnte anhand der Positivkontrollen belegt werden. Um auszuschließen, dass die gewählte Menge an Knochenpulver zu gering war, wurde mit jener Probe, die bei der Luminol-Testreihe die stärkste Lumineszenz gezeigt hatte (lfd. Nr. 8), der Hexagon-OBTI®-Test mit der zehnfachen Menge an Knochenpulver, also 500 mg, wiederholt. Auch dieser Ansatz verlief negativ. Ebenso war der Test an Knochenproben von Schwein und Pferd negativ, was bei der deklarierten Humanspezifität des Hexagon-OBTI®-Test nicht verwunderte.

Die im Anschluss durchgeführte Testreihe mit den Combur®-Teststäbchen erbrachte ebenfalls bei keiner der verwendeten Knochenproben ein positives Ergebnis für Hämoglobin.

Es stellt sich zunächst die Frage, welcher Bestandteil der Knochen die Chemilumineszenz bei der Luminol-Reaktion hervorruft. Bereits 1937 beschrieb Specht die Hämine als die entscheidenden Katalysatoren der Luminolreaktion [11]. Experimentell fand er heraus, dass die Chemilumineszenz umso intensiver ausfiel, je älter die Blutspur war. Es wirke das aus dem Blut im Laufe der Alterung abgespaltene Hämatin. Auch Weber [13] sah Häminproteine, z.B. Methämoglobin, als Katalysatoren der Luminolreaktion an, obgleich es für die Reaktion selbst zunächst gleichgültig ist, ob frisches oder altes Blut vorhanden ist, da durch die alkalische Komponente des Luminolreagens das vorhandene Hämoglobin rasch in Methämoglobin umgewandelt wird.

Die Empfindlichkeit der Luminol-Reaktion (entspricht der Grenzkonzentration von Blut) wird von Weber [13] mit 1:10.000.000, von Introna et al. [5] und Zweidinger et al. [14] in einer Spanne von 1:10.000 bis 1:5.000.000 angegeben. Mit dem Luminol-Test allein lässt sich also nicht ausschließen, dass in den Knochen womöglich doch Hämoglobin enthalten ist. Berücksichtigt man jedoch die durchweg negativen Ergebnisse des Hexagon-OBTI®-Tests und des Combur®-Tests, spricht dies zunächst für die Annahme, dass in den Knochen kein Hämoglobin als solches enthalten gewesen sein kann, da beide Tests ausschließlich Hämoglobin messen und dies sogar noch in sehr geringen Konzentrationen. Eine „Fehlfunktion“ der Tests wurde durch die Positiv-Kontrolle mit frischem Blut ausgeschlossen. Es stellt sich also die Frage, ab welchem Zeitpunkt kein Hämoglobin im Knochen mehr nachweisbar ist. Das wenige Monate alte Asservat aus unserer Versuchsreihe (lfd. Nr. 9) zeigte keinerlei Reaktion mehr auf Hämoglobin, weder im Combur®-Test noch im Hexagon-OBTI®-Test.

Unsere Literaturrecherche ergab hierzu, dass Hämoglobin bereits nach wenigen Tagen in Methämoglobin umgewandelt werden soll [14]; diese Angabe bezieht sich aber auf die Altersbestimmung von Blutspuren in lufthaltigem Milieu. Einen weiteren Ansatzpunkt liefern Hochmeister et al. [3] in ihrer Validierungsstudie über den Hexagon-

OBTI®-Test von 1999. Sie fanden heraus, dass selbst 15 Jahre alte menschliche Blutspuren, die über diesen Zeitraum bei Raumtemperatur, auf Stoff befindlich, gelagert worden waren, mit dem Hexagon-OBTI®-Test positiv reagierten, obgleich das Hämoglobin sich bei 5 der 8 Proben zunächst nicht in Wasser oder Tris-Puffer lösen ließ, sondern nur mithilfe von 5 %-iger Ammoniak-Lösung. Die Autoren folgerten, dass bei alten Blutproben das Ammoniak möglicherweise benötigt wird, um altes Hämoglobin zu lösen.

Weiterhin ergab diese Studie, dass der Hexagon-OBTI®-Test nicht ausschließlich auf Blut reagiert, sondern auch auf einige andere getestete menschliche Proben wie Speichel, Urin, Stuhl, Vaginalsekret und Sperma. Auch Muskelgewebe reagierte positiv. Des Weiteren testeten sie Blutspuren und Muskelproben, die über einen Monat unter verschiedensten Bedingungen gelagert waren (u.a. vergraben im Erdboden in 50 cm Tiefe); auf diese reagierte der Hexagon-OBTI®-Test ebenfalls positiv. Demnach erscheint es nicht abwegig, dass Knochen aus unserer Versuchsreihe (zumindest die mit kürzerem PMI) positiv im Hexagon-OBTI®-Test hätten reagieren können.

Ein weiterer Diskussionspunkt könnte darin bestehen, dass das Knochenmehl womöglich nicht lange genug im Tris-Puffer inkubiert war, so dass das Hämoglobin herausgelöst werden konnte, denn Hochmeister et al. lösten ihre Testsubstanzen 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und nicht – wie in der Herstelleranleitung für Stuhlproben angegeben – nur 5 Minuten.

Was die durchweg negativen Ergebnisse des Combur®-Tests angeht, ist außerdem zu diskutieren, ob es – wie beim Hexagon-OBTI®-Test – daran lag, dass sich das Hämoglobin nicht im Tris-Puffer lösen ließ. Da die Nachweisgrenze für Hämoglobin noch sehr viel niedriger ist (0,03 mg Hb/dl) als beim Hexagon-OBTI®-Test (0,88 mg Hb/g), halten wir es für unwahrscheinlich, dass es an einer zu geringen Hämoglobin-Menge im Knochen lag. Insofern wäre eine experimentelle Weiterführung für unsere Fragestellung von Nutzen. So wäre es interessant, den Hexagon-OBTI®-Test und den Combur®-Test noch einmal mit Knochenasservaten durchzuführen, die sich hinsichtlich ihres PMI innerhalb des forensisch relevanten Zeitraums von 50 Jahren befinden, sowie deren Knochenmehl mit Ammoniaklösung zu versetzen (in Analogie zu Hochmeister et al. [3]), und zwar mit einer viel längeren Inkubationszeit als in der gegenständlichen Versuchsreihe. Offen ist, ob nicht auch Hämoglobin-Abbauprodukte eine positive Reaktion beim Hexagon-OBTI®-Test hervorrufen können.

Rauschke fand 1951 in seinem Experiment zur Altersbestimmung von Blutspuren [10] heraus, dass sich in allen untersuchten Blutproben bereits nach 19–24 Stunden ein deutlicher Methämoglobinnachweis erbringen ließ; lediglich in den Proben, die im Kühlschrank oder in einer verschlossenen Flasche gelagert worden waren, ließ sich mit den damaligen Methoden (einfaches Spektroskop) selbst nach Monaten noch kein Methämoglobin nachweisen. Inwiefern sich diese Erkenntnisse auf den Hämoglobinabbau im Knochen übertragen lassen, bleibt zu untersuchen. Die uns zugängliche Literatur lieferte zu dieser Fragestellung keine Erkenntnisse.

Die Probe mit der stärksten Reaktion im Luminol-Test war das Femur mit der lfd. Nr. 8. Hier fiel auf, dass die Markhöhle vollständig mit

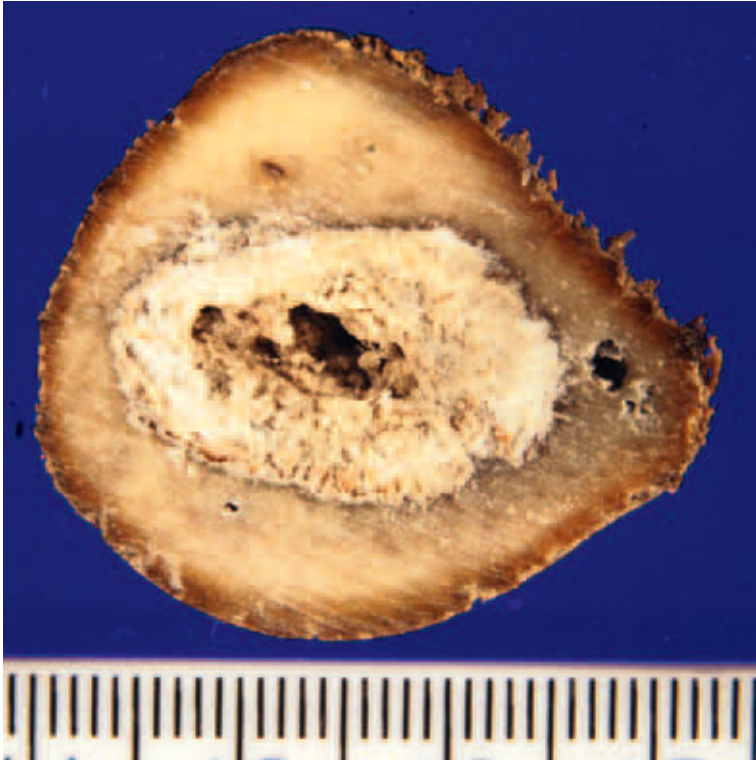


Abb. 3: Frische Sägefläche des Femurs (lfd. Nr. 8). Der Markraum ist nahezu vollständig von Fettwachs ausgefüllt.

Fettwachs ausgefüllt war (Abb. 3). Ein möglicher, noch zu prüfender Erklärungsansatz wäre, dass die Hämine bzw. Hämiproteide so gut im Fettwachs eingeschlossen sind, dass diese noch nach einer Liegezeit von Jahrzehnten eine sehr ausgeprägte Reaktion auf Luminol zeigen.

5. Fazit für die Praxis

Die UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche und der Luminol-Test haben nach wie vor eine große Bedeutung für die Schätzung des PMI, insbesondere hinsichtlich des Vorliegens eines forensisch relevanten PMI. Der Combur®-Test und der Hexagon-OBTI®-Test sind mit Standardprotokollen nicht zur Eingrenzung bzw. Einschätzung des PMI geeignet. Es sollte künftig untersucht werden, ob mit vorgeschalteten Präparations- bzw. Reaktionsschritten Hämoglobin oder dessen Abbauprodukte aus dem Knochenmehl herausgelöst und danach positive Ergebnisse in den beiden Tests erreicht werden können.

Zusammenfassung

In einer Versuchsreihe wurden 16 humane Knochen mit bekanntem Postmortal-Intervall (PMI) im Erdlager (0,2 bis ca. 2000 Jahre) mit zwei zur Einschätzung des PMI etablierten Methoden (UV-Fluoreszenz an der frischen Sägefläche und Luminol-Test) und mit zwei erstmals für diese Fragestellung eingesetzten Methoden (Hexagon-OBTI®-Test und Combur®-Test) verblindet untersucht.

Die Ergebnisse bestätigten die große Bedeutung der UV-Fluoreszenz und des Luminol-Tests bei der Schätzung des PMI und insbesondere bei der Frage nach dem Vorliegen eines forensisch relevanten PMI. Die eigentlich für den Nachweis von Blut konzipierten Combur®-Teststreifen und der Hexagon-OBTI®-Test lieferten bei allen Proben ein negatives Ergebnis. Ob dies darauf zurückzuführen ist, dass sich möglicherweise noch vorhandenes Hämoglobin bzw. seine Abbauprodukte im verwendeten Tris-Puffer nicht lösen ließen, bleibt weiter zu untersuchen.

Schlüsselwörter: Forensische Osteologie – Postmortales Intervall – Luminol-Test

Determining the postmortem interval of bone samples: a comparison of luminol chemiluminescence, Hexagon OBTI® test, and Combur® test

Summary

In the experiment, 16 human bones with known postmortem interval (PMI) that had been buried in soil (0.2 to about 2000 years) were tested in a blind setup with two established methods for determining the PMI (UV fluorescence of the surface of a fresh cut and the luminol chemiluminescence) and with two methods applied for this purpose for the first time (Hexagon OBTI® test and Combur® test).

The results underline the importance of the UV fluorescence and luminol tests in determining the PMI, especially with regard to the question whether the PMI is forensically relevant or not. The results for both new methods, the Combur® test strips and the Hexagon OBTI® test, which were originally developed for the detection of hemoglobin, were negative for all samples. It remains to be seen if the negative results for these two methods may be due to an inability of hemoglobin or its metabolites to dissolve in the Tris buffer solution used in the experiment.

Keywords: Forensic anthropology – Postmortem interval – Luminol chemiluminescence

Literatur

1. Berg, S., Specht, W. (1958): Untersuchungen zur Bestimmung der Liegezeit von Skeletteilen. Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med. **47**: 209-241
2. De Wael, K., Lepot, L., Gason, F., Gilbert, B. (2008): In search of blood – Detection of minute particles using spectroscopic methods. Forensic Sci. Int. **180**: 37-42
3. Hochmeister, M. N., Budowle, B., Sparkes, R., Rudin, O., Gehrig, C., Thali, M., Schmidt, L., Cordier, A., Dirnhofer, R. (1999): Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. J. Forensic Sci. **44**: 597-602
4. Holley, S., Fiedler, S., Graw, W. (2008): Makroskopische Abschätzung des postmortalen Intervalls (PMI) und Ausschluss einer forensisch relevanten Liegezeit – ein Vergleich von Literaturangaben mit rezenten osteologischen Funden. Arch. Kriminol. **221**: 175-184
5. Introna, F. Jr., Di Vella, G., Campobasso, C. P. (1999): Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. J. Forensic Sci. **44**: 535-538
6. Kreutz, K., Verhoff, M. A. (2002): Forensische Anthropologie. Lehmanns (Berlin)

7. Lassen, C., Kaup, L. (2007): Forensische Untersuchung von Blut- und Sekretspuren, Epithelzellspuren, Urin, Kots Spuren, Haaren, Knochen, Zähnen sowie Vergleichsmaterial. In: Hermann, B., Saternus, K.-S.: Biologische Spurenkunde, Band 1: Kriminalbiologie. Springer (Berlin), S. 259-278
8. Neckermann, A. (1950): Todeszeitbestimmung an menschlichen Knochen. Inaug.-Diss. Med. (Erlangen)
9. Ramsthaler, F., Kreutz, K., Zipp, K., Verhoff, M. A. (2009): Dating skeletal remains with luminal-chemiluminescence. Validity, intra- and interobserver error. *Forensic Sci. Int.* **187**: 47-50
10. Rauschke, J. (1951): Beitrag zur Frage der Altersbestimmung von Blutspuren. *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.* **40**: 578-584
11. Specht, W. (1937): Die Chemilumineszenz des Hämins, ein Hilfsmittel zur Auffindung und Erkennung forensisch wichtiger Blutspuren. *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.* **28**: 225-234
12. Verhoff, M. A., Wiesbrock, U. O., Kreutz, K. (2004): Makroskopische Befunde zum Ausschluss einer forensisch relevanten Liegezeit bei Knochenfunden – eine Literaturauswertung. *Arch. Kriminol.* **213**: 1-14
13. Weber, K. (1966): Die Anwendung der Chemilumineszenz des Luminols in der gerichtlichen Medizin und Toxikologie. I. Der Nachweis von Blutspuren. *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.* **57**: 410-423
14. Zweidinger, R. A., Lytle, L. T., Pitt, C. G. (1973): Photography of bloodstains visualized by luminol. *J. Forensic Sci.* **18**: 296-302

Anschrift für die Verfasser:

Prof. Dr. med. Marcel A. Verhoff
c/o Institut für Rechtsmedizin der Justus-Liebig-Universität
Frankfurter Straße 58
D-35392 Gießen

- (2) RAMSTHALER, F ; EBACH, SC ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA (2011): Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI[®], and Combur[®] tests. In: *Forensic Sci Int* 209(1-3):59-63

Druckfreigabe wurde vom Verlag bisher nicht erteilt.

- (3) EBACH, SC ; RAMSTHALER, F ; BIRNGRUBER, CG ; VERHOFF, MA
(2011): Die Anwendung des Hexagon-OBTI®-Tests und des RSID®-Bluttests
im Kontext der Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben.
In: *Arch Kriminol* 228(3-4):114-125

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Gießen¹
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. R. Dettmeyer)
und dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Frankfurt am Main²
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Bratzke)

Die Anwendung des Hexagon-OBTI®-Tests und des RSID®-Bluttests im Kontext der Bestimmung des postmortalen Intervalls von Knochenproben

Von

Sarah C. Ebach¹, Dr. Frank Ramsthaler², Dr. med. Christoph G. Birngruber¹
und Prof. Dr. med. **Marcel A. Verhoff¹**

(Mit 5 Abbildungen und 1 Tabelle)

1. Einleitung

Die Bestimmung des postmortalen Intervalls (PMI) an menschlichen Knochenfunden ist ein wesentlicher Bestandteil in der forensisch-osteologischen Begutachtung [24] und nach wie vor eine große Herausforderung. Die äußeren Einflüsse, die auf den Knochen und seine Zersetzung einwirken können, sind selbst bei durchgehender Bodenlagerung kaum kalkulierbar [15, 25]. Auch wenn man die Schätzung lediglich auf den möglichen Ausschluss eines forensisch relevanten postmortalen Intervalls (PMI) von 50 Jahren beschränkt, gibt es dennoch kaum eine Möglichkeit, das PMI mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden [5, 19] exakt zu bestimmen, wenngleich neuere Radionuklidmethoden wie z. B. die Radionuklidanalyse von ²²⁸Th und ²²⁶Ra möglicherweise ein hohes forensisches Potenzial besitzen [26]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, vorhandene postmortale Verletzungen zur Liegezeiteingrenzung heranzuziehen [23]. Die Luminol-Methode erwies sich in vorangegangenen Studien [13, 18] als alleinige Methode zur Schätzung eines forensisch relevanten PMI als nur eingeschränkt valide, da u. a. die Wahrscheinlichkeit für ein falsch-negatives Ergebnis im Kontext forensischer Fragestellungen zu hoch ist. Sie ist jedoch in der Kombination mit anderen Verfahren sehr wertvoll, da die Intensität der Chemilumineszenz einen guten Zusammenhang mit dem PMI zeigt [5, 18, 19].

In der forensischen Spurenkunde sind Schnelltests etabliert, mit denen man geringste Mengen menschlichen Blutes feststellen kann und die in vielen Fällen auf dem Nachweis von Hämoglobin basieren [1, 9, 21]. Es stellt sich die Frage, ob diese Testverfahren für die Bestimmung des PMI von Knochenproben geeignet sein könnten. Die Entwicklung eines günstigen, einfachen und schnellen Tests, der sicher zwischen forensisch relevanten und nicht-relevanten Knochenfunden unterscheiden kann, wäre von großer Bedeutung.

Bei der vorliegenden Versuchsreihe handelt es sich um ein Fortsetzungsexperiment. In den ersten beiden Teilen der Versuchsreihe [5, 19] wurden an insgesamt 39 humanen Langknochen mit bekanntem PMI nach Bodenlagerung die Luminol-Methode, die UV-Fluoreszenz der Sägefläche, der Combur®-Test und der Hexagon-OBTI®-Test angewandt und auf ihre Aussagekraft für die Abschätzung des PMI überprüft.

Die Fortsetzung des Experiments sollte die Ursache der durchgehenden negativen Ergebnisse des Hexagon-OBTI®-Tests aufklären helfen. Der Hexagon-OBTI®-Test ist eigentlich für den Nachweis okkulten Blutes in der Kolon-Karzinom-Vorsorge entwickelt worden, wird in der forensischen Spurenkunde aber auch als Schnelltest zum Blutnachweis eingesetzt [8]. Sein Testprinzip basiert auf spezifischen Antikörpern gegen humanes Hämoglobin und die Nachweisgrenze beginnt laut Hersteller bereits bei 0,88 mg Hb/g Stuhl bzw. Testsubstanz.

Im vorliegenden Experiment sollte der Hexagon-OBTI®-Test nicht nach den Angaben des Herstellers durchgeführt werden, sondern in denselben Varianten wie von Hochmeister et al. in ihrer Validierungsstudie beschrieben [10].

Als weiterer Schnelltest, der zum Nachweis geringster Spuren menschlichen Blutes entwickelt wurde, stand der RSID®-Bluttest [12] zur Verfügung. Sein Testprinzip beruht wie beim Hexagon-OBTI®-Test auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der RSID®-Schnelltest enthält allerdings keinen Antikörper gegen Hämoglobin, sondern zwei Antikörper gegen Glykophorin A, ein spezifisches Membranprotein auf Erythrozyten [2]. Jeder der beiden Antikörper erkennt ein Epitop auf dem Glykophorin A-Protein [6]. Hier liegt die Sensitivität bei 1 µl menschlichen Blutes. Nach der Intention des Herstellers soll ein positives Testergebnis mit der Wahrscheinlichkeit, ein DNA-STR-Profil zu erhalten, korrelieren [1, 9, 21].

Für die insgesamt fünf Versuchsreihen wurden in Anbetracht der bislang durchweg negativen Resultate mit dem Hexagon-OBTI®-Test aus den uns zur Verfügung stehenden 39 Langknochen nur einzelne ausgewählt, die jeweils einen bestimmten Liegezeitraum vertreten. Die Fragestellung war, ob der Hexagon-OBTI®-Test mit abgewandelten Test-Protokollen oder der RSID®-Bluttest geeignet sind, bei bodengelagerten Knochenproben ein forensisch relevantes PMI anzuzeigen.

2. Material und Methoden

Untersucht wurden jeweils 50 mg Knochenmehl von humanen Langknochen von 5 Individuen, die während des gesamten PMI bis zur Auffindung im Erdlager verblieben waren. Mit dem Hexagon-OBTT®-Test wurde eine zusätzliche Probe untersucht (Tab. 1). Die Feststellung des PMI war aufgrund der Ermittlungen und ggf. der Identifizierung des Individuums erfolgt. Im Falle eines historischen Knochens war die Eingrenzung des PMI durch eine Radiocarbonatierung vorgenommen worden [5, 19]. Somit mussten für das reale PMI immer wieder Zeitspannen bzw. ungefähre Zeiten eingetragen werden. Die untersuchten Knochen waren nach ihrem Auffinden bis zur Untersuchung für das vorliegende Experiment im Gießener Institut für Rechtsmedizin 1 bis 8 Jahre gelagert. Diese Latenzzeit (Tab. 1) wurde nicht zum PMI addiert. Die Lagerung erfolgte in einem speziellen Trockenraum bei 16–18 °C. Vor dem Setzen des Sägeschnitts wurde die Knochenoberfläche in der Schaftmitte jeweils mit frischem Schmirgelpapier gereinigt. Beim Setzen des Sägeschnitts wurde das dabei entstehende Knochenmehl mit einem sauberen, unbenutzten DIN-A4-Papier aufgefangen und in Probenröhrchen gefüllt.

Tab. 1: Ergebnisse des Hexagon-OBTT®-Tests und des RSID®-Bluttests für alle untersuchten Individuen (lfd. Nr.). Die Latenz meint die Zeit zwischen dem Auffinden und der aktuellen Untersuchung. Diese Zeit ist im angegebenen PMI nicht berücksichtigt. PMI bedeutet in diesem Fall den Zeitraum vom Todeseintritt bis zum Auffinden. (R) hinter dem PMI-Wert steht für eine durchgeführte Radiocarbonatierung. Für den RSID®-Bluttest erfolgte eine neue Nummerierung.

* nicht untersucht

Probe	Reales PMI [J.]	Latenzzeit [J.]	Hexagon-OBTT®-Test a) + b)		RSID®-Bluttest c)	RSID®-Bluttest d) + e)	
Femur	50–70	6	#1	–	*	*	
Femur	50–64	7	#2	–	schwach +	#1	–
Tibia	Ca. 200	2	#3	–	schwach +	#2	–
Humerus	0,2	6	#4	–	schwach +	#3	–
Tibia	Ca. 2000 (R)	5	#5	–	schwach +	#4	–
versch.	40	8	#6	–	schwach +	#5	–

Der erste Teil des Experiments bestand in der Wiederholung des Hexagon-OBTT®-Tests nach Hochmeister et al. [10], die in ihrer Validierungsstudie des Hexagon-OBTT®-Tests diesen nicht nach Packungsanleitung des Herstellers, sondern a) mit längerer Inkubationszeit (2 Stunden statt 5 Minuten) und b) zusätzlich mit 5%iger Ammoniak-Lösung durchführten. Die zu untersuchenden Knochenproben wurden mit einer laufenden Nummer versehen und waren für die Untersucher verblindet.

- a) Hierzu wurden jeweils 50 mg des Knochenmeihls abgewogen und in 2 ml-Eppendorf-Gefäße gefüllt. Anschließend wurden 0,5 ml des Tris-Puffers aus dem Testkit dazugegeben und das Ganze bei Raumtemperatur 2 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden 100 µl des Überstandes auf das Testfeld des Hexagon-OBTT®-Tests gegeben. Das Ergebnis wurde nach 10 Minuten abgelesen.
- b) 50 mg des Knochenmeihls wurden auf ein Uhrglas gegeben, mit 0,5 ml 5%iger Ammoniak-Lösung vermischt und 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Verdunstungsprozess mit einem handelsüblichen Föhn beschleunigt und das getrocknete Knochenmehl mit 100 µl Tris-Puffer versetzt. Im letzten Schritt wurden diese 100 µl mit möglichst wenig Knochenmehl mit einer Pipette aufgenommen und auf das Testfeld gegeben. Nach 10 Minuten wurde das Ergebnis abgelesen.

Der RSID®-Bluttest wurde mit 50 mg des Knochenmeihls durchgeführt, das c) nach Standardprotokoll des Herstellers, jedoch mit dem Puffer des Hexagon-OBTT®-Tests, d) mit

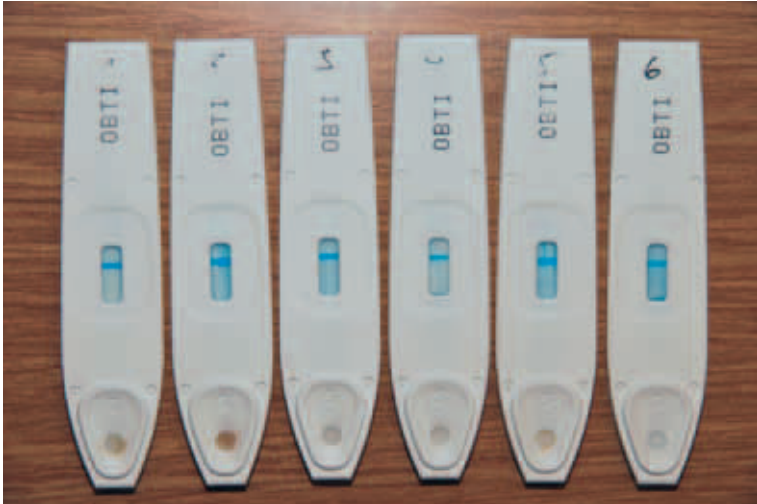


Abb. 1: Hexagon-OBTI®-Test mit negativem Ergebnis bei allen 6 untersuchten Knochenproben. Die Bande „C“ ist der Kontrollstreifen, der anzeigt, dass ausreichend Substrat aufgebracht wurde. Im Falle des Vorliegens von menschlichem Hämoglobin wäre eine Bande neben „T“ zu sehen gewesen.



Abb. 2: RSID®-Bluttest, durchgeführt mit dem Puffer des Hexagon-OBTI®-Tests. Hier zeigt sich bei allen Proben ein schwach positives Ergebnis. Analog zum Hexagon-OBTI®-Test sind hier der Kontrollstreifen („C“) und der Teststreifen („T“) zu erkennen, wobei sich „T“ deutlich schwächer zeigt als „C“.



Abb. 3 und 4: RSID®-Bluttest nach Standardprotokoll (Abb. 3) und mit 5%iger Ammoniaklösung (Abb. 4). Hier blieb in beiden Varianten ein positives Ergebnis aus, zu erkennen am fehlenden Teststreifen „T“.

dem dazugehörigen Puffersystem und *e*) wie beim Hexagon-OBTI®-Test vorher in 0,5 ml 5%iger Ammoniak-Lösung inkubiert wurde. Die Positiv-Kontrolle erfolgte nach Packungsanleitung mit frischem Blut.

- c) 100 µl des Überstands aus a) wurden auf das Testfeld des RSID®-Bluttests gegeben; das Ergebnis wurde nach 10 Minuten abgelesen.
- d) 50 mg des Knochenmehls wurden mit 200 µl des Extraktionspuffers in 2-ml-Eppendorfgläsern eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, bei 13.000 rpm 3 Minuten zentrifugiert und 20 µl des Überstands in ein neues Eppendorfglas gefüllt. Anschließend wurden 80 µl des Laufpuffers zu den 20 µl des Überstands gegeben, gemischt und diese 100 µl auf dem Testfeld aufgebracht. Nach 10 Minuten wurde das Ergebnis abgelesen.

- e) 50 mg des Knochenmehls wurden – wie beim Hexagon-OBTT®-Test oben beschrieben – auf einem Uhrglas mit 0,5 ml 5%iger Ammoniak-Lösung 30 Minuten inkubiert. Nach Verdunstung der Flüssigkeit (mit Hilfe eines Föhns) wurden 200 µl des Extraktionspuffers hinzugegeben. Zuletzt wurden auch hier 20 µl des Überstands mit 80 µl Laufpuffer in einem separaten Eppendorfgesäß gemischt und anschließend auf das Testfeld verbracht. Nach 10 Minuten wurde das Ergebnis abgelesen.

3. Ergebnisse

Nur in der Testphase (c) (Beschreibung siehe oben), bei der der Puffer des Hexagon-OBTT®-Tests für den RSID®-Bluttest verwendet wurde, zeigten alle untersuchten Proben ein schwach positives Ergebnis. Die übrigen vier Testvarianten lieferten jeweils negative Ergebnisse für alle Proben, sowohl beide Varianten des Hexagon-OBTT®-Tests als auch die beiden des RSID®-Bluttests (Tab. 1). Die Positiv-Kontrolle erbrachte für den RSID®-Bluttest ein positives Ergebnis. Im Falle des Hexagon-OBTT®-Tests wurde auf Positiv-Kontrollen verzichtet, da diese bereits in den ersten Versuchsreihen positiv verlaufen waren [5, 19].

4. Diskussion

In den vorgestellten Experimenten wurden Knochenproben aus 5 verschiedenen Liegezeitperioden (Tab. 1) mit dem Hexagon-OBTT®-Test und dem RSID®-Bluttest auf das Vorliegen von Hämoglobin bzw. Glykophorin A untersucht. Ziel der Untersuchung war, die Frage zu beantworten, ob Aussagen über das PMI bzw. das Vorliegen eines forensisch relevanten PMI von 50 Jahren möglich sind.

In den vorangegangenen Experimenten [5, 19] war der Hexagon-OBTT®-Test nach Standardprotokoll des Herstellers an 39 Knochenproben durchgeführt worden und hatte für alle Knochenproben ein negatives Ergebnis erbracht. In der Validierungsstudie des Hexagon-OBTT®-Tests von Hochmeister et al. konnte – allerdings für Blutspuren – nachgewiesen werden, dass noch an 15 Jahre alten Blutspuren ein positives Testergebnis erzielt werden kann [10]. Voraussetzungen waren eine Verlängerung der vom Hersteller angegebenen Inkubationszeit (5 Minuten) auf 2 Stunden oder die vorherige Lösung der Blutspur in 5%iger Ammoniak-Lösung. Bei Hochmeister et al. konnten alle älteren Blutspuren mit dem zusätzlichen Schritt der Ammoniak-Lösung positiv getestet werden, die mit dem Standardprotokoll (aber bei verlängerter Inkubationszeit) noch negativ gewesen waren [10]. Geht man davon aus, dass zumindest die jüngeren der von uns getesteten Knochenproben noch Bestandteile von Hämoglobin enthalten haben müssten, wäre hier wenigstens bei Versuchsreihe (b) ein positives Ergebnis zu erwarten gewesen.

Ein weiterer Schnelltest, der sog. SERATEC® HemDirect Hämoglobintest [21], der wie der Hexagon-OBTT®-Test ursprünglich entwickelt wurde, um okkultes Blut im Stuhl nachzuweisen, aber in der Forensik auch zur Identifikation menschlicher Blutspuren eingesetzt wird, wurde von Misencik et al. in einer Validierungsstudie [16] erfolgreich getestet. Sogar 31 Jahre alte Blutspuren waren nach 24-stündiger Inkubationszeit im Puffer positiv, was als weiterer Hinweis auf die lange Stabilität des Hämoglobins gewertet werden kann [16].

Dass trotz der Abwandlung des Standardprotokolls beim Hexagon-OBTI®-Test die vorliegenden Experimente negativ ausfielen, erhärtet den Verdacht, dass nicht mehr Hämoglobin selbst im Knochen vorhanden war, sondern seine Abbauprodukte wie Hämine und Hämatine [5, 19]. Es bleibt sicherlich zu diskutieren, ob Schnelltests, die auf dem Nachweis von Hämoglobin basieren, wie der von uns verwendete Hexagon-OBTI®-Test oder der oben erwähnte SERATEC® HemDirect Hämoglobintest, wirklich spezifisch für Hämoglobin sind oder auch dessen Abbauprodukte erfassen. Proteine können durch vielfältige Einflüsse denaturiert werden, eine Erklärung, die angesichts der Dekompositionsvorgänge nahe liegt. Außerdem ist das Hämoglobinmolekül verschiedenen Oxidationsvorgängen ausgesetzt. Deshalb ist es fraglich, ob in 15 [10] bzw. 31 [16] Jahre alten Blutspuren noch das unveränderte Hämoglobinmolekül vorhanden ist.

Creamer u. Buck [4] untersuchten Knochenproben mit einer PMI-Spanne von 0,5–375 Jahren mit einem Elektronenspinresonanz-Spektrometer auf ihren Gehalt an Hämoglobin. Das Ergebnis verlief durchgehend positiv. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass diese Messung lediglich einen qualitativen Aussagewert besitzt und die Spezifität nicht näher geprüft wurde. In einer früheren Studie untersuchten Creamer u. Buck [3], ob Hämoglobin auch die Lumineszenz bei der Luminol-Reaktion auslöst. Hierfür maßen sie die Wellenlänge des Lichts, das bei der Luminolreaktion emittiert wurde, und verglichen diesen Wert mit dem Literaturwert für Hämoglobin. Das Resultat wurde als Übereinstimmung gewertet (gemessener Wert: 435 ± 8 nm, Literaturwert 438 ± 2 nm [3]). Dies könnte den Schluss nahe legen, dass Hämoglobin im Knochen vorhanden sein muss und die Chemilumineszenz bei der Luminol-Reaktion hervorruft. Offen bleibt, ob nicht Abbauprodukte des Hämoglobins wie Hämine und Hämatine oder das Methämoglobin die Chemilumineszenz bei der Luminol-Reaktion bewirken [22] und eine nahezu identische Wellenlänge generieren.

Eine weitere Erklärung dafür, dass die Ergebnisse des Hexagon-OBTI®-Tests negativ ausfielen, könnte der sogenannte High-Dose-Hook-Effekt sein, der allgemein die falsch-niedrige bzw. falsch-negative Bestimmung von Analyten bezeichnet, die in sehr hoher Konzentration in Proben vorkommen. Sobald die Konzentration des Analyten zu hoch ist, können alle Antikörper-Bindungsstellen belegt sein und zusätzliche Analyt-Moleküle werden nicht mehr im Rahmen der Bindungskurve ermittelt. So kommt es zu falsch-niedrigen bzw. falsch-negativen Messwerten.

In Bezug auf den Hexagon-OBTI®-Test könnte der High-Dose-Hook-Effekt entstehen, wenn zu viel freies Hämoglobin, das nicht an den goldmarkierten Antikörper gebunden ist, in die Testlinienregion gelangt. Ist die Menge des Hämoglobins sehr hoch, wird der dort fixierte Antikörper mit freiem Hämoglobin abgesättigt und ist nicht mehr in der Lage, den farbigen Komplex aus goldmarkiertem Antikörper und Hämoglobin zu binden. In diesem Fall würde die Ausbildung der Testergebnislinie unterdrückt, so dass das Testergebnis negativ erscheint, obwohl Hämoglobin in der Probe vorhanden ist [10, 21].

Dennoch erscheint es eher unwahrscheinlich, dass in unserem Experiment der High-Dose-Hook-Effekt für alle negativen Ergebnisse verantwortlich ist: Der Hersteller gibt an, dass dieser beim Hexagon-OBTI®-Test erst ab einer Hämoglobinmenge von $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ auftritt;

Hochmeister et al. konnten in ihrer Validierungsstudie [10] diese Angabe bestätigen und führten weiterhin aus, dass man für den Test eine Blutverdünnung von mindestens 1:100 verwenden sollte, um den High-Dose-Hook-Effekt zu vermeiden. Als wichtigen optischen Anhaltspunkt für eine ausreichende Verdünnung gaben sie an, dass Hämoglobin seine erkennbar rote Farbe bei einer Vollblutverdünnung von 1:1000 verliert. Bei den untersuchten Knochenproben im vorliegenden Experiment war keine Rotfärbung des Puffers nach der Inkubation zu beobachten. Dies würde ebenfalls gegen einen High-Dose-Hook-Effekt sprechen.

Der RSID®-Bluttest hat im Vergleich zum Hexagon-OBTI®-Test bei der vorliegenden Fragestellung den Vorteil, dass er keine falsch-negativen Ergebnisse aufgrund des High-Dose-Hook-Effekts liefern kann, was Schweers et al. mit einer aufsteigenden Verdünnungsreihe in ihrer Validierungsstudie untersuchten. Bei keiner Verdünnung wurde ein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet [20]. Der Nachteil ist allerdings die eingeschränkte Vergleichbarkeit mit dem Hexagon-OBTI®-Test, da der RSID®-Bluttest nicht auf Antikörpern gegen humanes Hämoglobin, sondern gegen Glykophorin A basiert. In der uns zugänglichen Literatur findet sich keine Angabe darüber, wie lange Membranproteine von Erythrozyten bzw. Proteine allgemein postmortal stabil bleiben.

Einen Hinweis könnten jedoch Rachmilewitz et al. mit ihrer Studie über die Stabilität von Oxyhämoglobin A, seinen konstituierenden Ketten und ihren Derivaten [17] liefern: Methämoglobin A war 7 Monate lang bei 4 °C inkubiert und wurde nur ungefähr zur Hälfte zu sog. „Hemichromes“ degradiert. „Hemichromes“ sind so genannte low spin-Derivate von Methämoglobin, die bei diskreten reversiblen und irreversiblen Veränderungen der Proteinkonformation dadurch entstehen, dass Atome, die sich innerhalb der Hämoglobin-Proteinketten befinden, als sechster Ligand an das Eisen des Häms binden [7, 17]. Vereinfacht kann man sie als Intermediärprodukte bei der Oxidation von Hämoglobin bezeichnen. Das legt nahe, dass Methämoglobin bzw. seine Proteinketten relativ lange stabil bleiben können, wobei sich die Frage stellt, inwieweit man diese Erkenntnis auf die Stabilität von Membranproteinen übertragen kann.

Jarolim et al. [14] konnten experimentell nachweisen, dass die „Hemichromes“ einen destabilisierenden Effekt auf das Membranskelett von Erythrozyten haben. Man unterscheidet zwischen reversiblen und irreversiblen „Hemichromes“ (rHCRs und iHCRs). Es wurde gezeigt, dass bereits die rHCRs zur Freisetzung von Hämin führen, was wiederum eine Hämolyse, also eine Zerstörung der Zellmembran der Erythrozyten zur Folge hat. Methämoglobin hat dagegen einen stabilisierenden Einfluss auf das Membranskelett der Erythrozyten (Abb. 5).

Die referierten Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass Glykophorin A nicht mehr nachweisbar ist und somit der RSID®-Bluttest negativ ausfallen musste. Wie lange es insgesamt dauert, bis kein Methämoglobin mehr vorhanden ist bzw. bis alle Proteine oder Proteinketten in Erythrozyten bzw. am Hämoglobin vollständig denaturiert sind, bleibt letztlich ungeklärt. Dies hängt nicht zuletzt von den verschiedenen postmortalen Dekompositionsprozessen ab und von der Tatsache, dass der postmortale Hämoglobinabbau nicht mit Versuchsbedingungen, wie sie beispielsweise bei Rachmilewitz et al. [17] beschrieben sind, vergleichbar ist.

Zu bedenken ist, dass Schweers et al. in ihrer Validierungsstudie zum RSID®-Bluttest [20] nicht ausführen, ob Blutspuren verschiedenen Alters getestet wurden. Es ist lediglich die Rede von getrockneten menschlichen Blutspuren, was eine Übertragbarkeit auf Kno-

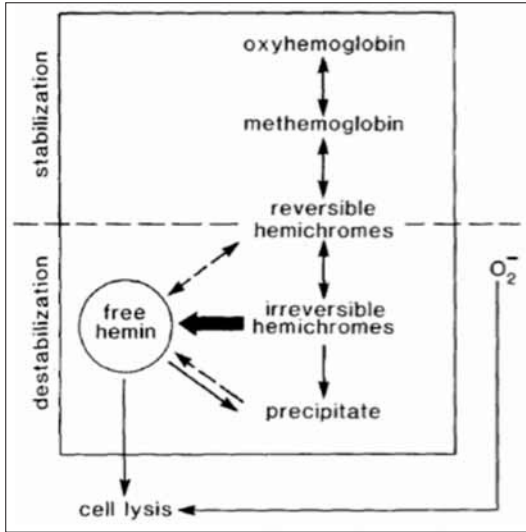


Abb. 5 (aus [14]): Schematische Zusammenfassung des Effekts der Hämoglobin-Oxidationsprodukte auf die Stabilität des Membranskeletts von Erythrozyten und deren Lyse. Hämoglobin und Methämoglobin stabilisieren das Membranskelett, wohingegen iHCRs dessen Destabilisierung verursachen. In [14] wird der destabilisierende Effekt von freiem Hämin beschrieben, das leicht aus iHCRs freigesetzt wird. Der andere Weg, der zur Zellzerstörung und Lyse von Erythrozyten führt, z. B. die Bildung von Sauerstoffradikalen, wurde in [14] nicht untersucht.

chenproben nicht zulässt. Man kann weiterhin ausschließen, dass Ammoniak für die negativen Testergebnisse beim RSID®-Bluttest verantwortlich ist. Auch Schweers et al. [20] schlossen diese Möglichkeit in ihrer Validierungsstudie aus, indem sie Blutspuren testeten, die trotz Behandlung mit ammoniakhaltigem Bodenreiniger ein positives Ergebnis zeigten. Zum anderen erbrachte die RSID®-Bluttest-Reihe (d), die ohne Ammoniak durchgeführt wurde, ebenfalls nur negative Ergebnisse.

Berücksichtigt man, dass in der Validierungsstudie [20] der RSID®-Bluttest mit Blut von verschiedenen Oberflächen und Blut in Kombination mit anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Sperma und Urin positiv reagierte, ist keine Störung des Tests durch Knochensubstanzen zu erwarten.

Ein letzter zu diskutierender Punkt ist, dass der RSID®-Bluttest mit dem Puffer des Hexagon-OBTI®-Tests bei allen Proben schwach positive Ergebnisse zeigte. Der Hersteller des SERATEC® HemDirect Hämoglobintests gibt in der Produktbeschreibung an, dass man auch andere Puffer im neutralen pH-Bereich verwenden kann, ohne das Testergebnis zu beeinflussen [21]. Der Hersteller des RSID®-Bluttests macht hierzu keine Angaben. Dennoch erschien es uns sinnvoll, diesen Aspekt zu untersuchen. Da alle Ergebnisse gleichmäßig schwach positiv ausfielen, dürfte es sich um ein unspezifisches Phänomen handeln. Eine Durchführung des RSID®-Bluttests mit dem Puffer des Hexagon-OBTI®-Tests erscheint demnach nicht sinnvoll.

5. Fazit für die Praxis

Anders als der Luminol-Test scheinen kommerzielle Testkits auf Blut nicht zur Eingrenzung des postmortalen Intervalls an Knochen-

funden geeignet zu sein. Sowohl nach Packungsanleitung der Hersteller als auch nach Abwandlung der Standardprotokolle mit längerer Inkubationszeit oder vorheriger Inkubation des Knochenmehls mit Ammoniak bzw. Austausch der Pufferlösung konnten mit den untersuchten Schnelltests „Hexagon-OBTI®-Test“ und „RSID®-Bluttest“ keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

Zusammenfassung

In Fortsetzung eines früheren Experiments wurden fünf humane Knochen mit bekanntem Postmortal-Intervall (PMI) aus fünf Liegezeitperioden im Erdlager (0,2 bis ca. 2000 Jahre) mit zwei etablierten Schnelltests zum Nachweis von Blutspuren (Hexagon-OBTI®-Test und RSID®-Bluttest) untersucht. Vor dem Hintergrund der Studienergebnisse über die Verwendbarkeit des Luminoltests für eine erste Einschätzung der postmortalen Liegezeit knöcherner Überreste stellte sich die Frage einer Anwendbarkeit dieser sehr sensiblen Testverfahren für die Eingrenzung des PMI. An den verblindeten Proben wurden insgesamt 5 Versuchsreihen nach Packungsanleitung und unter Abwandlung der Standardprotokolle der Hersteller durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob mit vorgeschalteten Reaktionsschritten bzw. längerer Inkubationszeit das Hämoglobin bzw. seine Bestandteile aus dem Knochen gelöst werden und ob in Abhängigkeit vom PMI positive Testergebnisse resultieren können.

Vier Versuchsreihen erbrachten für alle Proben ein negatives Ergebnis und eine Versuchsreihe für alle Proben ein gleichermaßen schwach positives Resultat. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Schnelltests, die auf dem Nachweis von Blut beruhen, zur Eingrenzung des postmortalen Intervalls von Knochenfunden trotz Abwandlung der Standardprotokolle nicht geeignet sind. Zur Frage des postmortalen Abbaus von Hämoglobin in Knochen sind weitere, grundlegende Untersuchungen notwendig.

Schlüsselwörter: Forensische Osteologie - Postmortales Intervall - Hexagon-OBTI-Test® - RSID®-Bluttest

Application of the Hexagon-OBTI® test and the RSID® blood test for the determination of the post-mortem interval of bone samples

Summary

In this serial experiment, five human bones with known post-mortem intervals (PMI) in a soil environment from five different epochs (0.2 to approximately 2000 years) were tested in a blind setup with two established rapid tests for the identification of human blood traces (Hexagon-OBTI® test and RSID® blood test). Based on previous study results concerning the usability of the Luminol test for the first assessment of the PMI of osseous remains, the question arising was whether those test procedures, which are highly sensitive for the detection of human blood components, could also be used to narrow down the post-mortem interval. Five test series were conducted applying modified standard protocols of the manufactures. The aim was to find out whether with prior reaction steps or a prolonged time of incubation hemoglobin or its metabolites can be dissolved from the bone and positive test results can be achieved dependent on the PMI.

Four test series yielded negative results for all bone samples and one test series a uniformly weak positive result. The results indicate that rapid tests based on the detection of blood are not suitable for the determination of the PMI of bone samples despite the modification of the standard protocols. Further thorough research is required to clarify the post-mortem degradation of hemoglobin in bones.

Keywords: Forensic osteology - Post-mortem interval - Hexagon-OBTI® test - RSID® blood test

Literatur

1. ABACard® HemaTrace® for the forensic identification of human blood (product insert), catalog #708424, USA, 1999
2. Anstee, D. J. (1990): Blood group-active surface molecules of the human red blood cell. *Vox Sang.* **58**: 1-20
3. Creamer, J. I., Quickenden, T. I., Apanah, M. V., Kerr, K. A., Robertson, P. A. (2003): A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence* **18**: 193-198
4. Creamer, J. I., Buck, A. M. (2009): The assaying of haemoglobin using luminol chemiluminescence and its application to the dating of human skeletal remains. *Luminescence* **24**: 311-316
5. Ebach, S. C., Ramsthaller, F., Birngruber, C. G., Verhoff, M. A. (2010): Determining the postmortem interval of bone samples: a comparison of luminol chemiluminescence, Hexagon-OBTI® test, and Combur® test. *Arch. Kriminol.* **226**: 38-47
6. Gardner, B., Parsons, S. F., Merry, A. H., Anstee, D. J. (1989): Epitopes on sialoglycoprotein α : evidence for heterogeneity in the molecule. *Immunology* **68**: 283-289
7. Hanson, E. K., Ballantyne, J. (2010): A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since decomposition) of dried bloodstains. *PLoS One* **5**: e12830
8. Hermon, D., Shpitzen, M., Oz, C., Glatstein, B., Azoury, M., Gafny, R. (2003): The use of the Hexagon OBTI test for detection of human blood at crime scenes and on items of evidence. Part I: Validation studies and implementation. *J. Forensic Identification* **53**: 566-575
9. Hexagon OBTI immunochromatographic test for confirming the presence of human blood traces (product insert), REF HU-829, 2006
10. Hochmeister, M. N., Budowle, B., Sparkes, R., Rudin, O., Gehrig, C., Thali, M., Schmidt, L., Cordier, A., Dirnhöfer, R. (1999): Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *J. Forensic Sci.* **44**: 597-602
11. Holley, S., Fiedler, S., Graw, W. (2008): Makroskopische Abschätzung des postmortalen Intervalls (PMI) und Ausschluss einer forensisch relevanten Liegezeit – ein Vergleich von Literaturangaben mit rezenten osteologischen Funden. *Arch. Kriminol.* **221**: 175-184
12. Independent Forensics, 4600 West Roosevelt Road, Hillside, IL 60162, USA. brett@ifi-test.com
13. Introna, F. Jr., Di Vella, G., Campobasso, C. P. (1999): Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *J. Forensic Sci.* **44**: 535-538
14. Jarolim, P., Lahav, M., Liu, S. C., Palek, J. (1990): Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin. *Blood* **76**: 2125-2131
15. Kreutz, K., Verhoff, M. A. (2002): *Forensische Anthropologie*. Lehmanns (Berlin)
16. Misencik, A., Laux, D. L. (2007): Validation study of the Seratec HemDirect hemoglobin assay for the forensic identification of human blood. *Midwestern Association of Forensic Science, Newsletter Spring 2007*: 18-25
17. Rachmilewitz, E. A., Peisach, J., Blumberg, W. E. (1971): Studies on the stability of oxyhemoglobin A and its constituent chains and their derivatives. *J. Biol. Chem.* **246**: 3356-3366
18. Ramsthaller, F., Kreutz, K., Zipp, K., Verhoff, M. A. (2009): Dating skeletal remains with luminal-chemiluminescence. Validity, intra- and interobserver error. *Forensic Sci. Int.* **187**: 47-50

19. Ramsthaler, F., Ebach, S. C., Birngruber, C. G., Verhoff, M. A. (2011): Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI®, and Combur® tests. *Forensic Sci. Int.* **209**: 59-63
20. Schweers, B. A., Old, J., Boonlayangoor, P. W., Reich, K. A. (2008): Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (rapid stain identification – blood). *Forensic Sci. Int. Genet.* **2**: 243-247
21. SERATEC® HemDirect hemoglobin assay (product insert), REF HbF07, 2004
22. Specht, W. (1937): Die Chemilumineszenz des Hämins, ein Hilfsmittel zur Auffindung und Erkennung forensisch wichtiger Blutspuren. *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.* **28**: 225-234
23. Verhoff, M. A., Heyne, M., Kreutz, K., Ramsthaler, F. (2009): Liegezeiteingrenzung anhand postmortaler Verletzungen. *Rechtsmedizin* **19**: 223-227
24. Verhoff, M. A., Schiwy-Bochat, K.-H., Kreutz, K., Witzel, C., Huckenbeck, W., Ramsthaler, F. (2009): Das forensisch-osteologische Gutachten – formale Anforderungen aus rechtsmedizinischer Sicht. *Rechtsmedizin* **19**: 357-361
25. Verhoff, M. A., Wiesbrock, U. O., Kreutz, K. (2004): Makroskopische Befunde zum Ausschluss einer forensisch relevanten Liegezeit bei Knochenfunden – eine Literaturauswertung. *Arch. Kriminol.* **213**: 1-14
26. Zinka, B., Kandlbinder, R., Haas, G., Schupfner, R., Wolfbeis, O., Graw, M. (2011): Radionuklidanalyse von ²²⁸Th und ²²⁶Ra – Neue Methode zur Liegezeitbestimmung. *Rechtsmedizin* **21**: 124-130

Anschrift für die Verfasser:

Prof. Dr. med. Marcel A. Verhoff
 c/o Institut für Rechtsmedizin
 Frankfurter Straße 58
 D-35392 Gießen