

Aus der Universitätsklinik Ulm  
- Institut für Rechtsmedizin -  
- Prof. Dr. E. Miltner -

Der Baumwollfingerling als opferschonende  
Spurensicherungsmethode  
nach angegebenem Sexualdelikt

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Universität Ulm

vorgelegt von  
Jasmin Nicole Löw  
aus  
Wilhelmshaven  
2016



Amtierender Dekan: Professor Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Miltner

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Dudeck

Tag der Promotion: 22.06.2017





# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	
1.1    Rechtliche Grundlagen	1
1.2    Daten zum Sexualdelikt	1
1.3    Körperliche Untersuchung und Spurensicherung	2
1.4    Detektion von Ejakulat und insbesondere Spermien im Vaginalabstrich	5
1.5    Separation von Spermien	11
1.6    Polymerase chain reaction (PCR)	15
1.7    Das DNA – Profil	16
1.8    Zielsetzung	18
2. Material und Methodik	
2.1    Studienaufbau	20
2.2    Akquirierung von Probanden	21
2.3    Fingerling und Faltschachtel	23
2.4    Spurenentnahme	24
2.5    Handhabung des Fingerlings	26
2.6    Cytologiepräparate	40
2.7    Differentielle Lyse	41
2.8    Polymerase Chain Reaction	43
2.9    DNA-Typisierung	45
2.10   Ethische Belange	45
2.11   Materialverzeichnis	46
2.12   Statistische Auswertung	49
3. Ergebnisse	
3.1    Daten zu den Studienteilnehmern	50
3.2    Mikroskopie	50

3.3	Interpretation der Ergebnisse	68
3.4	DNA-Analytik	73
4.	Diskussion	74
5.	Zusammenfassung	94
6.	Literaturverzeichnis	97
	Fotografische Abbildungen	105
	Anhang	116
	Danksagung	132
	Lebenslauf	133

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AS</b>	probenzugeordnete Betitelung (1,2)
<b>CTS</b>	Christmas tree stain / Kernechtrot-Picroindigokarminfärbung
<b>DAPI</b>	Diamidin - Phenylindol-Färbung
<b>DGGG</b>	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
<b>DGRM</b>	Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin
<b>DNA</b>	desoxyribonucleic acid / Desoxyribonucleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>ELISA</b>	enzyme linked immuno sandwich assay / enzymvermitteltes Immunadsorptionsverfahren
<b>F</b>	Fingerling
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting / Fluoreszenz aktivierte Zelltrennung
<b>Fil</b>	Filtration
<b>FISH</b>	Fluorescence in situ hybridization / Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<b>GF</b>	Gesichtsfeld (Mikroskopie)
<b>GV</b>	Geschlechtsverkehr
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin - Färbung
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>JL</b>	probenzugeordnete Betitelung (9, 18, 20, 21, 25, 33, 34, 37, 45, 47, 50)
<b>Jun</b>	probenzugeordnete Betitelung (01 – 06)
<b>K</b>	probenzugeordnete Betitelung (1-4)
<b>KK</b>	probenzugeordnete Betitelung (1; 2)
<b>LCM</b>	laser capture micodissection / wie LMD
<b>LDH</b>	Lactatdehydrogenase
<b>LMD</b>	laser microdissection / Lasermikrodissektion
<b>m</b>	massenhaft
<b>ml</b>	Milliliter
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>P</b>	probenzugeordnete Betitelung (römisch I – VI)
<b>PAP</b>	Papanicolaou - Färbung
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
<b>PSA</b>	Prostata-spezifisches Antigen
<b>U</b>	Umdrehungen/ Minute
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>Sp</b>	Spermien
<b>SP</b>	Saure Phosphatase
<b>StGB</b>	Strafgesetzbuch
<b>StPO</b>	Strafprozessordnung
<b>STR</b>	short tandem repeat
<b>SVSA</b>	Semen vesicle specific antigen / Samenbläschenspezifisches Antigen
<b>Taq</b>	Thermophilus aquaticus
<b>UHU</b>	probenzugeordnete Betitelung
<b>U</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>Vol.</b>	Volumen
<b>Z</b>	Zentrifugation / -sschritt





# 1. Einleitung

## 1.1. Rechtliche Grundlagen

Die Definition der unterschiedlichen Sexualdelikte sowie deren strafrechtliche Ahndung sind im Strafgesetzbuch (StGB) in den Paragraphen §§ 173 bis 177 festgehalten:

- § 173 Beischlaf zwischen Verwandten
- § 174 a Sexueller Missbrauch von Gefangenen, behördlich Verwahrten oder Kranken und Hilfsbedürftigen in Einrichtungen
- § 174 b Sexueller Missbrauch unter Ausnutzung einer Amtsstellung
- § 174 c Sexueller Missbrauch unter Ausnutzung eines Beratungs-, Behandlungs- oder Betreuungsverhältnisses
- § 176 Sexueller Missbrauch von Kindern
- § 177 Sexuelle Nötigung; Vergewaltigung
- § 178 Sexuelle Nötigung und Vergewaltigung mit Todesfolge
- § 179 Sexueller Missbrauch widerstandsunfähiger Personen
- § 180 Exhibitionistische Handlungen

Gemäß dem genauen Wortlaut sind bei Erfüllen des Straftatbestandes § 177 je nach Schwere des Deliktes Freiheitsstrafen von minimal „nicht unter einem Jahr“ bis maximal „nicht unter 5 Jahren“ vorgesehen. Bei Todesfolge durch die Vergewaltigung wird die Freiheitsstrafe mit „nicht unter 10 Jahren“ bemessen. [45,96]

## 1.2. Daten zum Sexualdelikt

Laut der polizeilichen Kriminalstatistik ist ungefähr seit den neunziger Jahren im Hellfeld ein Anstieg der Straftaten gegen die sexuelle Selbstbestimmung zu verzeichnen [72], bspw. um 7,8% von 2006 auf 2007 [65], wobei zuletzt die Zahlen von 2014 auf 2015 stabil waren mit einer leichten Abnahme der Straftaten gegen die sexuelle Selbstbestimmung um 0,9%. [66] Ob dies insgesamt einen

tatsächlichen Anstieg der Deliktzahl bedeutet oder auch durch eine erhöhte Bereitschaft der Opfer zur polizeilichen Anzeige erklärlich ist, kann nicht belegt werden. In allen Fällen im Rahmen mehrerer Erhebungen ist die tatsächliche Dunkelziffer als deutlich grösser dimensioniert anzunehmen. [65;64]

Eine im Jahre 2003 im deutschen Bundesgebiet durchgeführte repräsentative Befragung im Rahmen des nationalen Aktionsplans zur Gewalt gegen Frauen ergab, dass insgesamt 12,8 % der befragten Frauen (10 264 Frauen im Alter zwischen 16 und 85 Jahren ) nach eigenen Angaben in der Vergangenheit sexuelle Gewalterfahrungen erlebt hatten; vollendete Vergewaltigungen wurden von 6% der Frauen angegeben. [99]

Der überwiegende Anteil der Opfer ist weiblich und betrug im Jahr 2015 prozentual am gesamten Opferkollektiv, bzgl versuchter und vollendeter Fälle von Vergewaltigung und sexueller Nötigung 93,4%. 18,6 % der entsprechenden Taten wurden in der Partnerschaft verübt. [66] Bei einer Gesamtdimension von 46081 Fällen betrug 2015 die Aufklärungsquote 78,5 %. [67]

Bei Subsummierung aller erfassten Straftaten gegen die sexuelle Selbstbestimmung waren im Jahre 2007 94,4% der Täter männlich und überwiegend über 21 Jahre alt (78,6%). [65]

Als die Viktimisierung begünstigende Faktoren wurden neben früher Heirat und früher Schwangerschaft hauptsächlich Gewalterlebnisse in der Kindheit benannt, wobei sowohl Gewalt innerhalb des Elternpaars als auch direkte Gewalterfahrungen des Kindes durch ein oder beide Elternteile gleichermaßen als einflußnehmenden Faktor gewertet werden können. [99]

### 1.3. Körperliche Untersuchung und Spurensicherung

Die ärztliche Untersuchung sollte möglichst zeitnah als Ganzkörperuntersuchung nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) sowie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie (DGGG) erfolgen.

Die intravaginal gesicherte Mischspur besteht vorwiegend aus Scheidensekret und, falls eine Ejakulation erfolgt ist, aus Samenflüssigkeit. Innerhalb nur weniger Stunden kommt es hauptsächlich aufgrund natürlicher Drainage zu einer signifikanten Dezimierung der männlichen Spur. Je später die Spurensicherung

daher stattfindet, desto schwieriger werden Nachweis der Samenzellen und Erstellung eines DNA-Profiles des Spurenlegers. Um das Opfer vor einer Retraumatisierung so weit wie möglich zu schützen, sollten Mehrfachuntersuchungen vermieden werden.

Sorgfältiges Arbeiten ist sowohl bei Spurensicherung als auch bei Verpackung und Aufbewahrung der Spureenträger unerlässlich.

Alle Spureenträger müssen eindeutig mit Namen, Spurenart und Entnahmedatum beschriftet in einem geeigneten Behältnis einzeln verpackt werden. Insbesondere muss dabei eine zuverlässige Trocknung gewährleistet sein, damit mikrobielles Wachstum vermieden wird; hierfür sind bspw. die häufig angewandten luftdurchlässigen Faltpackungen nach Hochmeister et al [35] geeignet. Ein Schutz vor Fremdkontamination muss gewährleistet sein. [46;21]

Die Anamneseerhebung erstreckt sich neben der gynäkologischen und sexuellen Anamnese auch auf Vorerkrankungen und tatspezifische Fragen einschliesslich der anschliessend durchgeführte Hygiene (mit dadurch möglicherweise Reduktion von Spurenmaterial) und Fragen zu möglichen weiteren DNA-kontaminierten Stellen, die dann mittels Abstrich erfasst werden. Ebenfalls ist der Gebrauch zentral wirksamer Substanzen zu erfassen. [46] Die sorgfältige Dokumentation sowohl der Angaben des Opfers als auch der erhobenen Befunde der körperlichen Untersuchung sind unablässig zur Wahrung der Beweiskraft im Rahmen der strafrechtlichen Verfolgung. [46;21]

Alle möglicherweise Fremd-DNA aufzeigenden Körperareale müssen berücksichtigt und alle Verletzungsmuster detailliert, auch fotografisch mit Maßstab, dokumentiert werden. Auf die Möglichkeit von Selbstverletzungen sei bei der Befundung der Verletzungsbilder hingewiesen. [46;21]

Die Genitaluntersuchung, in der Regel in Steinschnittlage, erfolgt einschliesslich sorgfältiger Inspektion und Dokumentation der Verletzungsmuster sowie sorgfältiger Asservierung biologischen Materials, meist unter Zuhilfenahme eines Speculums. Regelmäßig berücksichtigte anatomische Punkte im weiblichen Genitale sind in der Regel punktuellen Abstrichentnahme sind Introitus und Fornix vaginae sowie Cervix uteri. Verwendet werden zumeist langstielige Baumwollwatteträger, regional auch Pflaumentupfer. Es ist sich unbedingt um die Vermeidung von Fremdkontamination zu bemühen. [46;21]

Bei entsprechendem Tathergang müssen auch Analbereich und Oralcavität berücksichtigt werden. Die Asservierung der zur Tatzeit getragenen Kleidung, besonders der Unterwäsche, ist obligat. [46;21]

Detailliertere Angaben zu Anamneseerhebung und körperlicher Untersuchung sowie Spurensicherung finden sich auch praktikabel und realitätsnah in dem „Merkblatt zur ärztlichen Untersuchung nach Sexualdelikten“, herausgegeben 2010 vom Landeskriminalamt Baden-Württemberg. Hier wird insbesondere mehrfach auf die zwingende Notwendigkeit DNA-freien Spurensicherungsmaterials hingewiesen. Desweiteren wird der Tatsache Rechnung getragen, dass neben der gutachterlichen Untersuchung auch die Diagnostik und Therapie evtl zugezogener Erkrankungen zu den Pflichten des Untersuchers zählt. [40]

In der **vorliegenden Studie** verwendeten wir Verbandsmaterial wie zum Beispiel zur Versorgung von Fingern oder Zehen üblich, jedoch in speziell adaptierter Form: schlauchförmige, einseitig geschlossene Fingerlinge aus doppelagiger Baumwolle. Hiermit kann die Vaginalcavität ohne Verwendung eines Speculums vollständig ausgerieben werden, um somit eine möglichst grosse Menge Mischspur zu sichern.

Jegliches Material zur Spurensicherung muss unbedingt steril verpackt und damit vor allem frei von fremder DNA-Kontamination sein.

2007 untersuchten Benschop et al. in einer breit angelegten Studie den Nutzen einer Nylonbeschichtung des Spurenträgers. Unter Berücksichtigung verschiedener Untersuchungsgänge (PSA- und Seminogelintests, Differentielle Lyse, FISH und Lasermicrodissektion sowie Lichtmikroskopie und DNA-Profilierung) wurde die Anwendung von herkömmlichen Baumwollspurentägern und nylonbeschichteten Spurentägern verglichen. Zusammenfassend wurde als vorteilhaft beschrieben, dass durch differentielle Lyse mehr Zellen sichergestellt werden konnten und die Ausbeute insbesondere der männlichen DNA deutlich höher sei. Offensichtlich war es möglich, von den Nylonträgern mehr Zellen abzuwaschen, was der weniger festen Faserstruktur

zugeschrieben wurde. [5] Eine Beschichtung der hier verwendeten Baumwollfingerlinge erschien uns kommerziell nicht ohne weiteres möglich und hätte den Vergleich zum ebenfalls unbeschichteten Watteträger erschwert.

#### 1.4. Detektion von Ejakulat und insbesondere Spermien im Vaginalabstrich

Die Mischspur, bestehend aus Samenflüssigkeit und Vaginalsekret, wird zunächst durch Waschvorgänge vom Spurenläger abgetrennt. Üblicherweise erfolgt die Inkubation der handelsüblichen Watteköpfchen in einem Eppendorfgefäß mit destilliertem Wasser, Natriumchlorid oder PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung). Danach können verschiedene Möglichkeiten des Ejakulatnachweises angewandt werden. Neben Nachweisen von Spermabestandteilen wie bspw. dem ProstataSpezifischen Antigen (PSA) oder Saure Phosphatase ist die spezifischste Nachweismethode für Spermien die Lichtmikroskopie zuvor gefärbter oder auch nativer Ausstriche auf Glasobjektträgern.

Rein morphologisch hinterlässt Sperma auf Textilien gelblich-graue Antragungen, die das zugrunde liegende Gewebe zum Wellen und Versteifen bringen. [47;93]

##### 1.4.1 Saure Phosphatase

1935 wurde durch Kutscher und Wohlberg in Ejakulat ein Enzym beschrieben, welches in saurem Milieu als Esterase fungiert. Die erstmalige Verwendung dieses SP-Nachweises zur Detektion von Ejakulat erfolgte 1945 in Dänemark. [25]

Der Nachweis der Sauren Phosphatase (SP) kann orientierend einen Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Samenflüssigkeit geben, da das Enzym für diese nicht spezifisch ist, sondern in vielerlei menschlichen und tierischen Geweben und Sekreten (einschliesslich des Vaginalsekretes) sowie in der Pflanzenwelt auftritt. Allerdings ist die Aktivität des Enzyms in Sperma um ca. ein bis zwei Größenordnungen höher verglichen mit der in Vaginalsekret. [47] Jedoch kann z.B. auch lediglich durch die Aktivität in Scheidensekret ein schwachpositiver Befund erhoben werden [93; 30], ebenso durch weiblichen Urin [30].

Die Angaben zur mittleren Zerfallszeit der SP sind divergent und wurden bis 32 Stunden angegeben. [74]. Vor der Etablierung spezifischerer Nachweismethoden

war die SP lange Zeit ein klassischer Hinweis auf das Vorliegen von Samenflüssigkeit – und ist es auch weiterhin.

Eine aktuell handelsübliche und einfach zu bedienende Form des qualitativen SP-Nachweises sind die SP-Teststreifen (bspw. Phosphatesmo®, Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Der angefeuchtete Streifen wird auf den Spureträger, wie z.B. vermutete Spermaantragungen auf Textilien oder ein Abklatschpräparat gedrückt. Eine rasche und intensive rotviolette Färbung dokumentiert den SP-Nachweis. Als auf dem Streifen befindliche Reaktionspartner dienen hierbei  $\alpha$ -Naphthylphosphat und Tetrazoliumsalz. Durch die Aktivität der SP wird  $\alpha$ -Naphthylphosphat in Naphthol umgewandelt, welches mit dem Tetrazoliumsalz die Rotfärbung herbeiführt. [47;93]

Gegenüber dem PSA-Nachweis scheint SP unterlegen; wie bspw. 1998 beschrieben durch Lawson et al. [41] Dennoch wurde in einer Studie von Allery et al [3] der Phosphatesmo®- Teststreifen mit guter Sensi- und Spezifität und negativem Prädiktionwert von 98% als im Alltag praktikabel einsetzbarer Screenintest bezeichnet.

Als mögliche Quelle falschpositiver Ergebnisse wurde 2004 durch Nowakowska et al. die vaginale Candidose beschrieben. Durch SP-Produktion aus der Pilzbesiedlung ergeben sich unter Umständen SP-Nachweise, die fälschlicherweise auf vorangegangenen GV schliessen lassen könnten. [61]

Der SP-Nachweis ist vom Vorhandensein von Samenzellen unabhängig und daher auch bei Individuen mit Oligo- oder Azoospermie positiv. [47;93]

Relevante in der Vergangenheit veröffentlichte Studien zum SP-Nachweis stammen von Seligman und Manheimer 1949 [82], Rupp 1968 mit relevanten Modifikationen [78], Davies und Wilson 1974 [15] sowie Davies 1977 [16].

#### 1.4.2 Prostataspezifisches Antigen

1973 wiesen Li und Beling erstmals in Samenflüssigkeit das Protein E<sub>1</sub> nach [42], was sich als identisch mit dem 1978 von Sensabaugh beschriebenen p30 herausstellte [83]. Das überwiegend als PSA bezeichnete Glykoprotein p30, ist nicht, wie ursprünglich durch Sensabaugh postuliert [83], spezifisch für

Samenflüssigkeit. Es kann, jedoch in deutlich geringeren Konzentrationen, in anderen Sekreten und einer Vielzahl auch nichtgenitaler Gewebe nachgewiesen werden, auch in weiblichen. [18] Es besteht aus diesem Grunde, auch abhängig von Entnahmetechnik und Verarbeitung der Spur (Verdünnung!), das Risiko eines falschpositiven PSA-Nachweises bei vaginal entnommenen Spuren. PSA wurde unter anderem auch in den weiblichen periurethralen Drüsen [68] sowie in ektopischem Prostatagewebe in Cervix uteri und Vagina [52] nachgewiesen. Durch Macaluso et al. wurde jedoch 1999 konstatiert, dass bei sexueller Abstinenz der weiblichen Probandinnen von mindestens 6 Monaten der PSA-Level aus Vaginalabstrichen unter 0.1 ng/ml liege, bei Abstinenz von mindestens 72 Stunden unter 1 ng/ml. [44]

PSA ist auch in tierischem Sperma nachweisbar, wie bspw. Simich et al 1999 in einer Studie zur Validierung eines kommerziell erhältlichen PSA-Nachweiskits zeigten. [86]

Das aus der Prostata stammende PSA wird über die Samenbläschen sezerniert. [47;93] Als Serinprotease fragmentiert PSA die Seminogelinstrukturen und beeinflusst so die Spermienmotilität. Die Konzentration im Ejakulat wird in der Literatur mit einer Bandbreite von 0.2 bis 5.5 mg/ml beschrieben (zusammengefasster Wert; [36]). Das Gen für PSA wird androgengesteuert exprimiert.

Mittels handelsüblicher Testkassetten kann durch Aufträufeln der zu untersuchenden Spur immunchromatographisch durch Farbumschlag des Testbodens mit ähnlicher hoher Sensitivität wie ELISA der semiquantitative PSA-Nachweis erbracht werden (bspw. Nobi-View PSA-SQ (VB), Nobis Labordiagnostika GmbH, Endingen und Seratec PSA Semiquant Test, Seratec Ges. für Biotechnologie mbH, Göttingen; beide Deutschland). [47;93] Als Sandwich-Immunoassay wird hierbei das Zielmolekül an den membrangebundenen monoklonalen Antikörper gebunden, während ein zweiter farbstoffmarkierter Antikörper den Farbnachweis erbringt. Nach Herstellerangaben garantiert der PSA Semiquant Test eine Mindestsensitivität für PSA-Konzentrationen von 2 ng/ml. Auf mögliche falschpositive Ergebnisse bei saurem pH des Probenmaterials und mögliche falschnegative Ergebnisse durch zu hohe PSA-Konzentration (high dose hook effect) wird durch den Hersteller hingewiesen.

Ursprünglich wurde der Schnelltest zum PSA - Serumnachweis bei Prostatacarcinom entwickelt.

In Studien wurde PSA mittels des NOBI-View-Tests 22 bis 50 Stunden postkoital detektiert, in Einzelfällen drei bis sechs Tage. [3]

Weitere Nachweismöglichkeiten bieten sich in Form von ELISA und verschiedenen elektrophoretischen Verfahren an.

Die Angaben zur Nachweisdauer von PSA sind divergent. Bereits in älteren Studien wie 1985 durch Graves et al [30] oder 1989 durch Kamenev et al [39] wurde die mittlere Nachweisdauer von PSA postkoital im weiblichen inneren Genitale mit 27 bzw. 20 bis 24 Stunden beziffert, die maximale Nachweisdauer mit 47 bzw. 24 Stunden, wobei die Differenz auf ggf. unterschiedliche Abstrichentnahmetechnik zurückgeführt wurde [39].

Der PSA-Nachweis ist von der Anwesenheit von Spermien unabhängig. [69]

In Studien erwies sich der PSA-Nachweis insgesamt als zuverlässiger als der der Sauren Phosphatase [bspw 41;13], wobei jedoch einschränkend bzgl. PSA eine grössere Instabilität vorliegt und somit ein schnellerer Abbau; woraus man schlussfolgerte, der PSA-Nachweis sei länger als 24.48 Stunden postkoital insuffizient. [13]

#### 1.4.3 Seminogelin

Das Protein Seminogelin wird auch als samenbläschenspezifisches Antigen (SVSA) bezeichnet und entstammt dem Namen entsprechend den Samenbläschen. Es existiert die Unterklassifizierung in Seminogelin I und II. Die Gesamtkonzentration im Ejakulat beträgt ca. 19 mg/ml. [70] Seminogelin bewerkstelligt über noncovalente Bindungen und die Ausbildung von Disulfidbrücken die Koagulierung der Samenflüssigkeit; die Gegensteuerung wiederum erfolgt durch PSA, welches Seminogelin fragmentiert und dadurch das Ejakulat verflüssigt. [75;6] Auch Seminogelin existiert in einer Vielzahl genitaler sowie nichtgenitaler Gewebe. [6;43] SVSA wird durch ELISA mittels eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen, der spezifisch ist für das

Oberflächenepitop MHS-5 [34]. Die Spezifität des Tests ist höher als die des PSA-Nachweises, da das Samenbläschensekret prozentual am Gesamtejakulat einen höheren Anteil einnimmt als das der Prostata [23], nämlich 50 – 80% versus 15 – 30% [50]. Trotz des raschen Zerfalls der Trägerzelle durch Einfluss von PSA [53] zeigt sich das MHS- 5- Epitop durch ELISA bis 56 Stunden nach Ejakulation nachweisstabil [54].

Auch bei hochgradigen Verdünnungen des Ausgangsmaterials ist SVSA noch nachweisbar. [31]

Ein immunchromatographischer Teststreifen zum Seminogelinnachweis existiert als Teil des Rapid Stain Identification of Human Semen (RSID) – Kits (Independent forensics, Hillside, Illinois, USA), der Seminogelin bei einer Spermamenge von einem Mikroliter nachzuweisen vermag (Herstellerangabe).

Störungen der Nachweisreaktionen durch andere Körpersekrete wurden in Testreihen durch deren Beimischung ausgeschlossen, desweiteren konnte keine relevante Interaktion mit Gleitmittel oder Spermiziden (Nonoxyl-9) detektiert werden. Im Vergleich mit PSA-Schnelltests wurden zusammenfassend beide als gleichwertig erachtet hinsichtlich ihrer Sensitivität. [62]

Über die maximale Dauer intravaginaler Nachweisbarkeit von SVSA am Lebenden existieren derzeit keine Daten. [51]

Vom Vorhandensein von Spermatozyten ist der SVSA-Nachweis nicht abhängig.

#### 1.4.4 SP-10

Das Protein SP-10 stammt aus den Testes und findet sich an Spermienköpfe gebunden. [73] Als immunchromatographischer Schnelltest existiert die Testkassette Sperm Check (ContraVac, Charlottesville, Virginia, USA), welche für verdünnte Ejakulatproben oder unverdünnte Vaginalabstriche verwandt werden kann. Als untere Nachweisgrenze gilt hierbei eine Spermienkonzentration von 200 000/ml. [73]

#### 1.4.5 LDH C4

Das Enzym Lactatdehydrogenase ist in mannigfaltigen Geweben und Sekreten nachweisbar. Das Isoenzym LDH C4 (auch als LDH-X benannt) ist nach Angaben

von Wheat und Goldberg [91] jedoch spezifisch für Hoden, Samenzellen sowie – flüssigkeit. LDH C4 macht 80% der Gesamt-LDH-Aktivität in den Spermatozoen sowie 11% der der Hoden aus; innerhalb der Zellen ist das Hauptvorkommen in den Mitochondrien [29]. Nach Erscheinen verschiedener Artikel in den 70er und 80er Jahren wurde die Thematik 1992 erneut von Pawlowski und Brinkmann aufgegriffen. Angesichts der eigentlich hohen Spezifität des Enzyms für die männlichen Genitalorgane war die Nachweisbarkeit jedoch nicht sehr suffizient. Untersuchungen von Speichel, Urin und Vaginalsekret ergaben keinen LDH C4-Nachweis. [63]

#### 1.4.6 Lichtmikroskopie

Spermien sind im Ejakulat in einer Konzentration von ca.  $50 - 350 \times 10^6$  vorhanden. [70]

Die lichtmikroskopische Darstellung von Spermien ist für das Vorhandensein von Samenflüssigkeit die Nachweismethode mit der höchsten Spezifität, schlägt allerdings bei einer Azoospermie des Spurenlegers naturgemäß fehl.

Es existieren zahlreiche Färbemethoden. Insbesondere in Europa gängig ist die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Hierbei erscheinen die Plattenepithelzellen rötlich, während die ca.  $5\mu\text{m}$  längsmessenden Spermien eine Blaufärbung mit charakteristischer Farbdichtenverteilung annehmen: Der Pol ist blässlichblau bei geißelseitig intensiverer Färbung. Bei ausreichend geringem zeitlichem Abstand zwischen Spurenlegung und – sicherung sind auch Geißeln sichtbar. [47;93]

Weiterhin gängig ist die Färbung nach Papanicolaou (PAP), wobei hier ein weiterer Arbeitsschritt entsteht, weil die Präparate auf dem Objektträger mittels Fixierspray benetzt werden und trocknen müssen.

Weniger gebräuchlich, stehen auch Färbungen mit Picroindigocarmin (Christmas tree stain) und Alkalinfuchsin zur Verfügung, mit ähnlicher Effizienz wie HE. [2]

Die Angaben verschiedener Autoren zum herkömmlichen lichtmikroskopischen Spermienachweis in Bezug auf das Intervall zwischen Spurenlegung und – entnahme sind divergent und werden Inhalt des Diskussionsteils sein.

#### 1.4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Fluoreszenzfärbung (fluorescence in situ hybridization; FISH) kann die Darstellung von Spermien auf dem Objektträger massiv vereinfacht werden (z.B. Sperm Hy-Liter, Galantos Genetics GmbH, Mainz, Deutschland). Unter dem Fluoreszenzmikroskop können mittels Diamidin-Phenylindol-Färbung (DAPI) alle Zellkerne, mittels eines fluoreszenzfarbstoffmarkierten monoklonalen Mausantikörpers spezifisch die Spermienköpfe, dargestellt werden. Die Durchmusterung erfolgt auf einem Fluoreszenzmikroskop. Im weiteren Verlauf ergibt sich auch die Möglichkeit, die Spermien durch Laser Capture Microdissection (s. 1.5.6) zu isolieren. Nach Herstellerangaben kann die Fluoreszenzfärbung im Vorfeld zu späteren PCR-Prozeduren angewandt werden und zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen menschlichen oder tierischen Sekreten. (Produktinformation Sperm Hy-Liter des Herstellers Galantos Genetics, Juli 2007)

Basierend auf der Anwendung des Sperm-Hy-Liters wurde die Nutzbarkeit des EnVision-Kits (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) evaluiert [11]. Die Färbung mittels des EnVision – Kits stellt in der Hellfeldmikroskopie die Spermien dadurch dar, dass das Kit spezifisch den durch Sperm Hy-Liter eingebrachten monoklonalen Mausantikörper anfärbt.

### 1.5. Separation von Spermien

#### 1.5.1 Differentielle Lyse

Als derzeit etablierte Methode vereint die Differentielle Lyse, den Einsatz von Detergentien und enzymatischem Verdau in einem zweischrittigen Prozess, der sich die unterschiedlichen Strukturen von Spermatozyten und epithelialen Zellen zunutze macht. 1985 beschrieben Gill und Jeffreys die Inkubation von Baumwollspurenlängern mit einem anionischen Detergens und Proteinase K, welches vorwiegend zur Lyse der Epithelienfraktion führt. Wenn auch in geringerem Umfang, sind jedoch auch die Spermien vom Lyseprozess durch Proteinase K betroffen. Nach einem Abtrennungsschritt durch Zentrifugation, der die intakten Spermien in einem Pellet hinterlässt, wird dieses nach Abnehmen des

Überstandes resuspendiert und mit Dithiothreitol (DTT) inkubiert, was die in den Zellwänden der Spermien gehäuft vorkommenden Disulfidbrücken spaltet. [27] Aufgrund des deutlichen Missverhältnisses von weiblicher und männlicher Zellfraktion in Mischspuren aus intravaginaler Spurensicherung nach Sexualkontakt kann die differentielle Lyse unbefriedigende Ergebnisse erbringen, indem ein weiterhin grosser Anteil weiblicher Epithelien in der Spermienfraktion verbleibt. In diesem Fall kann der Überschuss der weiblichen DNA nach PCR-Amplifikation das erwünschte männliche Profil überlagern, die Auswertbarkeit wird dadurch erheblich erschwert. Zudem bleibt wie erwähnt die Spermienfraktion durch den ersten Lyseschritt nicht vollkommen unbeeinflusst.

Aus diesem Grunde wurden mehrere Modifikationen der differentiellen Lyse erstellt mit dem Ziel, die weibliche Zellfraktion zuverlässiger zu reduzieren und die Spermienzahl möglichst gering zu beeinflussen.

Wiegand et al passten die Lysebedingungen des ersten Lyseschrittes an die zuvor ermittelte Spermienzahl an [92]. Die Konzentration der Proteinase K war hierbei durchgehend höher als im Primärverfahren von Gill und Jeffreys [27]. Im Rahmen der 1992 veröffentlichten Modifikation hoben die Autoren die vorangehende lichtmikroskopische Durchmusterung der HE-gefärbten Probenausstriche hervor. Die Menge der im ersten Lyseschritt verwandten Proteinase K wurde an die Zahl der gesichteten Spermien angepasst. Nach weiterer Prozessierung waren in der gelelektrophoretischen Darstellung die männlich zuzuordnenden Banden deutlich ausgeprägter sichtbar bei geringerem Hervortreten der weiblichen; darüber hinaus waren zuvor nicht dargestellte, männlich zuzuordnende Banden darstellbar. [92] Durch Yoshida et al wurden sowohl die Proteinase-Konzentrationen als auch die Inkubationstemperatur sowie –dauer erhöht, der erste Lyseschritt verlief bspw. drei Stunden bei 70°C. Zu einer Lyse von Spermien sei es hierunter nicht gekommen, eine Kontamination mit weiblicher DNA wurde nicht festgestellt. [98]

Eine relevante Rolle spielen auch die zur Differentiellen Lyse verwendeten Puffer wie durch Norris et al. aufgezeigt und 2007 veröffentlicht. [59] Zusammenfassend wurde in der Untersuchung mehrerer Puffersubstanzen ein Vorteil für die alleinige Verwendung von SDS gesehen; Endpunkt war die hämatocytometrisch nachgewiesene Spermienzahl. Die zusätzliche Inkubation mit Proteinase K wie derzeit gebräuchlich reduzierte zumindest in dieser Versuchsreihe die

Spemienzahl wieder mit zeitlichem Schwerpunkt innert der ersten Inkubationsminute.

#### 1.5.2 Weitere Verdaumethoden

Neben der im Rahmen der differentiellen Lyse inbegriffenen Verdaumethoden sind auch vorgeschaltete Enzyminkubationen, wie bspw. mit Cellulase aus einer Aspergillusart möglich, womit die Ausbeute an intakten Epithelien korrelierend zur Enzymkonzentration erhöht werden konnte. Wir verweisen hier exemplarisch auf die Veröffentlichung von Vorhees et al. 2006. [90]

#### 1.5.3 Zellauftrennung durch FACS

FACS (Fluorescence activated cell sorting) nutzt unterschiedliche Eigenschaften der in Mischspuren enthaltenen Zellen, wobei im Wesentlichen Vaginalepithelien, Lymphocyten und Eizellen sowie Debris zu nennen sind. Unterschiede ergeben sich bspw. aus Zellgröße und -form, Oberflächeneigenschaften, Cytoplasma und Ploidität. Im Gegensatz zu Epithelien tragen Spermien keine MHC I (entspricht HLA I) –Oberflächenantigene sowie Cytokeratinstrukturen; auf der Oberfläche der Leukocyten wiederum findet sich das CD 45 – Epitop, was auf Spermien nicht nachweisbar ist. Die genannten Zellstrukturen können mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten monoklonalen Antikörpern detektiert werden. Darüberhinaus vermag quantitative DNA-Färbung flusscytometrisch den Unterschied zwischen den haploiden Spermien und diploiden Vaginalepithelien darzustellen. Somit kann aufgrund des unterschiedlichen Fluoreszenzverhaltens die Zellauftrennung durch die FACS-Prozedur erfolgen. Im Rahmen ihrer Vergleichsstudie stellten Schoell et al. 1999 das genannte Verfahren der differentiellen Lyse gegenüber und beschrieben eine global erhöhte Sensitivität der FACS-Methode im Vergleich zur differentiellen Lyse. [80]

#### 1.5.4 Filtrationsverfahren

Chen et al. beschrieben 1997 erstmals die Filtration als Separationsmethode der Spermien von der Epithelzellfraktion in Mischspuren. [10] Es wurden Ejakulatmischspuren über Nylonfilter unterschiedlicher Porengrößen filtrierte. Die

Filtration erfolgte durch simplen Durchfluss oder alternativ per Zentrifugation. Als adäquate Porengrösse wurden im Versuch 5 bis 10  $\mu\text{m}$  festgehalten. Es wurde gezeigt, dass bei adäquater Porengrösse Spermien auf den Filter zurückgehalten werden und das Filtrat eine deutlich reduzierte Menge an Epithelien aufzeigt.

2003 beschrieb Garvin eine alternative Filtrationsmethode, die sich die weitgehende Resistenz der Spermien gegenüber Proteinase K zunutze macht. [26] Ejakulatmischspuren wurden zunächst mit Proteinase K inkubiert. Die Filtration erfolgte doppelt, zunächst über einen grob-, dann feinporigeren Filter. Zusammenfassend wurde eine Anreicherung der männlichen DNA um den Faktor 45 aufgezeigt.

#### 1.5.5 Mikrofluidik

Von einer Vielzahl von Autoren wurden Zellseparationssysteme auf der Basis mikrofluidischer Vorrichtungen (Mikrochips) beschrieben. Wir verweisen hier beispielhaft auf zwei Arbeiten der Gruppe um Katie Horsman. [37;38]

#### 1.5.6 Lasermikrodissektion (LMD/LCM)

Die Methode der laser microdissection (LMD) oder auch laser capture microdissection (LCM) wurde am National Cancer Institute (MD/USA) durch Emmert-Buck et al entwickelt und ermöglicht die Isolation jeder beliebigen Zelle von einem handelsüblichen Objektträger. [20] Das Mikroskopiepräparat wird temporär mit einem transparenten thermoplastischen Film (bspw. Ethylvinylazetat oder Polyethylen) überdeckt. Bei der Durchmusterung werden eine oder mehrere gewünschte Stellen selektiv kurzzeitig von einem Infrarot- oder Ultraviolett-Laser beschossen. Dadurch wird aufgrund der lokalisierten Hitzeentwicklung der gewählte Bereich von dem Film umschmolzen. Im Anschluss kann der Film mit den eingeschlossenen Zellen abgehoben und die Zellen direkt in ein entsprechendes Medium verbracht werden. Eine Einschränkung hinsichtlich der Gewebeauswahl besteht nicht. Etwaig folgende PCR-Prozeduren seien aufgrund der nur kurzzeitigen Erhitzung nicht oder nur gering beeinträchtigt. Durch Änderung des Durchmesser des Laserstrahls können Zellen oder Gewebe unterschiedlicher Grösse transferiert werden; der Erstautor Emmert-Buck

beschrieb als kleinstmögliche Einheit Grössen von ungefähr 30  $\mu\text{m}$  [20], während in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2000 von Curran et al. Areale bis minimal 7,5  $\mu\text{m}$  angegeben wurden. [14] Aus eigenen Erfahrungen und Recherchen von Curran zeigte sich, dass zur Anwendung von LCM bevorzugt trockene und gefärbte Präparate geeignet sind. Als günstige Präparatdicke wurden 7  $\mu\text{m}$  mit einer möglichen Spannweite von 5 bis 20 angegeben. [14]

Schütze und Lahr beschrieben 1998 die heute vielfach angewandte Methode, gewünschte Zellen ohne deren Berührung aus dem Präparat zu isolieren [81]. Durch Beschuss mittels eines geringenergetischen Lasers entsteht eine geringen Distanz zwischen der gewünschten Lokalisation und dem Umfeld; im Anschluss können durch Belasern mit höherer Energie die isolierten Zellen in ein Behältnis (bspw. Eppendorftube) katapultiert werden (laser capture microdissection). [81]

#### 1.5.7 Weitere Separationsmethoden

Durch Eisenberg wurde 2002 die Möglichkeit einer Zellseparation durch magnetische beads beschrieben. Magnetische Mikrokugeln, mit unterschiedlichen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantigene von Spermatozyten versehen, binden durch diese Spermien an sich und können als Komplex gesichert werden. Einschränkend hierfür könnte bereits eingetretene Membranschädigung sein, die die betroffenen Zellen den beads entziehen kann. [19]

Ebenfalls mittels Mikrokugeln (nicht magnetisch sondern adhäsiv) erfolgte durch Brück et al. die Separation von Spermien in Proben mit geringer Zellzahl unter dem hochauflösenden Stereomikroskop und deren direkte Übergabe in das PCR-Behältnis. [8]

### 1.6. Polymerase chain reaction (PCR)

Die Methode, die es ermöglicht, von einer DNA-Sequenz beliebig viele Kopien zu erstellen, wurde 1983 von Kary Mullis entdeckt, der 1993 dafür den Nobelpreis für Chemie erhielt.

Die Originalprotokolle der PCR wurden erstellt von Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986 sowie Mullis und Faloona 1986.

Die DNA-Sequenzierung, d.h. das sogenannte DNA-Fingerprinting, erfordert die Vervielfachung der gewünschten Sequenzen im Vorfeld. Deren Lokalisation und umliegenden Bereiche sind bekannt. Zum PCR-Reaktionsansatz werden neben der template- (Ausgangs-) DNA folgende Faktoren hinzugegeben: Nucleotide, Oligonucleotidprimer sowie hitzestabile DNA-Polymerasen.

Die PCR verläuft in drei Schritten: während der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge aufgetrennt und somit den weiteren Schritten zugänglich gemacht. Während des Annealing hybridisieren die Oligonucleotidprimer an der template-DNA.

Die Elongation umfasst die Synthese neuer DNA-Einzelstränge. Der genannte Zyklus wird je nach Protokoll ca. 30 mal vollzogen. Wir verweisen hierzu auf die einschlägige Literatur. [56;79;57;85;88]

1998 wurde erstmals die Möglichkeit der PCR auf Mikrochipbasis beschrieben [60] mit seit diesem Zeitpunkt erschienenen weiteren Veröffentlichungen.

### 1.7. Das DNA-Profil

Mit Ausnahme eineiiger Zwillinge verfügt jeder Mensch über ein einzigartiges Genom, welches ihn eindeutig identifiziert. Insgesamt besteht das menschliche Genom aus ca. 3,5 Mrd. Basenpaaren, wobei lediglich ein Bruchteil davon tatsächlich Gene oder genverwandte Sequenzen codiert. Die Angaben diesbezüglich sind in der Literatur divergent mit Zahlen zwischen 3 und 20 %. Die Anzahl der Gene wird mit ca. 30000 bis 50000 beziffert. Zur Erstellung eines „genetischen Fingerabdrucks“ ist es notwendig, eine ausreichende Zahl an DNA-Sequenzen zur Darstellung zu bringen. Die ursprüngliche Technik wurde 1985 von Alec Jeffreys entwickelt. [58] Üblicherweise geschieht dies mittels der Sequenzierung von short tandem repeats (STR's), auch Mikrosatelliten genannt. Dabei handelt es sich um im gesamten Genom vorkommende Wiederholungseinheiten, wobei die repetitive Basiseinheit (simple sequence) eine Länge von 1 bis 7 Basenpaaren hat. [81; 76] Interindividuell unterschiedlich ist nun

die Anzahl der Wiederholungen (= Polymorphismus), welche durch Elektrophorese ermittelt werden kann. Die Motive werden einige Dutzend bis maximal einige hundert Mal wiederholt. Die Gesamtlänge eines solchen Mikrosatelliten, welche als Ganzes wiederum ebenfalls repetitive Elemente darstellen, beträgt in der Regel 100 – 200 Basenpaare. [77] Durch die Kürze des Gesamtfragmentes ist es auch möglich, hochdegradierte DNA zu sequenzieren. Zieht man zur Erstellung eines DNA-Fingerabdrucks mehrere Loci hinzu, gewinnt man ein Profil, was mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nur einer einzigen Person zugeordnet werden kann – es sei denn, die Person hat einen eineiigen Zwilling. Derartige Loci sind auf Autosomen untersucht, aber auch auf dem Y-Chromosom (Y-STR). Praktiziert wurde dies erstmals 1992 von Roewer und Eppelen. [76] Die DYS-Systeme sind datenbanklich nicht erfasst. Zu beachten ist, dass im Sexualdeliktsfall bei erbrachten Y-STR-Profilen nicht nur der Beschuldigte, sondern auch die direkten männlichen Verwandten als Spurenleger in Betracht kommen, da das Y-Chromosom direkt in der paternalen Vererbung weitergegeben wird. [77; 48] Die Darstellung der Allele erfolgt EDV-gestützt nach kapillargelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte in Form einer Leiter.

Derart erstellte DNA-Profile können einerseits mit direkten Vergleichsspuren, z.B. dem Wangenschleimhautabstrich eines Tatverdächtigen oder mit den in einer Datenbank gespeicherten Profilen verglichen werden. Seit 1998 führt das Bundeskriminalamt Wiesbaden eine solche Datenbank (DNA-Analyse-Datei), in der sowohl anonyme Profile als auch die verurteilter Straftäter und Tatverdächtigen gespeichert werden. [7; 94] Voraussetzung für die Speicherung der Daten ist die Einstufung des Delikts als „schwer“, d.h. mindestens ein Jahr Haftstrafe. [7]

Die Rechtsgrundlagen bezüglich Probenentnahme, Datenerhebung und -speicherung sind in der StPO § 81 festgehalten. [97]

## 1.8. Zielsetzung

Bei Angabe eines Sexualdelikts ist die Spurensicherung im weiblichen Genitale von herausragender Bedeutung. Neben einer Plausibilitätsprüfung und Hilfe zur Klärung des Tathergangs dient sie der Gewinnung von untersuchungsfähigem Material, um den Täter identifizierend zu können.

Im Rahmen der derzeit Spurensicherungsmethode kommen langstielige Baumwollspureenträger zum Einsatz, mittels derer punktuell Sekretspuren entnommen werden, um sie in der Folge der prozessualen Routine zuzuführen: Ziel ist schlussendlich die Erstellung des DNA-Profiles des Spurenlegers.

Nicht nur aufgrund naturgemäss vorhandener Schwachstellen der Routineabläufe kann die Profilerstellung erschwert sein oder fehlschlagen. Durch Bewegung des Opfers nach der Spurenlegung, durch intravaginale Drainage, lytische Prozesse, Körperpflege und auch bedingt durch die Konsistenz des Vaginalsekrets kann der Umfang der Spur rasch dezimiert werden. Massgeblichen Einfluss auf den Nachweis männlicher DNA-haltiger Zellen übt daher auch das Zeitintervall zwischen Spurenlegung und –sicherung aus. Bereits nach wenigen Stunden dezimiert sich die Zahl der Spermatozyten innerhalb der Vaginalkavität rasant. In diesem Falle kann die punktuelle intravaginale Sekretabnahme letztlich ohne die gewünschte Zellpopulation verbleiben oder nur geringe unzureichende Zellzahlen sichern. In diesen Fällen kann eine flächenhafte Spurensicherung mittels eines alternativ gestalteten Spurenrägers vermutlich hilfreich sein.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt das Risiko der Retraumatisierung des Sexualdeliktsopfers durch die derzeit gängige Spurensicherungsmethode dar, die zwingend in klinischem Setting erfolgt. Unter Umständen nur kurze Zeit nach dem traumatischen Erlebnis muss die Geschädigte den vulnerabelsten Bereich ihres Körpers gegenüber fremden Untersuchern exponieren, was erneut zu Angst und Ohnmachtsgefühlen führen kann. Daher stellt sich die Frage, inwiefern die Spurensicherung in einer für das Opfer weniger belastenden Art und Weise oder gar in Eigenregie durchgeführt werden kann.

Desweiteren gilt es den juristischen Aspekt zu berücksichtigen. Sollte, möglicherweise aufgrund von Schwachstellen der Spurensicherungsmethode, der Nachweis männlichen biologischen Materials in der Mikroskopie oder DNA-Sequenzierung fehlschlagen, ist die Beweislage hinsichtlich eines angegebenen Deliktes und die Täteridentifizierung deutlich erschwert.

Im Rahmen dieser Studie wurde als alternativer Spureenträger der doppellagige Baumwollfingerling untersucht, mit dem auf verhältnismässig einfache und schonende Weise, u. U. durch die Geschädigte selbst, die Spurensicherung durchgeführt werden kann. Es wird eine im Vergleich zu den etablierten Spureenträgern grössere Menge an Mischsekret gesichert, wodurch ggf. auch nach längerer zeitlicher Latenz noch männliches DNA- haltiges Material identifiziert werden kann.

Ziel der Studie ist es, unter größtmöglicher Schonung des Opfers, die Tauglichkeit des Fingerlings für die Spurensicherungsroutine zu überprüfen. Als zentrale Fragen erschienen hierbei:

- **Wie kann die Mischspur zuverlässig vom Spureenträger abgetrennt werden?**
- **Wie können die Spermien von den weiblichen Komponenten separiert werden?**

Von Interesse ist hierbei auch, nach welchem zeitlichen Abstand zwischen Geschlechtsverkehr und Spurensicherung die Mikroskopie von Fingerlingspuren noch Spermien nachzuweisen vermag. Desweiteren wurde untersucht, in welcher Form die Fingerlingspur der forensischen Routinearbeit in Form von DNA-Amplifikation und –Sequenzierung zugeführt werden kann.

Im Weiteren wurde mittels der Erstellung von DNA-Profilen versucht, einen Vergleich zwischen der etablierten und alternativen Abstrichmethode zu ziehen.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Studienaufbau

Die vorliegende Studie besteht aus zwei Studienarmen. Initial wurde eine Vergleichsstudie angestrebt: Gynäkologische Untersucher sicherten zu festgelegten postkoitalen Zeitpunkten die Spur nach etablierter Methode mittels langstieliger Baumwolltupfer und im Anschluss daran nach der neu zu evaluierenden Methode mittels des Baumwollfingerlings. Die erhaltenen Spuren sollten anhand der detektierbaren Spermienzahl in Cytologiepräparaten und erhältlichen DNA-Profilen verglichen werden. Die erhaltenen Spuren wurden zunächst nach etablierten Methoden verarbeitet. Bezüglich der labortechnischen Handhabung des Baumwollfingerlings jedoch bestehen keinerlei wissenschaftlichen Vorerfahrungen, da dieser nach ausführlicher Recherche in der Literatur bislang in forensischem Kontext noch keine Verwendung fand. Wir stellten daher mehrere Fehlerquellen und Fragestellungen fest:

Das Ausschneiden von Fingerlingteilen und deren reguläres Einsetzen in die Differentielle Lyse würde das Konzept der flächenhaften Spurensicherung in Frage stellen. In einigen Versuchen stellte sich zusätzlich heraus, dass durch simples Ausschneiden von Proben aus dem Fingerling keine DNA-Profile erhältlich waren, diese Möglichkeit also nicht zielführend war aufgrund des grossen Überschusses an weiblichem DNA-haltigem Material. **Daher war die Entwicklung einer neuen Strategie zur zuverlässigen Ablösung der gesamten Mischspur vom Spureträger notwendig.**

Jede intravaginal gesicherte Spur weist als Mischspur eine wesentlich grössere weibliche als männliche Fraktion auf. Dies macht die Durchmusterbarkeit erstellter Cytologiepräparate aufwendig und kann die Darstellbarkeit der Spermien stark erschweren, sodass eine cytologischer Spermienachweis völlig fehlschlagen kann, obwohl unter Umständen eine ausreichende Anzahl von Spermien im Präparat enthalten ist. Darüber hinaus verhindert ein grosser Überhang weiblicher DNA die Erstellung eines autosomalen DNA-Profiles, während ein Profil anhand von Y-Markern durchaus erstellbar sein kann. Bei einem unbekanntem Täter jedoch muss das erhaltene Profil mit der DNA-Datenbank des Bundeskriminalamtes abgeglichen werden. Dieses führt nur autosomale Profile.

**Daraus ergab sich die Fragestellung, wie die männliche Fraktion ohne grosse Einbußen von der weit überwiegenden Masse der Vaginalepithelien getrennt werden kann.**

Zur erfolgreichen Erstellung eines DNA-Profiles muss in der Probe, die der PCR und dann Sequenzierung zugeführt wird, eine Mindestzahl an Spermien vorliegen. Bei einer benötigten Menge von ca. 50 pg DNA entspricht dies ca. 15 Spermien. **Es war die grösstmögliche Optimierung der Aufkonzentration der erhaltenen männlichen Zellfraktion notwendig.**

Die so entstandenen Fragen machten einen zweiten Studienarm notwendig. Probandinnen führten zu flexibel festgelegten postkoitalen Zeitpunkten eigenständig die Spurensicherung mittels des Baumwollfingerlings durch. Wattetupfervergleichsspuren wurden nicht angefertigt. **Mit den erhaltenen Spuren wurde die Suche nach und dann Optimierung der Verarbeitungsmethode durchgeführt.**

## 2.2. Akquirierung von Probanden

Die Spurengewinnung wurde im Rahmen dieser Studie mit freiwilligen Probanden durchgeführt. Wie bei diesem sensiblen Thema nachvollziehbar, war deren Akquirierung eine Herausforderung und wurde einerseits durch Auslage von Informationsmaterial, hauptsächlich jedoch durch Anwerbung persönlich bekannter Freiwilliger bewerkstelligt. Unter den aus dem Aufklärungsbogen (Anlage 1 s. Anhang) ersichtlichen Punkten wurden die freiwilligen Paare insbesondere über folgende Sachverhalte eingehend aufgeklärt:

1. Die Prozessierung des gewonnenen Abstrichmaterials erfolgt vollständig anonymisiert. Noch während der Spurensicherung wird das Spurenmaterial codiert; die Zuordnung zum Probandenpaar ist nur durch die Studienleitung möglich.
2. Innerhalb der Abstricherhebungen muss ein konstanter Geschlechtspartner gewährleistet sein, da auf einen Wangenschleimhautabstrich beim männlichen Partner verzichtet wird. Nur so können im Hinblick auf die DNA-Sequenzierung Irritationen vermieden werden.

3. Zur Teilnahme an der Studie ist hinsichtlich der Verhütungsmaßnahmen der Verzicht auf Barrieremethoden zwingend.
4. Insbesondere hinsichtlich der Aussagekraft eines sogenannten DNA-Profiles bestanden ausgeprägte Unsicherheiten seitens der freiwilligen Probanden. Es wurde eingehend verdeutlicht, dass die Untersuchung der männlichen DNA keine Rückschlüsse auf persönliche Merkmale, Charakterzüge oder etwaige Krankheiten zulässt, da ausschliesslich STR's, nicht aber codierende Sequenzen zur Untersuchung herangezogen werden. Desweiteren wurde versichert, dass eine Weitergabe an Dritte weder von Spurenmaterial noch von Analyseergebnissen stattfinden wird.

Nach einem ausführlichen persönlichen Aufklärungsgespräch unterzeichneten die Probanden jeweils eine entsprechende Einverständniserklärung (Anlage 2 s. Anhang).

Bezüglich des Studienablaufs wurden die Probanden detailliert bezüglich der drei für den Vergleichsarm vorgesehenen Spurensicherungstermine instruiert. Deren Reihenfolge ist beliebig durch die Probanden wählbar:

1. *Abstrich 1* wird 24 +/- 4h nach Geschlechtsverkehr (GV) abgenommen und folgendermaßen kategorisiert:  
→ **F1/ Codenummer der Probandin**
2. *Abstrich 2* wird ebenfalls in einem 24 h – Intervall gesichert, hierbei jedoch nach ohne Ejakulation praktiziertem Koitus, um untersuchen zu können, in welchem Ausmaß männliche Epithelzellen in der DNA-Untersuchung nachweisbar sind. Eine etwaige Kontamination mit Spermien aus einem vorangegangenen GV ist zwingend zu vermeiden, weswegen die Probandin in den letzten vorangehenden Tagen sexuell abstinent gewesen sein sollte. Alternativ kann im Vorfeld Verkehr mit Barrieremethoden vollzogen worden sein. Die Kategorisierung lautet:  
→ **F2/ Codenummer der Probandin**
3. *Abstrich 3* sieht einen Zeitabstand von 66 +/- 6h bei GV mit Ejakulation vor. Mittels dieses Abstriches soll überprüft werden, ob nach länger bemessener zeitlicher Latenz ein aussagekräftiges DNA-Profil des

Mannes erstellbar ist und wie viele Spermien in der Mikroskopiepräparat sichtbar sind. Es wurde folgendermaßen kategorisiert:

→ **F3/ Codennummer der Probandin**

Im Rahmen eines jeden Abstrichtermins wurde regulär ein Fragebogen erhoben, in dem Zeitintervall zwischen GV und Abstrich, Dauer des GV's, Stattfinden einer Ejakulation, Zeitpunkt des vorletzten Verkehrs sowie Verhütungsmethode dokumentiert wurden.

Insgesamt konnten für die Vergleichsreihe neun Paare aquiriert werden. Hierbei wurden in fünf Fällen alle drei Abstriche durchgeführt, in zwei Fällen nur *Abstrich 1*, in zwei Fällen *Abstrich 1* und *3*.

Die Spurensicherung im Methodenarm erfolgte durch insgesamt vier Probandinnen vollständig in Eigenregie. Die Studienteilnehmerinnen dokumentierten Datum und Uhrzeit von Geschlechtsverkehr und zugehöriger Spurensicherung, ausserdem den Zeitpunkt des letzten vorangegangenen Koitus. Die postkoitalen Intervalle waren hierbei von Seiten der Studienleitung grob vorgegeben.

Im Zeitraum zwischen GV und Abstrichnahme ist reguläre Körperpflege möglich; die Probandinnen wurden jedoch explizit darauf hingewiesen, auf Vollbäder oder Scheidenspülungen zu verzichten, um die Untersuchungsergebnisse nicht durch Reduktion der Spermienanzahl durch Ausspülen zu verfälschen.

Die Studienteilnehmer wurden für ihre Bemühungen mit einer finanziellen Zuwendung in Höhe von 25 € entschädigt.

### 2.3 Fingerling und Faltschachtel

Mit dem Baumwollfingerling ist auf eine einfache und schnelle Art kostengünstig die flächenhafte Spurensicherung im vaginalbereich möglich, indem ohne Spekulum Einsatz durch den Untersucher oder die Geschädigte selbst der gesamte Scheidenverlauf ausgewischt werden kann. Der Fingerling, in der Länge ca. 10

cm messend, besteht aus zwei am Pol des Fingerlings in einer kurzen Naht miteinander verbundenen Baumwolllagen. Hinsichtlich des Verwendungszweckes im Rahmen der Studie verwendeten wir steril verpacktes Material (Dampfsterilisation).

Für die Baumwollfingerlinge wurde im Rahmen dieser Studie eigens eine spezielle Faltschachtel in Anlehnung an die Faltschachtel nach Hochmeister [35] entworfen, die die Kriterien von sicherer Transportfähigkeit, Luftdurchlässigkeit zur Vermeidung von Schimmelbildung und mikrobiellem Wachstum sowie ausreichendem Abstand zwischen Spurentägern und Innenwänden erfüllt. Aufgrund der Materialeigenschaften und der Konzeption des Kartons liegt der Fingerling den Innenwänden nicht an, um ein Anhaften des Spurentägers an der Innenwand und dadurch den Verlust von Zellmaterial zu vermeiden. Im Innenraum der Faltschachtel befindet sich eine ausgestanzte, nach innen klappbare Lasche, über die der Fingerling direkt vom Finger gestülpt wird. Wie auch die Faltschachtel von Hochmeister, besteht die stabile Fingerlingtransportbox aus luftdurchlässigem Karton. (Abb. 17)

Die herkömmlichen Watteträger wurden gemäss der etablierten Methode verpackt. Die Faltschachtel nach Hochmeister verfügt in ihrem Inneren über zwei nach innen klappbare Kartonlaschen, in die jeweils zwei Löcher vorgestanzt sind, durch die die Watteträger hindurchgeschoben werden können. Sie sind daher sicher im Inneren fixiert und liegen den Wänden nicht an. (Abb. 15)

## 2.4 Spurenentnahme

Die Durchführung der Spurenentnahme im Vergleichsarm erfolgte, ähnlich einer gynäkologischen Routineuntersuchung, auf einem entsprechendem Untersuchungsstuhl. Beteiligt war an zwei verschiedenen Standorten jeweils nur ein gynäkologischer Facharzt, um die untersucherbezogene Fehlerquelle möglichst gering zu halten. Die kooperierenden Studienkliniken waren die Universitätsfrauenklinik Heidelberg sowie die gynäkologische Abteilung des Kreiskrankenhauses Schwetzingen.

Zu Beginn erfolgte die Materialentnahme gemäss der etablierten Methode unter Verwendung dreier separater langstieliger Baumwollwatteträger: punktuell wurden

zunächst am Introitus vaginae, dann nach Einlage eines Spekulum jeweils im Cervikalkanal und im hinteren Scheidengewölbe Sekretspuren gesichert. In der Folge wurde das Spekulum entfernt, um mittels der Vergleichsmethode in Form des Fingerlings die Spurenentnahme durchzuführen. Auf dem behandschuhten Finger des Untersuchers kann der Fingerling in die Vagina eingeführt und diese durch vorsichtiges Drehen des Fingers vollständig abgewischt werden. Da es zuvor durch das Spekulum bereits zu Materialverlust gekommen sein dürfte, der unter alleiniger Anwendung der Vergleichsmethode nicht entstanden wäre, wurde dies dadurch kompensiert, dass das Becken des Spekulum im Anschluss mit dem Fingerling abgewischt wurde.

Die Spureenträger wurden anschliessend in den unter 2.3 beschriebenen Behältnissen aufbewahrt und transportiert. Alle Behältnisse wurden sofort beschriftet und noch im Rahmen der Abstrichentnahme durch Codenummernvergabe auf dem Verpackungsmaterial anonymisiert. Wie bereits oben beschrieben, wurde im Anschluss an jeden Termin von der Probandin ein Fragebogen (Anlage 3 s. Anhang) ausgefüllt. Durch den Untersucher wurden jeweils Zeitpunkt von Spurensicherung und GV sowie etwaige gynäkologische Besonderheiten dokumentiert. (Anlage 4 s. Anhang).

Im Vergleichsarm führten die insgesamt vier Probandinnen die Spurensicherung selbstständig durch Einführen des Fingerlings auf dem Finger und vorsichtiges, aber sorgfältiges Drehen in der Scheide selbst durch. Die postkoitalen Intervalle wurden hier durch die Studienleitung grob vorgegeben. Wattetupferspuren wurden nicht angefertigt. Die Probandinnen dokumentierten postkoitales Intervall und Zeitpunkt des betreffenden sowie des dem vorangegangenen GV auf der Faltschachtel.

Die in allen Fällen gewonnene Spur besteht im Wesentlichen als Mischsekretspur zum weit überwiegenden Teil aus Vaginalsekret und –epithelien sowie zum deutlich geringeren Anteil aus Ejakulat und abgeriebenem männlichem Plattenepithel.

Sowohl Untersucher als auch Probandinnen wurden im Vorfeld bzgl. der Verwendung der Faltschachtel detailliert instruiert.

Durch Trocknung direkt in der luftdurchlässigen Faltschachtel wird unter Minimierung des Materialverlusts Lagerungsstabilität erzielt, sodass es auch nach mehrmonatiger Probenverwahrung möglich ist, die Untersuchungen durchzuführen.

## 2.5 Handhabung des Fingerlings

Grundlegender Gedanke bei Verwendung und Verarbeitung des Fingerlings war die Annahme, durch eine deutliche Vergrößerung der intravaginal abgestrichenen Fläche eine flächenhafte und somit vollständige Ausbeute an männlichen Zellen zu erreichen.

Die unter 2.7 beschriebene etablierte Methode der DNA-Isolierung, die differenzielle Lyse, ist im Falle des Fingerlings nicht ohne weiteres praktikabel aufgrund einer ausgeprägten Zunahme des ohnehin grossen Überschusses an weiblichen Zellen. Wie oben erwähnt, zeigte sich im Rahmen des Vergleichsarms, dass bei simpler Verarbeitung eines ausgeschnittenen Stückes des Fingerlings, analog zur Verarbeitung der Watteträger, kein aussagekräftiges DNA- Profil des Mannes zu erwarten ist. Somit ergab sich die Notwendigkeit, vorbereitende Methoden zu evaluieren: Wie kann die Trennung der Spur vom Spurenläger in möglichst wenigen Arbeitsschritten verlustfrei und vollständig gelingen? Wie kann die männliche von der weit überschüssenden weiblichen Fraktion getrennt werden? Wie kann die resultierende rein männliche Fraktion möglichst konzentriert werden?

Während die erste Frage sich leicht durch Auswaschen lösen ließ, ergaben sich für die Herausforderung, die männliche Fraktion aus der Mischspur herauszutrennen, mehrere Möglichkeiten: In Anlehnung an Chen et al [10] sowie Garvin [26] evaluierten wir zunächst verschiedene Wege der Filtration, die auf den Grössenunterschieden der vorliegenden Zellen basiert. Nach initialen Filtrationsversuchen mittels einer Filterkonstruktion aus Eigenbau (s. 2.5.2) führten wir die Filtration über einen Spritzenvorsatz mit eingelegtem Cellulosefilter durch (s. 2.5.3). Als weitere Filtrationsmöglichkeit evaluierten wir die Vivaclear®-Vorrichtung (s. 2.5.4). Alle genannten Systeme waren letztlich für unsere Zwecke

aus verschiedenen später aufgeführten Gründen nicht zweckdienlich. Wir orientierten uns neu: Aufgrund der unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften von Vaginalepithelien und Spermien evaluierten wir die Zentrifugation als Auftrennungsmethode. (s. 2.5.5)

Abschliessend wurden beide Methoden in Kombination mit dem Vivaclear®-Systems auch gemeinsam angewandt. (s. 2.5.6)

In allen Fällen verzichteten wir auf einen orientierenden Spermanachweis direkt auf dem Spureträger (z. B. Saure Phosphatase-Nachweis durch den Phosphatesmo®-Streifen). Unter der Annahme einer verlängerten Nachweisdauer von Ejakulat durch den Baumwollfingerling wäre dies nicht sinnvoll gewesen, da bspw. der SP-Nachweis durch Phosphatesmo® in der Regel nur bis 48 Stunden gelingt [3], ebenso der PSA-Nachweis mittels der Nobi-View-Testkassette. [3]

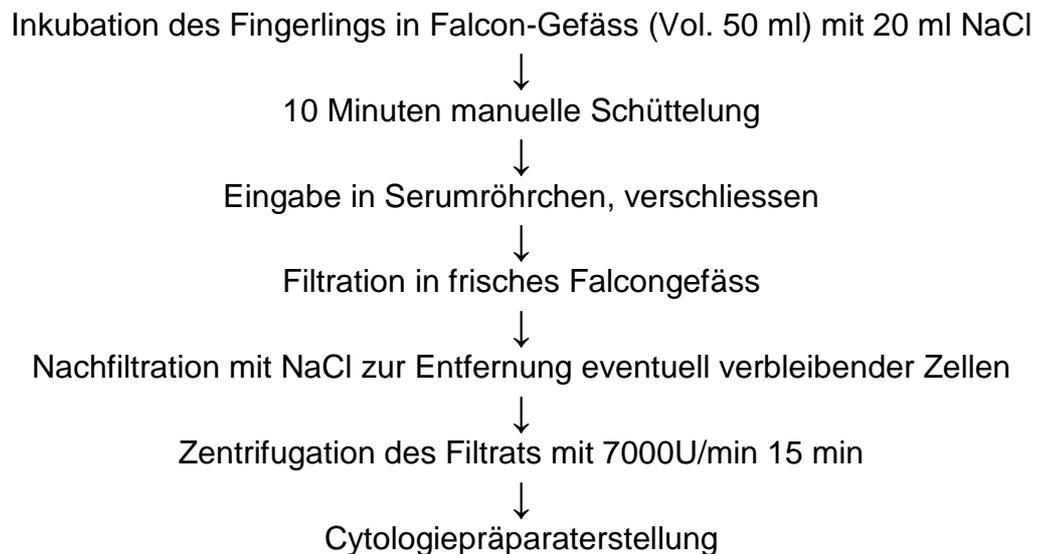
#### 2.5.1 Trennung der Spur vom Baumwollfingerling

Da die Spermien auf dem Fingerling breit verstreut vorliegen, ist eine Abtrennung und Weiterverarbeitung isolierter Fingerlingstücke nicht zielführend. Es ist nötig, die gesamte Spur vom Spureträger zu trennen. Wir führten dies durch Auswaschung des Baumwollfingerlings durch: in Falcongefässen (Volumen 50 ml) wurden die Fingerlinge mit ca. 20 ml NaCl inkubiert und geschüttelt, sei es durch einen Schüttelinkubator oder manuell. Dies führt zu einem Abwaschen der Mischspur. Als vorteilhaft erwies sich im Verlauf die Zugabe von etwas handelsüblicher Flüssigseife.

#### 2.5.2 Filtration in selbst gebauter Vorrichtung

Die Baumwollfingerlinge wurden mit 0.9%iger Natriumchloridlösung in einem Falcongefäss ausgewaschen und anschliessend über ein speziell präpariertes Serum-Blutentnahme-Röhrchen gegeben: Wir entschieden uns für Serumröhrchen aufgrund der fehlenden Substanzversetzung wie bei anderen Blutröhrchen üblich; auch wegen des vergleichsweise grossen Volumens. Die Kappe wurde abgeschraubt, die inliegenden Kügelchen entfernt. Wir schnitten aus Cellulosefiltern der Porengrösse 8 µm dem Innendurchmesser der Röhrchen

entsprechende Stücke aus. Sie wurden jeweils eingelegt; das Röhrchen mit seinem Aufsatz wurde nach Füllung mit der Fingerlingwaschlösung wieder verschlossen. Ein handelsüblicher Blutentnahmemultiadapter wurde aufgesetzt.



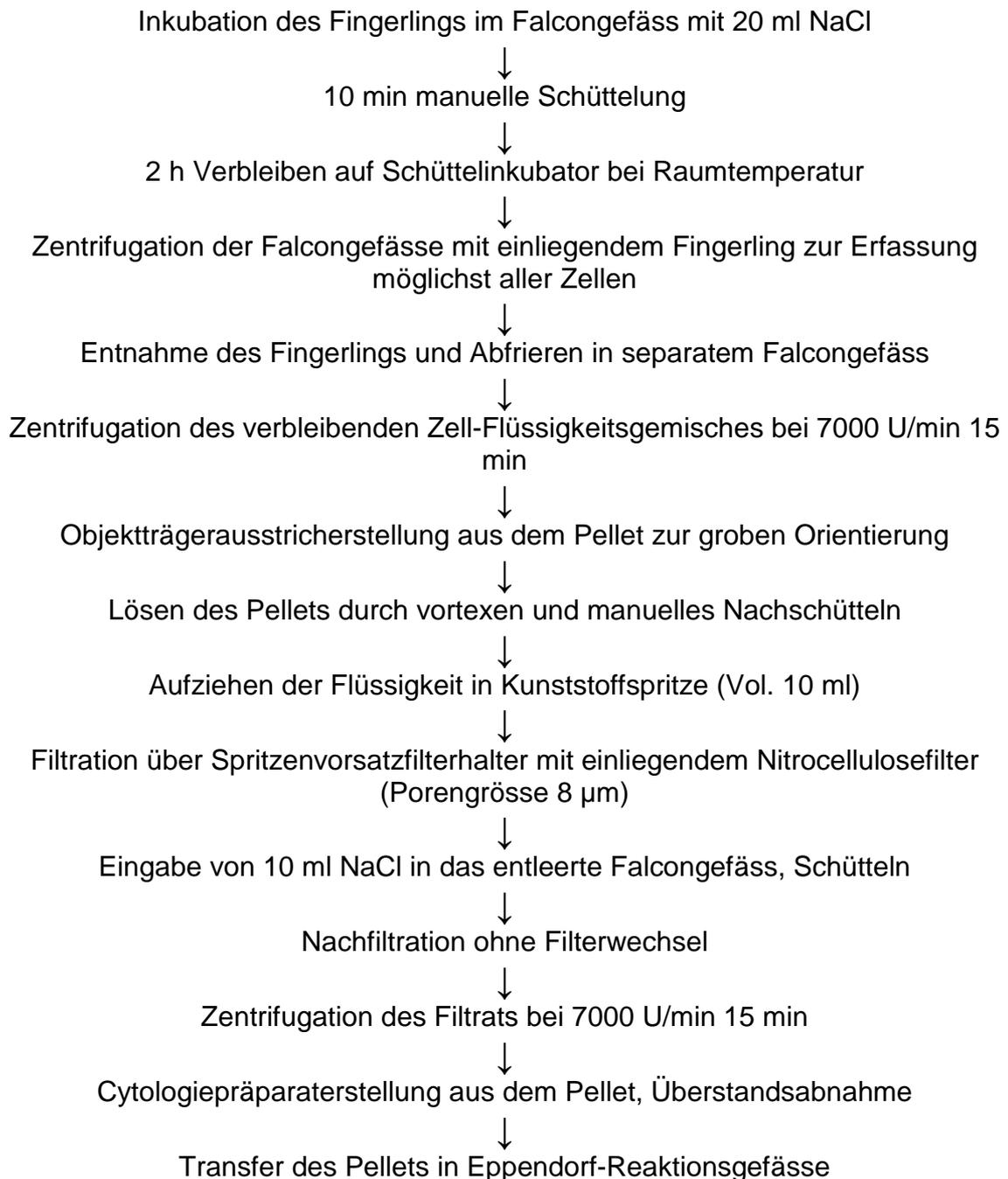
Insgesamt wurden folgende 21 eigenständig durch Studienteilnehmerinnen gesicherte Fingerlingspuren derart verarbeitet.

**→ P I, P II, P III, P V, P VI, Test 7h, Test 13h, K1 – K5, Jun 01 – 06, JL 24, F3, F5**

Die Fingerlingabstriche P II, P III und K4 wurden nach ohne Ejakulation verlaufenem Verkehr erstellt.

Die orientierenden Filtrationsdurchläufe liessen die Einsetzbarkeit der Filtration vermuten. Jedoch barg die Methode ein erhöhtes Risiko der Verunreinigung der Proben und beinhaltete zeitaufwendige Arbeitsschritte; desweiteren musste die Waschlösung mehrfach in andere Gefässe umgesetzt werden, was zu Spurenverlust führt.

### 2.5.3 Filtration per Spritzenvorsatzfilter



Nach dem Schritt der manuellen Schüttelung wird rasch eine Trübung der Flüssigkeit durch gelöste Proteine und Scheidenepithelien, auch eine rötliche Verfärbung durch etwaig anhaftende Erythrocyten, sichtbar.

Die Wahl der Porengrösse des Nitrocellulosefilters orientierte sich an den Ausmassen der Spermienköpfe von ca. 2 x 5 µm. Durch die Filtration sollte eine weitgehende Abtrennung der Spermien von den wesentlich grösseren Scheidenepithelzellen bewirkt werden.

Der Filterhalter wurde nach Entfernen des Filters mit aufgereinigtem Wasser sorgfältig ausgespült, wobei er dazu in alle Komponenten zerlegt werden muss.

Auf diese Weise wurden eine Vielzahl von Vergleichsfingerlingen nach GV mit Ejakulation (postkoitale Intervalle 24 +/- 4h und 66 +/- 6h) sowie zwei in Eigenregie erstellte Fingerlingabstriche prozessiert. Im Einzelnen waren dies folgende Proben:

→ **F3/003, F1/007, F3/007, F1/009, F3/009, F1/010, F3/010, F1/011, F1/012, F1/013, F1/014, F3/014, F1/015, F1/016, F1/018, F3/018, KK1; KK2**

Bei der Verarbeitung der *Abstrich 2* – Fingerlinge (ohne Ejakulat) wurde auf eine Filtration verzichtet, da hierbei die DNA des Spurenlegers einzig durch Epithelienabrieb des Mannes repräsentiert und somit im Falle einer Filtration eliminiert wird. In diesem Falle wurde das durch Auswaschen entstandene Zell – Natriumchloridgemisch direkt zentrifugiert.

Nach Überführen in die Eppendorf-Reaktionsgefässe wurde zunächst 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, um sich ein orientierendes Bild von der Grösse des Pellets zu verschaffen. Folgende Fingerlinge wurden derart bearbeitet:

→ **F2/003, F2/007, F2/009, F2/013, F2/014**

Auch hier kommt es zu Spurenverlust durch mehrfachen Gefässwechsel. Das Arbeiten mit dem Spritzenvorsatzfilterhalter umfasst zeitintensive Arbeitsschritte (Filterwechsel und Auswaschen mit anschliessendem Lufttrocknen). Die Arbeit ist teilweise unsauber durch den Filtrationsprozess an sich.

#### 2.5.4 Das Vivaclear®-System

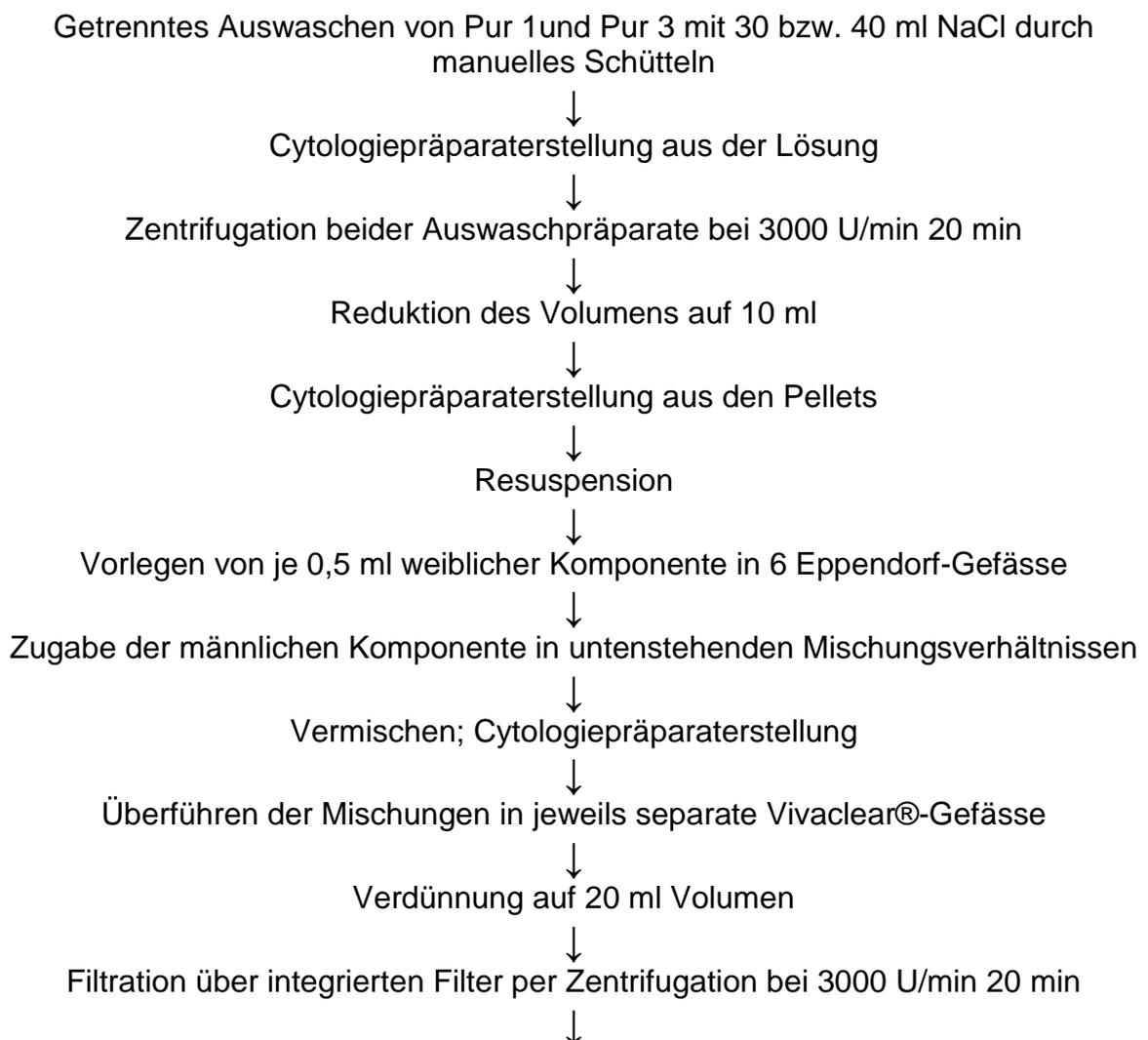
Die Vivaclear®-Filtrationsgefässe, dimensioniert wie herkömmliche Falcon-Gefässe, beinhalten einen ca. die Hälfte der Länge einnehmenden Einsatz, an dessen frei in die Gefässmitte zeigendem Boden fest ein Cellulosefilter

eingelassen ist. Dadurch ist eine Filtration des Auswaschgemisches per Zentrifugation oder lediglich gravitätsbedingt möglich. Eine Entfernung des Spurenrägers oder ein Überführen des Auswaschpräparates sind nicht vonnöten, was jeweils unnötigen Zellverlust verhindert.

Ein vorangehender Testlauf fand mit einem genuinen postkoitalen Fingerlingabstrich (24h postkoital /Test1) sowie einer Verdünnungsreihe aus einem artifiziell erstelltem Ejakulat/Vaginalsekret-Gemisch statt.

Verwandt wurden hierbei Vivaclear-Gefäße mit einliegendem 5 µm-Cellulosefilter.

Für die Verdünnungsreihe verwandten wir einen von einem freiwilligen Probanden mit Ejakulat benetzten Fingerling (Pur1) und einen von einer ausreichend lang sexuell abstinenten Probandin angefertigten Fingerlingvaginalabstrich (Pur3).



Entnahme des Überstandes  
↓  
Cytologiepräparaterstellung aus den Pellets

Mischungsverhältnisse: weiblich : männlich = 1:0,5 (Mix 1); 1: 0,3 (Mix 2); 1: 0,2 (Mix 3); 1: 0,1 (Mix 4); 1: 0,05 (Mix 5); 1: 0,025 (Mix 6)

Die angelieferten Gefässe in ihrer ursprünglichen Form sind nicht flüssigkeitsdicht und somit nicht zur Zentrifugation geeignet. Es wurden daher die Deckel samt Laschen sorgfältig vom Filtereinsatz des Gefässes abgetrennt und der Filtereinsatz in herkömmliche Falcons überführt, welche in der Folge regulär mit den passenden Deckeln verschlossen werden können.

Es folgte nach Abnahme des Überstands aus jedem Versuchsansatz die Tropfpräparaterstellung wie unter 2.6.2 erwähnt. Bearbeitet wurden folgende Proben:

➔ **Pur1, Mix 1, Mix 2, Mix 3, Mix 4, Mix 5, Mix 6, Mix 7**

Fingerling „Test 1“ wurde direkt im Einsatz des Vivaclear-Gefässes platziert und mit 20 ml NaCl inkubiert; es erfolgte das Auswaschen durch manuelles Schütteln. Aus der Suspension wurden Objektträgerausstriche gemäss 2.6.1 erstellt, danach fand die Filtration durch Zentrifugation über 20 Minuten bei 3000 U/min statt. Nach Abnahme des Überstandes wurden wie unter 2.6.2 beschrieben Tropfmikroskopiepräparate angefertigt.

➔ **Test 1**

Auf vergleichbare Weise wurden 15 Vergleichsfingerlinge der Linien *Abstrich 1* und *Abstrich 3* sowie einer von einer Probandin in Eigenregie angefertigter Fingerlingabstrich (postkoitales Intervall 20 h) prozessiert. Die Vergleichsfingerlinge wurden auf diese Weise unter Verwendung von ca. 1 ml handelsüblicher Seife das zweite Mal ausgewaschen. Nach Auswaschen durch manuelle Schüttelinkubation im Vivaclear-Gefäss wurde per Zentrifugation wie oben genannt über den einliegenden Filter mit Porengrösse 8 µm gefiltert. Es wurden Objektträgerausstriche der Auswaschungen vor Filtration, des erhaltenen

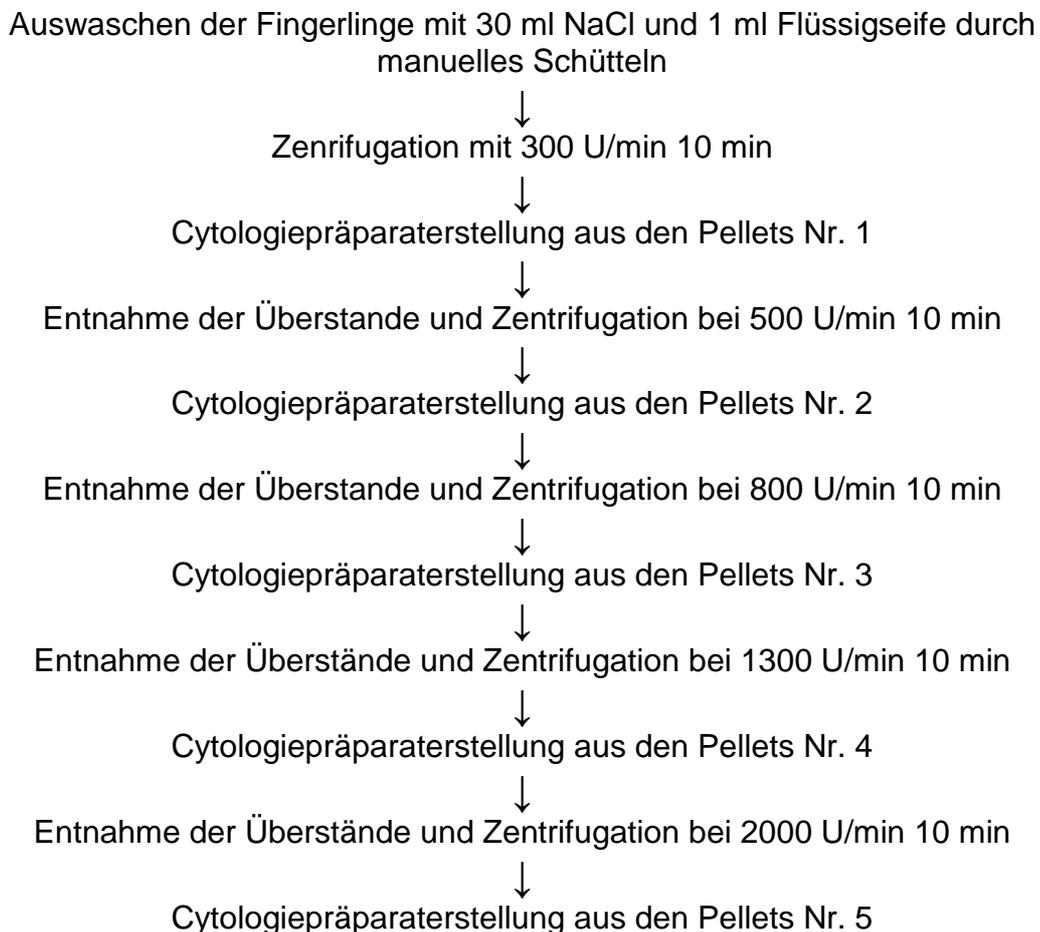
Filtrats und Abklatschpräparate der herausgetrennten Filter erstellt. Die derart verarbeiteten Fingerlinge waren:

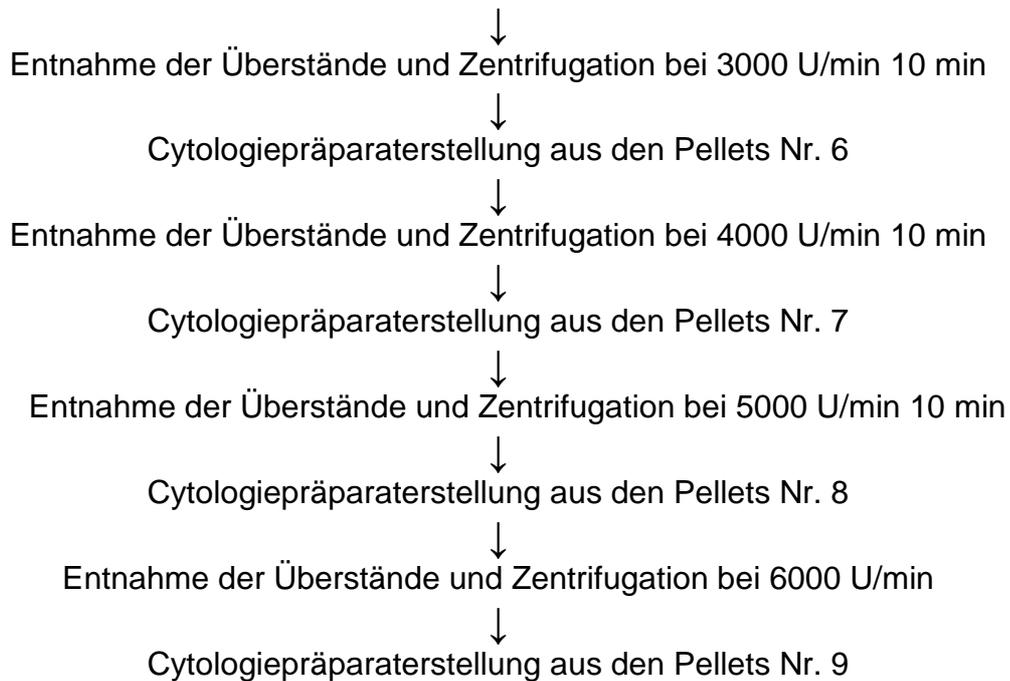
→ **F3/003, F1/007, F3/007, F1/009, F3/009, F1/010, F3/010, F1/011, F1/012, F1/013, F1/014, F3/014, F1/016, F1/018, F3/018, JL 20**

### 2.5.5 Zentrifugationsreihen

Wir evaluierten hier die Zellauftrennung durch unterschiedliche Sedimentationseigenschaften der verschiedenen Zellen, bedingt durch Differenzen ihrer Zellgröße und -dichte.

Wir verwendeten ein zwei Stunden postkoital erstelltes Fingerlingpräparat (UHU 2) sowie zwei artifiziell erstellte Mischspuren (AS; Auswaschung von auf Fingerlinge erbrachtem Ejakulat gemischt mit Auswaschungen frischer vaginaler Fingerlingabstriche bei Gewährleistung von Ejakulatfreiheit durch sehr langes postkoitales Intervall).



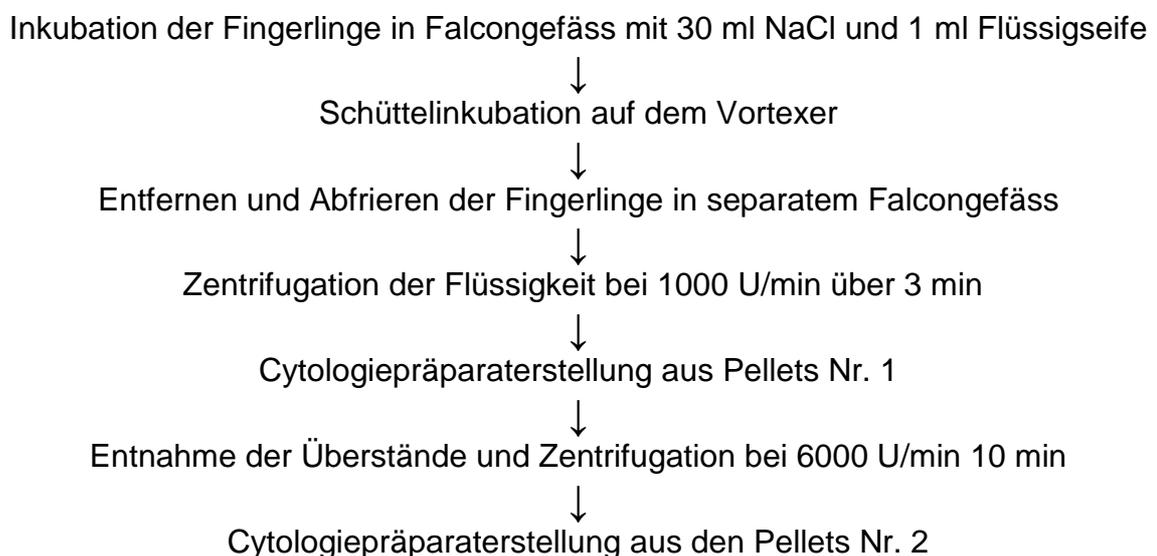


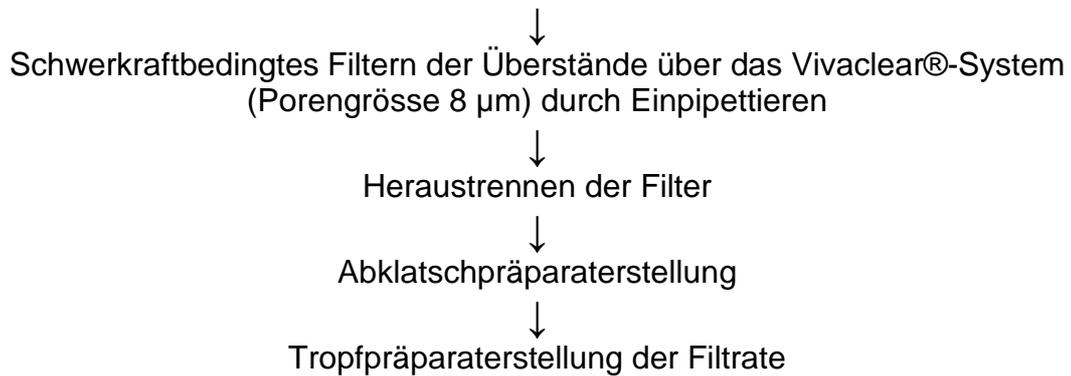
Auf diese Weise wurden verarbeitet die artefizielle Spur AS1 und AS 2 und der Fingerling UHU 2 mit Erstellung von insgesamt 9 Pellets

**→ AS 1 Pellet 1 – 9, AS 2 Pellet 1 – 9, UHU 2 Pellet 1 – 9**

### 2.5.6 Kombinierte Methodik

Wir verwandten hier drei in Eigenregie angefertigte Fingerlinge mit Vaginalabstrichen unterschiedlichen postkoitalen Intervalls (34 bis 50 Stunden).

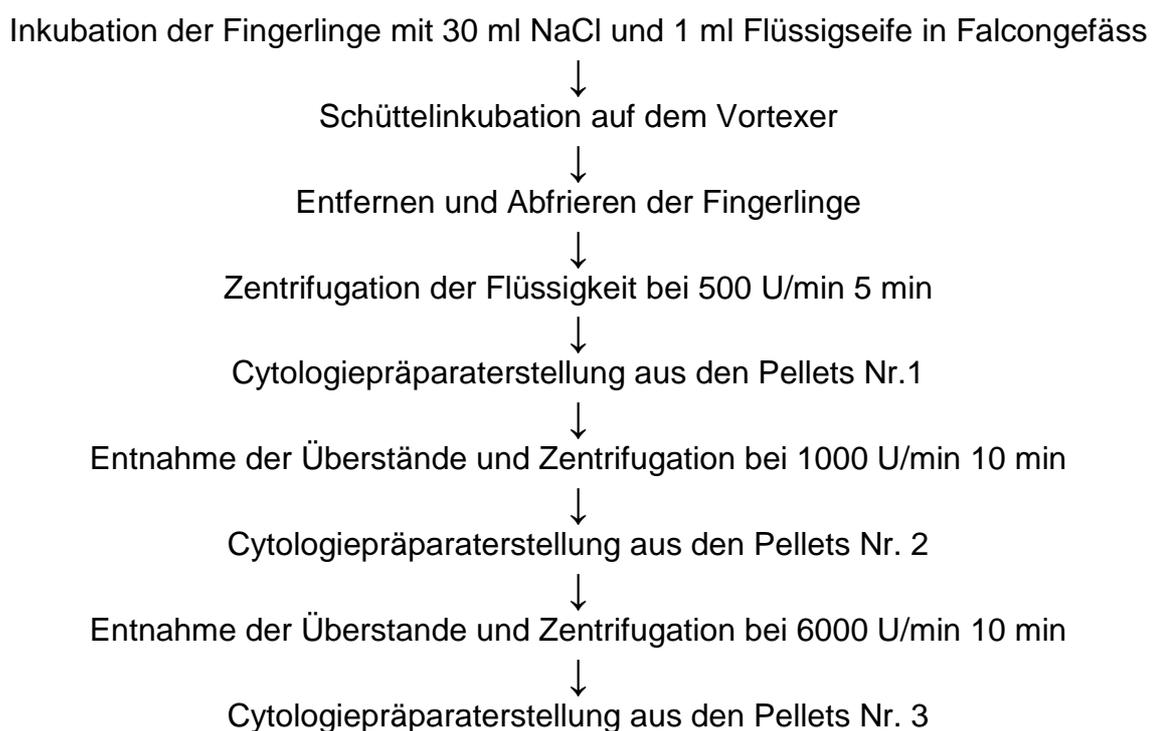


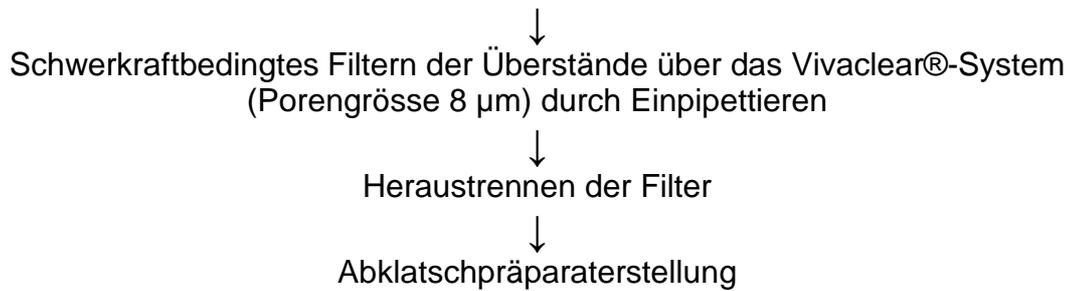


Die lichtmikroskopische Durchmusterung aller Präparate erfolgte nach HE-Färbung. Dieser prozedur unterzogen wurden folgende Fingerlinge:

→ **JL 34, JL 37, JL 50**

Die beschriebene Methode wurde etwas modifiziert, indem wir einen weiteren Zentrifugationsschritt hinzufügten. Wir verwandten hierfür insgesamt 13 Fingerlinge; neun waren von Probandinnen in Eigenregie vaginal in unterschiedlichen postkoitalen Intervallen (min. neun, max. 47 Stunden) ausgestrichen worden; vier entstammten der ärztlichen Spurensicherung.





Alle Cytologiepräparate wurden nach anschliessender HE-Färbung durchmustert. Auf eine mikroskopische Betrachtung des Filtrates wurde verzichtet. Es wurden folgende Fingerlinge verarbeitet und ausgewertet:

→ **F1/004, F3/004, F1/006, F3/006, KK1, JL9, JL 18, JL 20, JL 21, JL 25, JL 33, JL 45, JL 47**

Ein Fingerling (KK 1) war im Vorfeld bereits ein Mal ohne Seife ausgewaschen worden.

#### 2.5.7 Verzicht auf Filtration und Zentrifugationsreihen

Bei der Verarbeitung der *Abstrich 2* – Fingerlinge (ohne Ejakulat) wurde auf eine Filtration verzichtet, da hierbei die DNA des Spurenlegers einzig durch Epithelienabrieb des Mannes repräsentiert und somit im Falle einer Filtration eliminiert wird. Aufgrund des homogenen Zellgemisches aus weiblichen und männlichen Epithelien sahen wir eine Zentrifugationsreihe ebenfalls nicht als sinnig an. In diesem Falle wurde das durch Auswaschen entstandene Zell – Natriumchloridgemisch direkt zentrifugiert.

Nach Überführen in die Eppendorf-Reaktionsgefässe wurde zunächst 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, um sich ein orientierendes Bild von der Grösse des Pellets zu verschaffen. Folgende Fingerlinge wurden derart bearbeitet:

→ **F2/003, F2/007, F2/009, F2/013, F2/014**

Tabelle 1: Alphabetische Übersicht der Präparate und deren Verarbeitungsprotokoll

Probe	Ejakulation?	Postkoitales Intervall (h)	Benutzte(s) Protokoll(e)
AS1	artefizielle Mischspur	entfällt	Auswaschen mit Seife; Zentrifugationsreihe – 9 Pellets
AS1	artefizielle Mischspur	entfällt	Auswaschen mit Seife; Zentrifugationsreihe – 9 Pellets
F1/004	ja	24 +/- 4	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filterung
F1/006	ja	24 +/- 4	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 2 Zentrifugationen, VivaClear-Filterung
F1/007	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/009	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/010	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/011	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/012	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/013	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/014	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/015	ja	24 +/- 4	Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter
F1/016	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F1/018	ja	24 +/- 4	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F2/003	nein	24 +/- 4	Auswaschen ohne Seife, einmalige Zentrifugation
F2/007	nein	24 +/- 4	Auswaschen ohne Seife, einmalige Zentrifugation
F2/009	nein	24 +/- 4	Auswaschen ohne Seife, einmalige Zentrifugation
F2/013	nein	24 +/- 4	Auswaschen ohne Seife, einmalige Zentrifugation
F2/014	nein	24 +/- 4	Auswaschen ohne Seife, einmalige Zentrifugation
F3	ja	24	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebauter Vorrichtung
F3/003	ja	66 +/- 6	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration

F3/004	ja	66 +/- 6	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 2 Zentrifugationen, VivaClear-Filterung
F3/006	ja	66 +/- 6	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 2 Zentrifugationen, VivaClear-Filterung
F3/007	ja	66 +/- 6	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F3/009	ja	66 +/- 6	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F3/010	ja	66 +/- 6	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F3/014	ja	66 +/- 6	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F3/018	ja	66 +/- 6	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter 2. Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration
F5	ja	49,5	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Jun 01	ja	0,08	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Jun 02	ja	1,5	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Jun 03	ja	4	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Jun 04	ja	9	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Jun 05	ja	11	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Jun 06	ja	13	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
JL 9	ja	9	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 18	ja	18	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 20	ja	20	Auswaschen mit Seife; VivaClear-Filtration UND Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 21	ja	21	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 24	ja	24	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
JL 25	ja	25	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 33	ja	33	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 34	ja	34	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 2 Zentrifugationen, VivaClear-Filterung
JL 37	ja	37	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 2 Zentrifugationen, VivaClear-Filterung
JL 45	ja	45	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 47	ja	47	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
JL 50	ja	50	Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 2 Zentrifugationen, VivaClear-Filterung
K1	ja	59,5	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung

K2	ja	96	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
K3	ja	24	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
K4	nein	20	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
K5	ja	49,5	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
KK1	ja	24	1. Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter; 2. Auswaschen mit Seife; Kombinierte Methodik: 3 Zentrifugationen, VivaClear-Filtration
KK2	ja	48	Auswaschen ohne Seife; Filtration Spritzenvorsatzfilter
Mix1	artefizielle Mischspur	entfällt	Artefizielle Spur aus Pur1 und Pur3; Vivaclear-Filtration
Mix2	artefizielle Mischspur	entfällt	Artefizielle Spur aus Pur1 und Pur3; Vivaclear-Filtration
Mix3	artefizielle Mischspur	entfällt	Artefizielle Spur aus Pur1 und Pur3; Vivaclear-Filtration
Mix4	artefizielle Mischspur	entfällt	Artefizielle Spur aus Pur1 und Pur3; Vivaclear-Filtration
Mix5	artefizielle Mischspur	entfällt	Artefizielle Spur aus Pur1 und Pur3; Vivaclear-Filtration
Mix6	artefizielle Mischspur	entfällt	Artefizielle Spur aus Pur1 und Pur3; Vivaclear-Filtration
Mix7	artefizielle Mischspur	entfällt	Artefizielle Spur aus Pur1 und Pur3; Vivaclear-Filtration
P I	ja	21	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
P II	nein	14	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
P III	nein	10	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
P V	ja	51	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
P VI	ja	5	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Pur1	Reines Ejakulat	entfällt	Auswaschen ohne Seife
Pur3	Reines Vaginalsekret	entfällt	Auswaschen ohne Seife
Test1	ja	24	Auswaschen ohne Seife; Vivaclear-Filtration
Test 7	ja	7	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
Test 13	ja	13	Auswaschen ohne Seife; orientierende Filtration in selbstgebaute Vorrichtung
UHU2	ja	2	Auswaschen mit Seife; Zentrifugationsreihe mit 9 Zentrifugationen

Alle Abkürzungen entsprechen probenspezifischen Betitelungen.

## 2.6 Cytologiepräparate

Bei der Verarbeitung eines jeden Vergleichsfingerlings wurden jeweils vier Lichtmikroskopiepräparate angefertigt, jeweils zwei vor Filtration, zwei danach. Es wurden pro Präparat zehn Gesichtsfelder durchmustert und die Anzahl der Spermien pro Gesichtsfeld ermittelt und überprüft, ob durch Herausfiltern der Vaginalepithelien die Auffindbarkeit der Spermien verbessert und die Beurteilung der Spermindichte erleichtert wird.

Von den pro Fingerling doppelt vorliegenden Objektträgerausstrichen wurde ein Exemplar mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, der andere nach Papanicolaou (PAP), wobei dieser zuvor im noch feuchten Zustand mittels Merckofix-Spray fixiert werden muß.

Die Präparaterstellung aus dem zu untersuchenden Material vor Filtration unterschied sich dabei von der Angehensweise nach Filtration:

### 2.6.1 Präparaterstellung vor Filtration

Hierzu wurde aus jedem durch Zentrifugation entstandenen Pellet mittels einer Pipette ca. 20 µl Material entnommen und auf einen Objektträger getropft. Mithilfe jeweils eines weiteren Objektträgers wurden die Tropfen grossflächig verstrichen, was die Zahl der Zellschichten im Präparat reduziert und so die mikroskopische Auswertung erst möglich macht. Andernfalls wären durch die hohe Dichte der Vaginalepithelien einzelne Spermien nur erschwert auffindbar. Ohne Ausstreichen lägen überdies mehrere Zellschichten übereinander, was die zuverlässige Beurteilung während der Mikroskopie nahezu unmöglich macht, da nicht alle Ebenen scharf dargestellt werden können.

### 2.6.2 Präparaterstellung nach Filtration

Aufgrund der durch die Filtration stark reduzierten Zellzahl wurden keine Ausstriche wie unter 2.5.1 beschrieben erstellt, sondern Tropfpräparate. Hierzu wurde mittels einer Pipette je ca. 10 µl Material aus jedem durch Zentrifugation entstandenen Pellet auf zwei Objektträger getropft.

### 2.6.3 Mikroskopie

Pro Präparat wurden in 40-facher Vergrößerung jeweils 10 Gesichtsfelder aus verschiedensten Bereichen des Präparates lichtmikroskopisch durchmustert und die Anzahl der Spermien pro Gesichtsfeld bestimmt. Somit konnte eine Korrelation zwischen detektierter Spermienzahl und zeitlichem Abstand von Abstrich zu GV erstellt werden. Darüberhinaus wurde evaluiert, inwiefern die Präprozessierung der Fingerlingpräparate die Detektion von Spermien im Präparat erleichtert und somit die Anzahl der erfassten Spermien pro Gesichtsfeld steigert.

## 2.7 Differenzielle Lyse

Um die DNA des Spurenlegers einer PCR und Typisierung zuführen zu können, wurde sie zunächst mittels der Differenziellen Lyse extrahiert. Die etablierte Methode musste zur Behandlung der Fingerlingsfiltrate jedoch modifiziert werden, da hierbei nicht, wie üblich, spurentragende Watteträger vorlagen. Die initiale Inkubation des Reaktionsansatzes mit dem Chelatbildner Chelex 5% fängt Metallionen ab, welche zur DNA-Degradierung führen und die später folgende PCR stören können. Die anschließende Inkubation mit Proteinase K (10mg / ml H<sub>2</sub>O), als zellmembranverdauendem Enzym führt die Lyse der Vaginalepithelien, aber auch der männlichen abgeriebenen Epithelien herbei. Die Zellwände der Spermatozyten sind aufgrund der enthaltenen Disulfidbrücken deutlich robuster und halten daher dieser Prozedur stand. Durch den anschließenden Zentrifugationschritt kommt es zur Trennung von männlicher und weiblicher Fraktion in Pellet (grösstenteils intakte Spermien) und Überstand (freie überwiegend weibliche DNA). Nach Abnahme des Überstandes wird im verbleibenden Pellet durch Zugabe des disulfidbrückenspaltenden Dithiothreitol und erneut Proteinase K und Chelex im zweiten Lyseschritt die männliche DNA freigesetzt.

### 2.7.1 DNA-Extraktion aus den Watteträgern

Die Watteträgerköpfe werden abgetrennt und in ein Eppendorf-Gefäss überführt. Der erste Lyseschritt umfasst die Inkubation mit 400 µl Chelex 5% und 16 µl

Proteinase K (einige Sekunden Vortexen) im 56°C warmen Wasserbad für 60 min und abschliessend bei 92°C für 8 min.

Die anschliessende Zentrifugation der Reaktionsansätze für 5 min bei 13000 U/min trennt männliche und weibliche Fraktion. Der Überstand wird separiert, die verbleibende Zellfraktion und die Watte verbleiben im Eppendorf-tube. Der zweite Lyseschritt umfasst die Zugabe von erneut 400 µl Chelex, erneut 20 µl Proteinase K und nun 20 µl DTT mit Inkubation im 56°C warmen Wasserbad für 60 min und für weitere 8 min bei 92°C.

Bezüglich der *Abstriche 2*, wurde auf den zweiten Inkubationsschritt verzichtet aufgrund der Abwesenheit von Spermien. Der Verdau durch Proteinase K unter Zugabe von Chelex erfolgte wie oben beschrieben.

#### 2.7.2 DNA-Extraktion aus Filtrat

Unter der Annahme der weitgehenden Elimination weiblichen Vaginalepithels durch die Filtration wurden die Filtrate lediglich dem zweiten Inkubationsschritt unterzogen. Nach Zugabe von 200 µl Chelex, 10 µl Proteinase K und 10 µl DTT folgte die 60-minütige Inkubation im 56°C warmen Wasserbad und abschliessend bei 92° für 8 min.

Im Falle der *Abstriche 2*, die bei ejakulationslosem Geschlechtsverkehr keine Spermien tragen sollten, erfolgte nur der erste Inkubationsschritt mit 200 µl Chelex und 10 µl Proteinase K unter Verzicht auf DTT. Es folgte die Wasserbadinkubation und Zentrifugation wie oben beschrieben, sowie Weiterverwendung des Überstandes.

#### 2.7.3 DNA-Extraktion aus Zentrifugat

Verwandt wurden die in Eppendorf-tubes übertragenen Pellets.

Drei Proben wurden einem adaptierten Differentielle Lyse - Protokoll unterzogen. Die erste Inkubation mit 190 µl Chelex und 10µl Proteinase K erfolgte für 60 min bei 65°C und anschliessend für 8 min bei 92°C. Nach Abnahme des Überstandes und Waschen des Pellets mit 300µl Aqua dest. wurde dieses mit 190µl Chelex, 10 µl Proteinase K und 10 µl DTT versetzt; die Inkubation wurde für 30 min bei 65°C und folgend für 8 min bei 92°C durchgeführt. Verwendet wurde ein programmierbarer automatisiert heizender Schüttelinkubator.

Die Differentielle Lyse des überwiegenden Anteils der Zentrifugatproben (Pellet 3) erfolgte nach Herstellerangaben automatisiert mittels des DNA IQ™ Casework Sample Kits auf dem Maxwell® 16 LEV Instrument (beides Promega Corporation, Madison, WI, USA). Zusätzlich wurden sechs Vergleichsfingerlinge verwandt sowie jeweils zwei Pellets der Zentrifugationsreihen gemäss 2.5.5.

## 2.8 Polymerase chain reaction

### 2.8.1 PCR der DNA aus Watteträgerspuren

Extraktionsschritte s. 2.7.1

Es wurde autosomal das System Q8 angewandt (Loci Amelogenin, D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33, D8S1179, D18S51, D21S11 ), Y-chromosomal das kommerziell erhältliche Kit Powerplex Y (Promega, Madison, WI, USA), welches die Loci DYS 19, DYS 385, DYS 389 I/II, DYS 390, DYS 391, DYS 392, DYS 393, DYS 437, DYS 438 und DYS 439 darstellt.

Pro Reaktionsansatz des Systems Q8 wurden 5 µl bidestilliertes Wasser, 0,7 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl BSA, 1, 25 µl Puffer, 1 µl Nucleotidmix, 0,5 µl Q8-Primermix, 0,4 µl Taq-Polymerase und 2µl DNA-Extrakt verwandt. Ausnahmen stellten dabei die Reaktionsansätze für Positiv- und Leerkontrolle dar. Die Positivkontrolle enthielt 1 µl einer 1:20 verdünnten kommerziell erhältlichen männlichen DNA sowie 6 µl Aqua bidest.; der Leerkontrolle wurden 7 µl Aqua und keinerlei DNA-Extrakt hinzugegeben. Die restlichen Parameter blieben gleich.

Im Falle der *Abstriche 2*, bei denen der Überstand zur PCR herangezogen wurde (s. 2.6.1), wurden 3 µl Aqua bidest. und 4 µl DNA-Extrakt verwandt.

Die Reaktionsansätze für Powerplex Y setzten sich zusammen aus jeweils 7,4 µl Aqua bidest, 1,25 µl des dem Kit beigefügten Puffers (auch die Nucleotide enthaltend), 1,25 µl Primermix, 0,4 µl Taq-Polymerase sowie 2 µl DNA-Extrakt. Für die *Abstriche 2* wurden 5,4 µl Aqua bidest. und 4 µl DNA-Extrakt (Überstand) verwandt. Die Leerkontrolle enthielt 9,4 µl Aqua bidest. ohne jegliches DNA-Extrakt; der Positivkontrolle wurden 8,4 µl Aqua bidest. und 1 µl einer 1:20 verdünnten kommerziell erhältlichen männlichen DNA.

Die PCR für das System Q8 wurde mit 30 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte initial 11 min bei 95°C. In den 29 folgenden Zyklen wurde jeweils 1 min bei 93°C denaturiert, das Annealing jeweils 1 min bei 59°C, die Elongation 30 sec bei 72°C. Die abschliessende Elongation erfolgte für 40 min bei 72°C. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz zum Abschluss aller Prozesse auf 15°C abgekühlt.

Die PCR für das System PPY erfolgte mit 29 Zyklen. Die initiale Denaturierung verlief zunächst für 11 min bei 95°C, anschliessend für 2 min bei 96°C. Es folgten 9 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 60°C, 1 min 30 sec Elongation bei 70°C. In den anschliessenden 19 Zyklen wurde jeweils 1 min bei 90°C denaturiert; die Parameter für Annealing und Elongation blieben unverändert. Die finale Elongation wurde 30 min bei 60°C durchgeführt. Zum Abschluss wurden die Reaktionsansätze auf 4°C abgekühlt.

### 2.8.2 PCR der DNA aus Filtrat

Extraktionsschritte s. 2.7.2

Hier erfolgten ebenfalls zwei verschiedene PCR-Ansätze. Einerseits wurde das System Q8 wie unter 2.7.1 beschrieben angewandt. Es wurden die gleichen Volumina der Reagenzien verwandt, die Besonderheiten der Positiv- und Leerkontrolle sowie der *Abstrich 2* – Extrakte wurden wie beschrieben berücksichtigt. Die PCR lief unter den oben genannten Bedingungen.

Zur Amplifizierung y-chromosomaler Marker wurde das nicht kommerziell erhältliche System DYS 12 herangezogen, welches die Loci DYS 19, DYS 385 a/b, 388, DYS 389 I/II, DYS 390, DYS 391, DYS 392, DYS 393, DYS 437, DYS 438 und DYS 439, zur Darstellung bringt und somit weitgehend dem PPY entspricht. Hierbei wurden jedem Reaktionsansatz 3 µl Aqua bidest., 1 µl DNA-Extrakt, 0,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl BSA, 1,25 µl PCR-Puffer, 0,7 µl Nucleotidmix, 0,9 µl Primermix sowie 0,4 µl Taq-Polymerase verwandt.

Im Falle der *Abstriche 2*, die nicht filtriert worden waren, wurde nur 1 µl Aqua bidest., jedoch 3 µl DNA-Extrakt verwandt.

Die Positivkontrolle enthielt 3,5 µl Aqua bidest. und 0,5 µl der 1:20 verdünnten männlichen DNA. In die Leerkontrolle wurde keinerlei DNA-Extrakt gegeben, jedoch 4 µl Aqua.

Die PCR-Bedingungen entsprechen denen wie auch beim System PPY angewandt, wie unter 2.7.1 beschrieben.

### 2.8.3 PCR der DNA aus Zentrifugatprodukten

Extraktionsschritte s. 2.7.3

Wir verwandten das System Q8 (s.o.). Die Protokolle wurden leicht adaptiert, d.h. weniger Nucleotidmix (0,5 µl) und mehr Primermix (0,75µl) verwandt. Wir hantierten flexibel mit den eingegebenen DNA-Extrakt-Volumina (1 bzw. 5 µl).

## 2.9 DNA-Typisierung

Die STR-Typisierung erfolgte gemäss den Vorgaben des Herstellers auf einem handelsüblichen vollautomatischen Sequenziergerät. Zusätzlich zur Ziel-DNA wurde an zwei verschiedenen, beliebig einzustreuenden Stellen der Sequenzierplatte eine Allelleiter mitsequenziert, welche je nach System unterschiedlich ist. Anhand der Allelleiter orientiert sich im Anschluss die computergestützte Auswertung und Darstellung der sequenzierten DNA, um diese den Loci zuordnen zu können.

Vorbereitend wurde in den Vertiefungen der Sequenzierplatten jeweils 10 µl Formamid und 0,5 µl Längenstandard vorgelegt, im Anschluss wurde jeweils 1 µl PCR-Produkt bzw. Allelleiter hinzugefügt.

Für das System DYS 12 existiert keine Allelleiter.

Es folgte die STR-Typisierung im vollautomatisierten Sequenziergerät unter Routinebedingungen.

Die Auswertung wurde computergestützt mittels des Programmes GeneMapper© vorgenommen. Die Darstellung des Profils erfolgte als Leiter.

## 2.10. Ethische Belange

Unter dem Aktenzeichen 308/2005 liegt die Zustimmung zu der hier beschriebenen Studie durch die Ethikkommission der Medizinischen fakultät

Heidelberg vor. Zur Prüfung vorgelegt wurden das Studienprotokoll, Produkt- und Probandeninformation sowie die probandenbezogenen Fragebögen und Einverständniserklärung. Es wurde darauf aufmerksam gemacht, dass die ethische und rechtliche Verantwortung bei der Studienleitung und allen teilnehmenden Ärzten liegt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg arbeitet gemäss den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den ICH-GCP-Richtlinien. Ihren Beratungen liegt die maßgebende Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki zugrunde.

### 2.11. Materialverzeichnis

#### Auswaschen und Filtration

##### Geräte/Arbeitsmaterial

- Fingerlinge zum DNA-Abstrich im Genitalbereich, steril verpackt – Fuhrmann Verbandsstoffe, Much, Deutschland
- Forensic Swab XL in Transportröhre mit Belüftungsmembran, Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, Deutschland
- Latexhandschuhe Peha-soft® powderfree, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- Falcon – Gefässe 50 ml – Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- Luer Spritzen 10 ml – Braun, Melsungen, Deutschland
- Mikroskopie – Objektträger Polylysine®-Slides – Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Mikroskopie – Objektträger mit Mattrand, Paul Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
- Mikroskopie – Deckgläser Stärke No. 1, Paul Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland,
- Lichtmikroskop – Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Biofuge Primo Zentrifuge – Heraeus, Hanau, Deutschland
- Vortexer – IKA MS 1 S1, Alliance Analytical Inc., Fremont, CA, USA
- Pipette 200 µl – Eppendorf Comfortpette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

- Pipettenspitzen 200 µl, steril –Biozym Scientifics, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Pipette 1000 µl - Eppendorf Comfortpette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen 1000 µl, steril - Biozym Scientifics, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- S-Monovette Serum, Sarstedt AG und Co, Nürnberg, Deutschland
- Multi-Adapter, Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
- Spritzenvorsatz–Filterhalter – Whatman Schleicher und Schüll über Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Rotilabo® – Rundfilter, quantitativ, Nitrocellulose, Porengröße 8 µm, Durchmesser 5.5 cm – Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Vivaclear® Centrifugal filters - Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
- Baktolin pure wash Seife, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

#### Reagenzien

- Natriumchlorid für Analyse – Applichem, Darmstadt, Deutschland
- HPLC-Wasser – J.T.Baker, Deventer, Holland
- Merck – o – fix-Spray – Merck, Darmstadt, Deutschland
- Hämatoxylin-Eosin-Färbelösung, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Papanicolaou-Färbelösung, Merck, Darmstadt, Deutschland

#### DNA-Extraktion und PCR

##### Geräte/Arbeitsmaterialien

- Latexhandschuhe, Peha-soft® powderfree, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- Küchentücher, dm-drogerie markt GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (1.5 ml) – Biozym, Scientifics, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Pinzette
- Kleine Schere

- Eppendorf-PCR-Reaktionstubes, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- TS 1 Thermo Shaker – Biometra, Göttingen, Deutschland
- Zentrifuge Biofuge primo – Heraeus, Hanau, Deutschland
- Thermocycler – Biometra, Göttingen, Deutschland
- Maxwell® 16 LEV Instrument - Promega corporation, Madison, WI, USA
- DNA Sequenziergerät ABI 300- Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- GeneMapper® Software – ABI, Carlsbad, CA, USA
- Personal Computer MAC - Apple

#### Reagenzien

- Ethanol zu Desinfektionszwecken, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Destilliertes Wasser, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chelex 100 Resin – BioRad, Hercules, CA, USA
- Proteinase K (10 mg / ml dest. H<sub>2</sub>O) – GENial, Troisdorf, Deutschland
- DL-Dithiothreitol – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- DNA IQ™ Casework sample kit for Maxwell® 16 – Promega corporation, Madison, WI, USA
- Primermix Q8
- Powerplex Y - Promega, Madison, WI, USA
- Primermix für Y-STR's
- Nucleotide, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Männliche DNA / Leerkontrolle
- Taq-Polymerase Gold – Roche, Mannheim, Deutschland
- PCR-Puffer – Roche, Mannheim, Deutschland
- Bovines Serumalbumin (BSA) – Boehringer, Ingelheim, Deutschland
- Magnesiumchlorid - Roche, Mannheim, Deutschland
- Allelleiter Q8 – Serac, Bad Homburg, Deutschland
- Internationaler Längenstandard ILS-500-ROX (Q8) - Serac, Bad Homburg, Deutschland
- Power Plex Y Kit – Promega, Wisconsin, IL, USA
- Internationaler Längenstandard ILS 600 (PPY) – Serac, Bad Homburg, Deutschland
- Formamid – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

## 2.12. Statistische Auswertung

Erfasst wurden die gesichteten Spermien pro Gesichtsfeld in der mikroskopischen Durchmusterung der Objektträger. Die Datenerfassung und -darstellung erfolgten mittels Microsoft Excel. Gezeigt werden Balkendiagramme mit Darstellung des Mittelwertes, also die durchschnittliche Spermienzahl die sich unter Berücksichtigung der durchmusteren Gesichtsfelder ergibt. Bzgl. der Proben, die dem ursprünglichen Vergleichsarm zugeordnet waren (s.Tabelle 1), lagen pro Fingerling zwei Präparate vor (unterschiedliche Färbungen), hier wurden also 2 x 10 GF berücksichtigt; bei den Proben des Methodenarmes wurde auf die zweite Färbung verzichtet, daher existieren 1 x 10 GF pro untersuchtem Fingerling. Da für unsere Fragestellung auch die Erfassung einzelner Spermatozyten wichtig war, entschieden wir uns nicht für die Angabe des Medians, da er dies maskieren würde.

Die Auswertung basierte, da der Focus der Studie die Methodenentwicklung war, auf Casuistiken (jeweils Einzelfallbetrachtung jeder Fingerlingprobe).

Verzichtet wurde auf Testverfahren zur Gegenüberstellung der Zellseparationsmethoden, da unterschiedliche Fingerlinge verwendet wurden und somit die Ergebnisse nur mit Vorsicht gewertet werden können. Zudem erfolgte kein statistischer Vergleich mit Daten aus der Literatur aufgrund unserer jeweils deutlich geringeren Fallzahl.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Daten zu den Studienteilnehmern

Von den insgesamt zehn teilnehmenden Paaren des Vergleichsarms waren drei bereit, zumindest teilweise zwei Abstrichreihen durchführen zu lassen. Alle zehn Frauen befanden sich im gebärfähigen Alter. Eine der doppelt teilnehmenden Frauen verhütete zum Zeitpunkt einer Reihe nicht und wurde schwanger, sodass sie zum Zeitpunkt der zweiten Reihe bei *Abstrich 3* schwanger und bei den weiteren bereits Mutter war, jedoch wieder mit oralen Antikonzeptiva verhütete. Darüber hinaus verhüteten sechs weitere Frauen mit der Pille, eine weitere benutzte keinen Empfängnisschutz. Eine Studienteilnehmerin verwendete einen intravaginal liegenden Hormonverhütungsring; eine Probandin verhütete mit einer einliegenden Hormonspirale.

An anatomischen Besonderheiten wurde bei einer Probandin eine Rectozele (Vorwölbung des Mastdarms gegen die Vaginalcavität von dorsal) festgestellt, bei einer weiteren eine Portioektomie (physiologische Normvariante mit Ausstülpung von Cervixschleimhaut in die Vagina).

Vier der zehn teilnehmenden Männer waren beschnitten. Bei keinem lagen eine Azoospermie oder Zustand nach Vasektomie vor.

Alle vier Probandinnen des Methodenarmes waren zur mehrfachen Spurensicherung bereit. Alle Frauen waren im gebärfähigen Alter, in einem Fall lag zum Zeitpunkt der Abstricherstellung eine Schwangerschaft vor. Alle übrigen Frauen verhüteten mit oralen Antikonzeptiva. Bei einer der Probandinnen lag eine Portioektomie vor.

Einer der vier teilnehmenden Männer war beschnitten. Eine Azoospermie oder vorgenommene Vasektomie war nicht bekannt.

### 3.2 Mikroskopie

Wir focussierten im Wesentlichen die lichtmikroskopische Durchmusterung als Nachweisinstrument für das Vorhandensein verwertbarer männlicher Spuren.

Hauptaugenmerk legten wir auf die Vergleichsfingerlinge Abstrich 1 und Abstrich 3 (postkoitale Intervalle 24 +/- 4 sowie 66 +/- 6 Stunden) (n=20, 15 davon nach GV mit Ejakulation) und Fingerlingabstriche aus dem Methodenarm (n=32), insbesondere die Fingerlinge, die der Zentrifugationsmethode zugeordnet wurden (n=13). Vier der Vergleichsfingerlinge wurden nach einem Zentrifugationsprotokoll verarbeitet,

Von allen Fingerlingen, einschliesslich der noch vor Optimierung der Verarbeitungsprozesse, **wurde bei einer Gesamtzahl von n=52 auf n=44 Spermien lichtmikroskopisch dargestellt**. Im Einzelnen betraf dies **15 der 20** ärztlich erstellten Vergleichsfingerlinge (überwiegend Filtrationsmethode per Spritzenvorsatz, in 4 Fällen per Zentrifugationsmethode) (75%) und **29 der 32** durch Probandinnen bereitgestellten Fingerlinge (vorläufige Filtrations- und später Zentrifugationsmethode) (90,6%). Jeder dieser Fingerlinge erfasste einen GV mit Ejakulation.

Insgesamt fünf Fingerlinge des Vergleichsarms bildeten einen GV ohne Ejakulation ab, sodass ein Spermienfund nicht zu erwarten war. Dennoch zeigte sich einer dieser Fingerlinge (F2/009) spermienpositiv, was einem vorangegangenen GV zuzuordnen ist. Dieser lag nach Angaben der Probandin drei Tage zurück. Von drei vermeintlich spermienfreien Fingerlingen des Methodenarmes wurden ebenfalls auf einem Exemplar (P III) Spermien gesichert. Hier lag der entsprechende GV nach Angaben der Probandin ungefähr 62 Stunden zurück. Im Anschluss an diesen GV hatte die Probandin bereits einen Abstrich erstellt. Die entsprechende Spur wurde ausgewaschen und hieraus zunächst Cytologiepräparate erstellt, die nicht vorliegen (Verlust des Präparates). Danach erfolgte die Filtration über die selbstgebaute Vorrichtung, die erstellten Präparate waren allerdings nicht auswertbar, da leer. Wie später beschrieben, liegt hier sehr wahrscheinlich bei Verwendung unbeschichteter Objektträger ein unerwünschtes Abspülen der Zellen durch den Färbeprozess vor. Über den Spermiennachweis nach diesem Geschlechtsverkehr kann daher keine Aussage getroffen werden. Jedoch sahen wir, dass es möglich ist, Spuren nach einem grösseren Intervall zu sichern, obwohl schon einmal durch eine Abstricherstellung Mischspurenssekret entnommen worden war.

### 3.2.1 Mikroskopie der Watteträger

Die Mikroskopie der herkömmlichen Watteträgerpräparate erfolgte, da es sich um eine etablierte Methode handelt, nur exemplarisch anhand des Sets Nr. 003. Jedoch wurden hier in jeweils 10 Gesichtsfeldern, den insgesamt 8 Präparaten zugeordnet, keine Spermien gesichtet, was mit dem Befund der zugeordneten Fingerlinge korrelierte. F2/003 mit den zugehörigen Watteträgerabstrichen ließ, da der entsprechende GV ohne Ejakulation verlaufen war, keinen Spermienfund erwarten.

### 3.2.2 Unbehandelte Fingerlinge

Unbehandelt blieben die Fingerlinge *Abstrich 2*. Bei gemäß Vorgabe fehlender Ejakulation waren hier keine Spermien in der lichtmikroskopischen Untersuchung zu erwarten. Sie wurden daher weder durch Filtration oder Zentrifugation vorbehandelt.

Es lagen fünf Fingerlinge vor. Bzgl. vieren waren jeweils 10 Gesichtsfelder in den zwei unterschiedlich gefärbten Präparaten wie erwartet spermienleer. Die Ausnahme bildet Exemplar F2/009. Im HE-gefärbten Präparat wurden in 10 Gesichtsfeldern insgesamt drei Spermien gesehen. Nach Angaben der Probandin hatte der vorletzte Verkehr insgesamt drei Tage vor der Fingerlingabstricherstellung stattgefunden. Es ist daher anzunehmen, dass die aufgezeigten Spermien diesem GV entstammen und der Fingerling somit eine Spur nachwies, die ungefähr drei Tage vor der Spurensicherung eingegeben wurde.

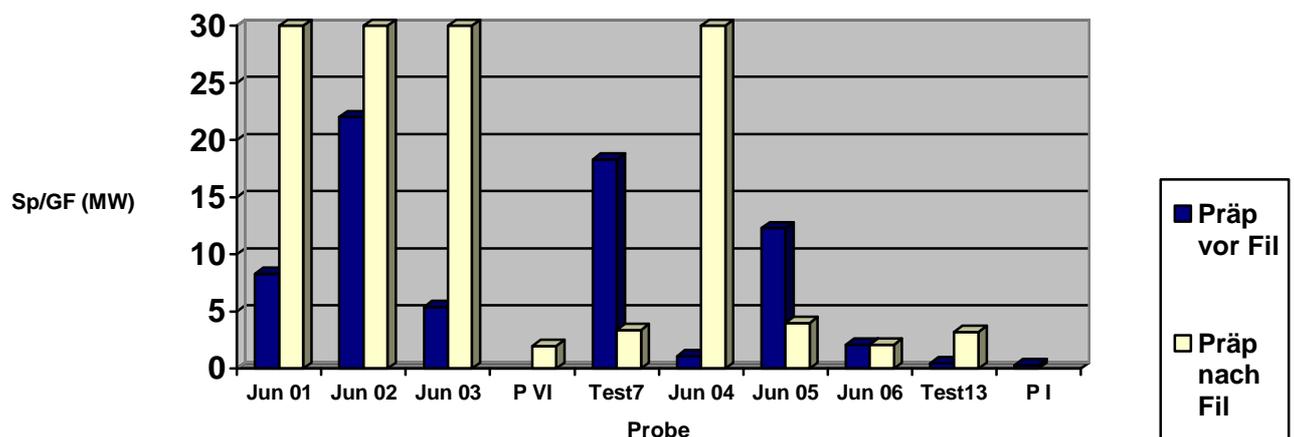
### 3.2.3 Filtration per selbstgebauter Vorrichtung

Diese orientierende Filtrationsreihe stand am Beginn unserer Arbeit. Es wurden 21 Fingerlinge aus dem Methodenarm verwendet, mit denen die insgesamt fünf Probandinnen eigenständig die Spurensicherung zu flexibel festgelegten postkoitalen Zeitpunkten (s. Tab. 1) durchgeführt hatten. Von den insgesamt 18 Spuren, denen GV mit Ejakulation vorausging, waren 15 spermienpositiv (83,3%).

Im Schaubild nicht dargestellt sind die cytologischen Ergebnisse der Fingerlinge P II, P III und K 4. Alle Spuren waren nach einem GV ohne Ejakulation verlaufen und ließen daher keine Spermienfunde erwarten, was auf zwei Fingerlinge auch zutraf. Die Ausnahme bildete jedoch P III. Hier wurden in insgesamt 10 Gesichtsfeldern zwei Spermien gefunden, die dem vorletzten GV zuzuordnen waren. Nach Angaben der Probandin hatte dieser ca. 62 Stunden im Vorfeld stattgefunden. Auch nach jenem hatte die Probandin einen Fingerlingabstrich erstellt (aufgrund der Insuffizienz der Präparate ist hier der Spermienachweis unklar). Hier wies der Fingerling noch ca. 62 Stunden postkoital und darüber hinaus bei zwischenzeitlich bereits erfolgter Spurensicherung noch eine verwertbare Spur nach.

In den Abbildungen 1 und 2 sind die Fingerlinge nach postkoitalem Intervall geordnet (Tabelle 1 zu entnehmen).

Beachte: Bzgl. der Präparate Jun 01, Jun 02, Jun 03 und Jun 04 waren die detektierten Spermienzahlen so hoch dass sie nicht mehr zählbar waren („massenhaft“). Dies lässt sich im Balkendiagramm nicht darstellen.



Legende: F- Filtration; GF- Gesichtsfeld; Jun- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; Präp – Präparat; Sp – Spermien; Test- probenspezifische Betitelung

Abbildung 1 Orientierende Filtration. Eigenständige Spurensicherung mit postkoitalen Intervallen bis 21 Stunden

Ad Abbildung 1: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

Es sind zehn Fingerlingspuren der postkoitalen Intervalle fünf Minuten bis 21 Stunden erfasst.

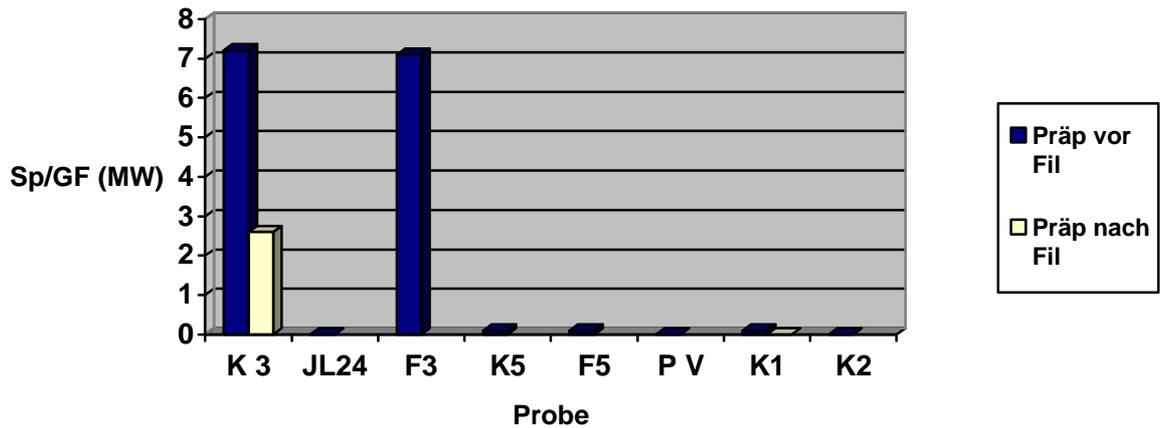
Das Cytologiepräparat zur unfiltrierten Auswaschung des Exemplars P VI fehlt.

Cytologiepräparat P I nach Filtration zeigte sich bei der Durchmusterung vollständig leer.

Alle erfassten Fingerlinge wiesen Spermien auf; in zwei Fällen (P V und Test 13) lagen auch vereinzelt begeißelte Spermien vor. In fünf Fällen konnte durch den noch nicht ausgereiften Filtrationsprozess die Zahl der darstellbaren Spermien erhöht werden (Jun 01 bis Jun 04 sowie Test 13), in einem Fall blieb sie konstant (Jun 06); eine Verschlechterung der Darstellbarkeit wurde in zwei Fällen gesehen (Jun 05, Test 7). Zwei Fingerlinge sind dahingehend nicht beurteilbar, da jeweils ein Cytologiepräparat fehlte oder vollständig leer war (P VI, P I).

Die Waschungen der Fingerlinge Juni 01, 02 und 03 vor Filtration waren durchschnittlich gut zu durchmustern; die Sichtung der Spermien gelang ausreichend gut. Nach der Filtration waren in den zugehörigen Präparaten keine Vaginalepithelien mehr vorhanden, was die Sichtung der Spermien erheblich vereinfachte. Die Spermienzahl vervielfachte sich aus diesem Grunde. Gleiches trifft auf Exemplar Juni 04 zu. Der Effekt war hier noch deutlicher ersichtlich. Bei Fingerling Test 13 wurde dieses Phänomen mit Blick auf die Dichte der Vaginalepithelien deutlich ausgeprägter beobachtet: Waren im Cytologiepräparat vor Filtration aufgrund einer sehr hohen Epitheliendichte nur sehr erschwert und in geringer Anzahl Spermien zu sehen, wurde dies durch die Filtration deutlich verbessert. Auch hier konnten die Epithelien vollständig entfernt werden.

Fingerlinge Test 7 und Juni 05 zeigten primär eine sehr erschwerte bzw. durchschnittlich gute Auswertbarkeit, was in beiden Fällen jeweils wieder durch die Dichte der Vaginalepithelien bedingt war. Bei beiden Exemplaren waren die Cytologiepräparate nach Filtration erheblich besser zu durchmustern bei nun fehlenden Epithelien, die Zahl der detektierten Spermien war jedoch verschlechtert, was auf eine generell geringere Spermienzahl schließen lässt.



Legende: F- Fingerling, Fil- Filtration; GF- Gesichtsfeld; JL sowie K- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; P- probenspezifische Betitelung; Präp- Präparat; Sp- Spermien

Abbildung 2 Methodenarm: Orientierende Filtration. Eigenständige Spurensicherung mit postkoitalen Intervallen 24 bis 96 Stunden

Ad Abbildung 2: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

Es sind acht Fingerlinge der postkoitalen Intervalle 24 bis 96 Stunden erfasst.

Die Cytologiepräparate nach Filtration fehlen in den Fällen JL 24, F3 sowie F5, sodass hier keine Vergleiche möglich sind. Präparat P V nach Filtration war vollständig leer, Präparate K1 und K2 nach Filtration nahezu. Dies wurde erneut den nicht beschichteten Objektträgern und daher dem Abwaschfehler zugeschrieben.

Sowohl K3, JL 24 als auch F3 bilden ein 24-stündiges postkoitales Intervall ab. Trotz unterschiedlicher Probandenpaare und auch unterschiedlich guter Durchmusterbarkeit (bei K3 massive Überlagerung durch Scheidenepithel; F3 zufriedenstellend zu durchmustern) ergeben sich hier bei K3 und F3 sehr ähnliche Werte; ein Vergleich der Präparate nach Filtration beider Fingerlinge ist leider nicht möglich, da F3 fehlt. Zumindest bei K3 erbrachte die Filtration jedoch keine Verbesserung der Übersichtlichkeit. JL 24 zeigte bei gleichem Intervall überhaupt keine Spermien.

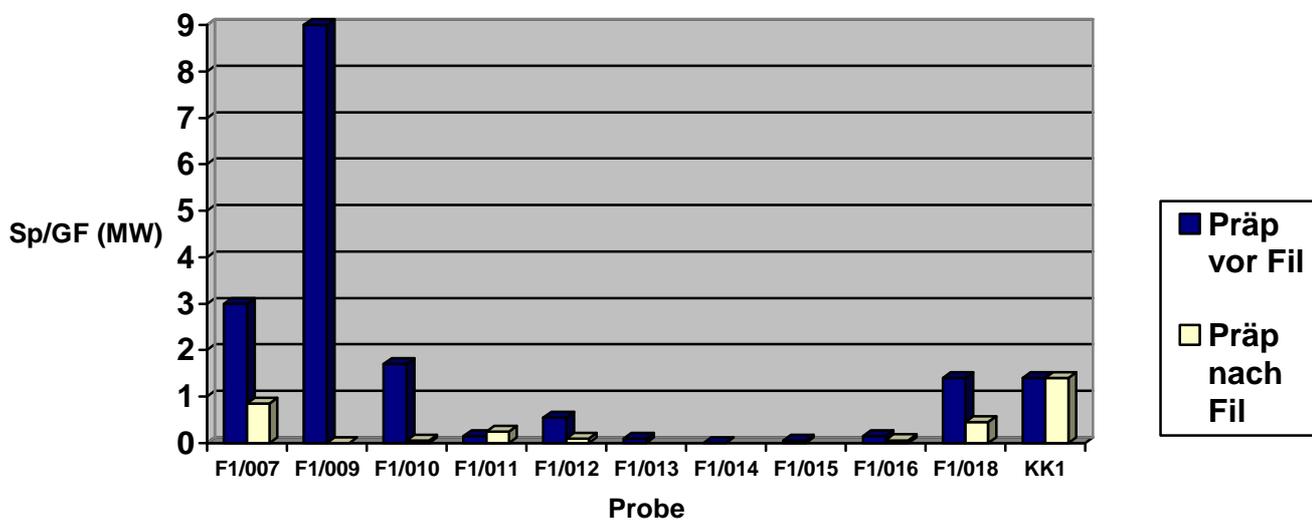
Sowohl K5 als auch F5 sind Spuren bei 49,5-stündigem postkoitalem Intervall. Sie entstammten unterschiedlichen Studienteilnehmern; der Spermienachweis war vergleichbar ausgeprägt bei erneut unterschiedlich guter Durchmusterbarkeit – K5 war massiv überlagert mit Scheidenepithel, F5 hingegen gut durchmusterbar.

Während K1 mit 59,5 Stunden zumindest noch eine Samenzelle nachzuweisen vermochte, gelang dies K2 mit 96 Stunden postkoitalem Intervall nicht mehr.

### 3.2.4 Filtration per Spritzenvorsatzfilter

Es lagen 18 solcher Art behandelter Fingerlinge vor. Davon entstammten 17 dem Vergleichs- und zwei dem Methodenarm. Insgesamt konnte bei 14 Fingerlingen ein positiver Spermienbefund erhoben werden (82,4 %). In einem dieser Fälle war dies erst nach Filtration möglich (F3/007).

Beachte: der Datenpunkt für F1/009 vor Filtration liegt bei 23,5. Aus Gründen der Übersichtlichkeit liessen wir jedoch nur die Darstellung bis Datenpunkt 9 auf der y-Achse zu.



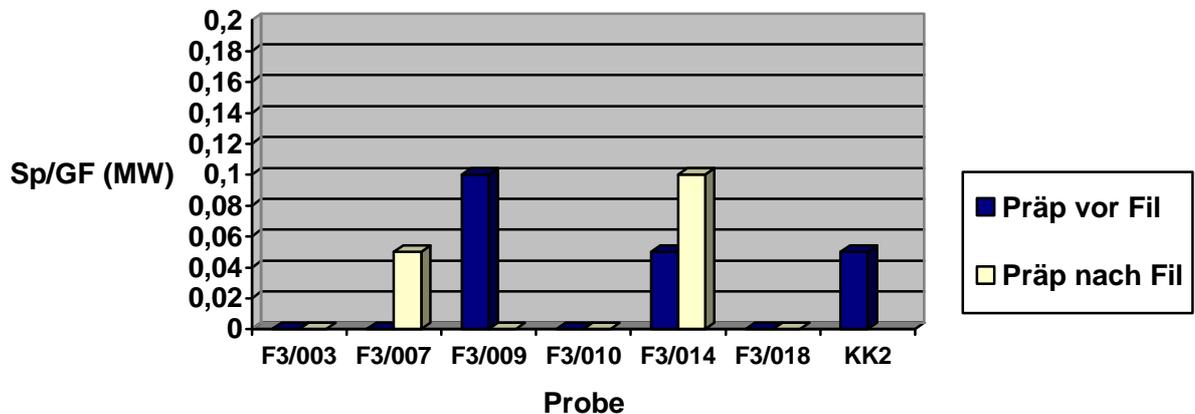
Legende: F- Fingerling, Fil- Filtration; GF- Gesichtsfeld; KK- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien

Abbildung 3 Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 24 +/-4 Stunden bzw. 24 Stunden bei eigenständiger Spurensicherung durch Probandin (KK1/Methodenarm)

Ad Abbildung 3: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

Von insgesamt 11 Präparatpaaren sind mehrere nicht zu Vergleichen heranzuziehen, da die Präparate nach Filtration nicht vorlagen oder aufgrund des erwähnten Abspülfehlers kaum Zellen aufwiesen (hier waren überwiegend die HE-Präparate betroffen). Für die verbleibenden 7 gilt, dass durch Filtration über den Spritzenvorsatzfilter die detektierbare Spermienzahl eher reduziert wird. In einem Fall (F1/011) verbesserte sich die Darstellbarkeit, in einem blieb sie konstant (KK1).

Insgesamt war die Spermiedichte in den Cytologiepräparaten vor Filtration im Vergleich zu denen der Methodenfingerlinge aus Schaubild 2 eher verschlechtert.



Legende: F- Fingerling, Fil- Filtration; GF- Gesichtsfeld; KK- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien

Abbildung 4 Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 66 +/-6 Stunden bzw. 48 Stunden bei eigenständiger Spurensicherung durch Probandin (KK2 Methodenarm)

Ad Abbildung 4: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

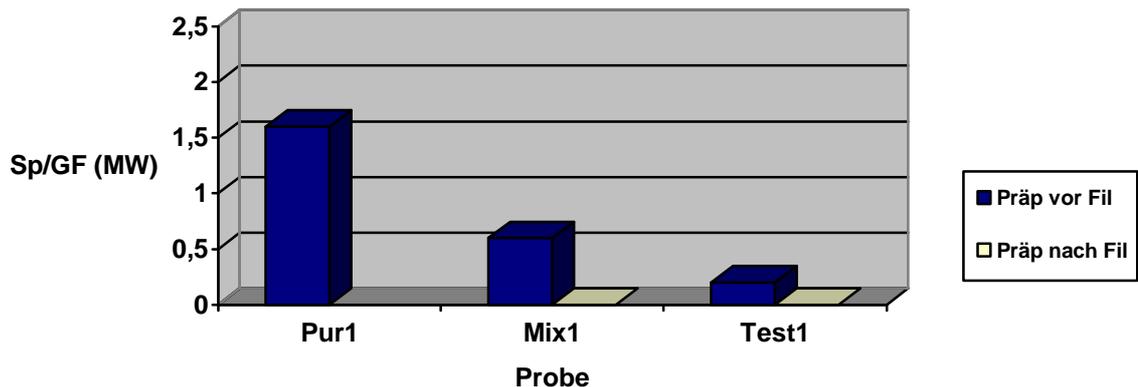
Von 7 Präparatpaaren lagen in einem Fall die Objektträger nach Filtration nicht vor. Ansonsten waren die Postfiltrationspräparate aufgrund des Abspülfehlers und der Schwäche der Filtrationsmethode wie bereits erwähnt nicht aussagekräftig. Vergleiche lassen sich somit nicht ziehen. Einzig bei Fingerling F3/014 war nach Filtration das Auffinden der Spermien deutlich erleichtert, da die Vaginalepithelzahl und -dichte im Vergleich zum Cytologiepräparat vor Filtration deutlich verringert war.

Generell war die Spermienzahl gering, was mit dem verlängerten postkoitalen Intervall korreliert.

Während der manuell durchgeführten Filtration (Zeitaufwand!) bemerkten wir, dass das Drücken des Stempels deutlich schwerer wurde, sobald ein grösserer Anteil der Waschflüssigkeit aus der Spritze filtrierte worden war.

### 3.2.5 Filtration per Vivaclear®-System

Um einen groben Überblick über die Spermiedichte zu erhalten, musterten wir die ungefilterten Präparate Pur1 (Ejakulat) und Mix 1 bis Mix 7 (artifizielle Präparate) sowie exemplarisch die Cytologiepräparate Mix 1 und Test1 (durch Probandin gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 24h) vor und nach Filtration.

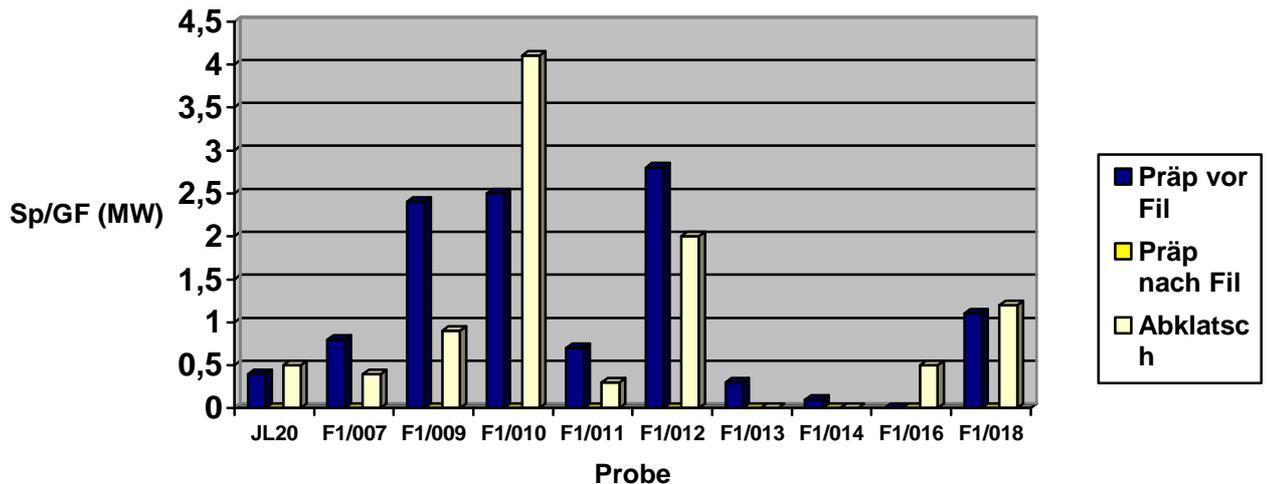


Legende: Fil- Filtration; GF- Gesichtsfeld; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien

Abbildung 5 Vorgehende Läufe mittels Vivaclear

Wie aus Abbildung 5 (Tabelle im tabellarischen Anhang) ersichtlich, waren im Filtrat keine Spermien detektierbar. Wir vermuteten daher auch hier, dass die Zellen im Filter aufgehalten werden.

15 Vergleichsfingerlinge aus ärztlicher Spurensicherung und ein eigenständig erstellter Methodenfingerling (JL20; postkoitales Intervall 20 Stunden) wurden herangezogen. Der Auswaschprozess erfolgte unter Verwendung von ca einem ml handelsüblicher Seife, wobei die Vergleichsfingerlinge somit das zweite Mal ausgewaschen wurden. Wir mikroskopierten Präparate vor und nach dem Filtrationsprozess sowie Abklatschpräparate des Filters. Insgesamt 12 der 16 Fingerlinge konnten als spermienpositiv befundet werden (75 %); davon gelang in zwei Fällen die Spermiedetektion nicht aus dem Ursprungs-, jedoch aus dem Abklatschpräparat, sodass hier bei geringer Spermienzahl die Aufkonzentration gelang.



Legende: F- Fingerling, Fil- Filtration; GF- Gesichtsfeld; JL- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien

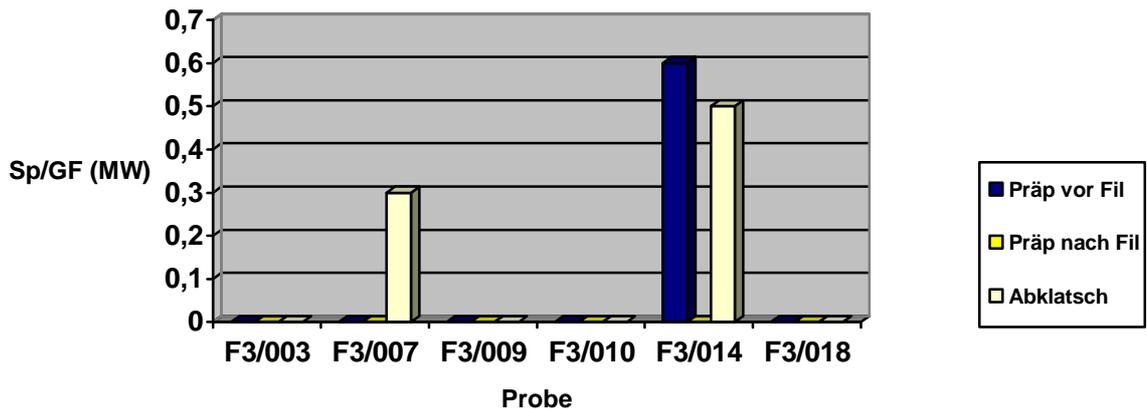
Abbildung 6 Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 24+/-4 bzw. 20 Stunden bei eigenständiger Spurensicherung durch Probandin (JL20/Methodenarm)

Ad Abbildung 6:(Tabelle im tabellarischen Anhang)

In allen Fällen zeigten sich die Cytologiepräparate des entstehenden Filtrats ausgeprägt zellarm bis vollständig zellos, Spermien waren in keinem der Fälle zu sehen. Auf den Abklatschpräparaten hingegen wurden neben Spermien Epithelien unterschiedlicher Dichte gesehen. Die Auswertbarkeit der Abklatschpräparate war in allen Fällen gut.

Die Präparate des Abstriches F1/016 zeigten gar, dass im Präparat vor Filtration keinerlei Spermien detektiert werden konnten, die sehr hohe Dichte der Vaginalepithelien verhinderte dies. Im Abklatschpräparat des Filters gelang der Spermiennachweis. Die Zelldichte war weiterhin hoch, jedoch verringert, sodass die Durchmusterung einfacher durchgeführt werden konnte. In einigen Fällen waren die Präparate vor Filtration (F1/013, F1/014, F1/016, JL20) aufgrund der sehr hohen Dichte an Zellen nur mit hohem Zeitaufwand zu durchmustern.

Beachte: Die Vergleichsfingerlinge waren hier ein zweites Mal ausgewaschen worden; dennoch waren weiterhin Zellen sichtbar.



Legende: F- Fingerling, Fil- Filtration; GF- Gesichtsfeld; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien

Abbildung 7 Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 66 +/- 6 Stunden

Ad Abbildung 7: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

Korrelierend mit dem deutlich erhöhten Intervall zwischen GV und Spurensicherung war in der Mehrzahl der Präparate kein Spermienfund möglich, wobei die Befundung der Cytologiepräparate zusätzlich durch die hohe Epitheldichte mit massiver Überlagerung erschwert wurde (F3/009, F3/010). Die Abklatschpräparate waren allesamt besser zu durchmustern, da die Filtration zu einer deutlichen Reduktion der Zelldichte geführt hatte. Spermien konnten jedoch nur in zwei der sechs Fingerlinge gefunden werden. In allen Fällen blieben die das Filtrat darstellenden Präparate ohne Spermienfund und generell sehr zellarm. Beachte Fingerling F3/014: Hier gelang als Sonderfall dieser Reihe im Präparat vor Filtration und im Abklatschpräparat der Spermienachweis sehr gut. Die Vaginalepitheldichte war auch im Ursprungspräparat nicht störend hoch.

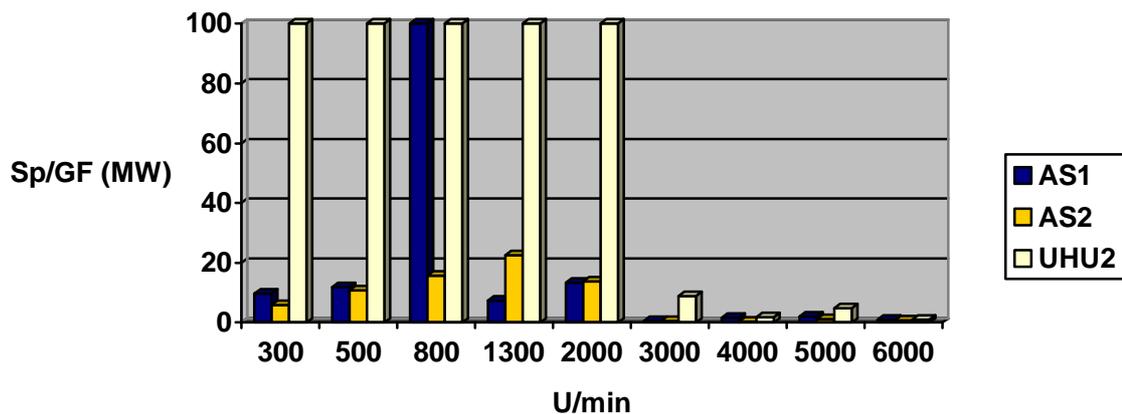
### 3.2.6 Zentrifugatpräparate

Es kamen Mikroskopiepräparate der artifiziellen Spuren (AS 1, AS2) sowie eine eigenständig durch die Probandin gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall von zwei Stunden (UHU2) zum Einsatz.

Die Auswaschprozesse erfolgten unter Verwendung von ca. ein ml handelsüblicher Flüssigseife gemäss 2.5.5. Das Schaubild zeigt jeweils die

durchschnittliche Spermienzahl pro Gesichtsfeld aus den Pellets nach dem Zentrifugationsschritt. Die Vaginalepithelien sind im Schaubild nicht erfasst.

Beachte: Bzgl. der Mikroskopiepräparate UHU 2 bei 300, 500, 800, 1300 und 2000 U/min lagen Spermien in einer derart hohen Dichte und Zahl vor, dass sie nicht einzeln zählbar waren („massenhaft“). Dies lässt die Schaubilddarstellung nicht zu.



Legende: AS- probenspezifische Betitelung; min- Minute; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; U- Umdrehungen; UHU- probenspezifische Betitelung; Sp- Spermien

Abbildung 8 Methodenarm: Zentrifugationsreihe

Ad Abbildung 8: (Probenbezogene Tabellen im tabellarischen Anhang)

Die Vaginalepitheldichte des genuinen Präparates UHU2 (postkoitales Intervall zwei Stunden) war deutlich höher verglichen mit denen der artifiziellen Spuren AS1 und AS2. Nach Zentrifugation bei 500 U/min nahm sie deutlich ab. Eine weitere Reduktion der Epithelien wurde sichtbar nach Zentrifugation bei 1300 U/min. Die Detektierbarkeit der Spermien wurde dadurch jeweils deutlich erleichtert. Bei den artifiziellen Spuren sahen wir die erste deutliche Dezimierung nach Zentrifugation bei 800 U/min.

In allen Präparaten war nach Zentrifugation bei 3000 U/min nahezu kein Epithel mehr sichtbar.

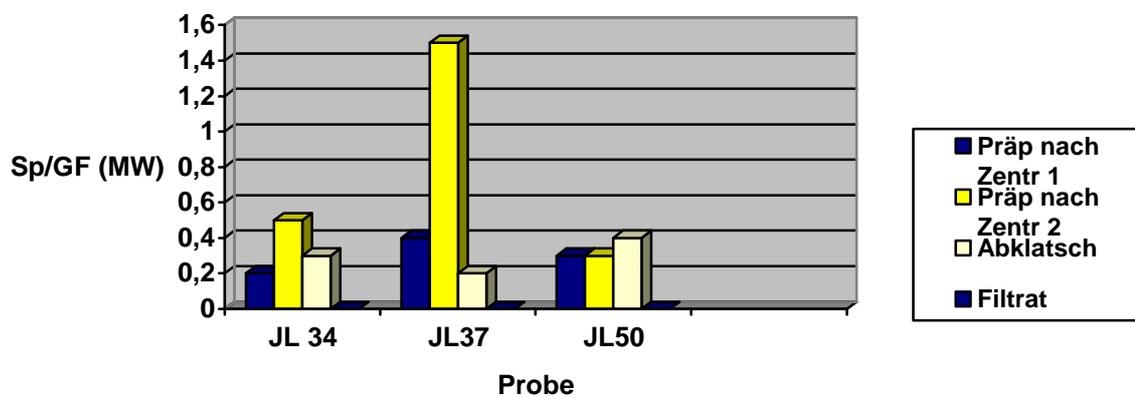
Die durchschnittlich detektierbare Spermienzahl nahm ebenfalls bei Zentrifugation mit 3000 U/min ausgeprägt ab. Offensichtlich zeigt sich hier kein weiterer Vorteil

mehr, vielmehr kommt es zum Spermienverlust, da bei Verwerfen des Pellets das darin befindliche Gros der Spermien entfernt wird.

### 3.2.7 Kombinierte Methodik

Wir verwendeten drei in Eigenregie gesicherte Fingerlingspuren (postkoitale Intervalle 34, 37 und 50 Stunden) des Vergleichsarms gemäss 2.5.6.

Auf allen drei Fingerlingen wurden reichlich Spermien nachgewiesen.



Legende: GF- Gesichtsfeld; JL- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien; Zentr- Zentrifugationsschritt

Abbildung 9 Methodenarm: Kombinierte Methodik (zwei Zentrifugationen plus Abschlussfiltration)

Ad Abbildung 9: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

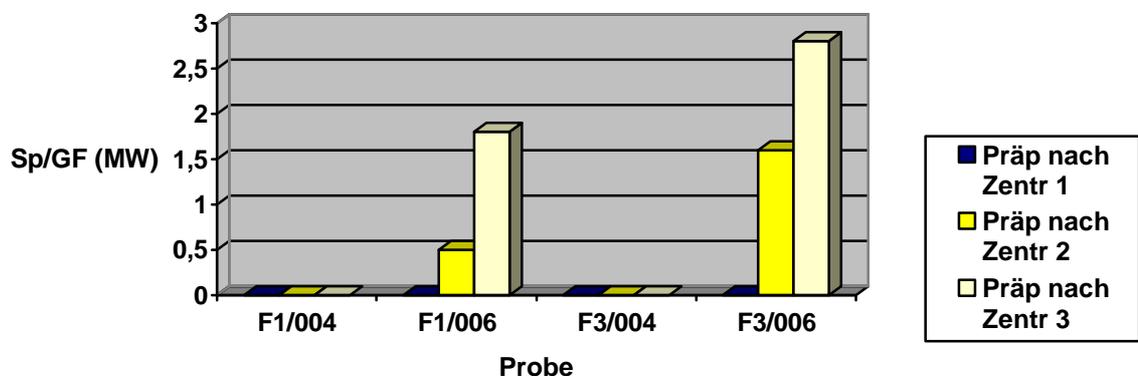
Die Auswertung der Präparate nach erster Zentrifugation waren in allen Fällen durch ausgeprägte Überlagerung bei hoher Zelldichte stark erschwert bis nahezu unmöglich; hier hatte sich vor allem das Vaginalepithel im Pellet gesammelt und wurden dadurch zu einem Grossteil entfernt. Die zweite Zentrifugation führte in allen Fällen zu deutlich verbesserter Durchmusterbarkeit, was sich in der oben dargestellten erhobenen Spermienzahl klar widerspiegelt: Die Epithelien waren bereits entfernt, sodass der zweite Zentrifugationsschritt zur Aufkonzentrierung der Spermien führte. Dennoch verbleibt ein geringer Anteil der Spermien auch nach der hochtourigen Zentrifugation im Überstand. Dies wurde ersichtlich, nachdem die Filtration des letzten Überstandes weiterhin zum Auffangen von Spermien auf den Filtern führte.

Die Filtratpräparate waren erneut allesamt vollständig zellleer.

Die Zahl der detektierten Spermien korreliert mit dem postkoitalen Spurensicherungsintervall. Beachte, dass nach 50 Stunden noch zahlreiche Spermien gefunden wurden! Vereinzelt noch begeisselte Spermien waren sowohl im Präparat 37 Stunden als auch 50 Stunden postkoital auffindbar.

Wir verwendeten vier ärztlich gesicherte Vergleichsfingerlingspuren (postkoitales Intervall 24 bzw. 66 Stunden) in erstmaliger Auswaschung (Abbildung 10) und neun durch Probandinnen erstellte Fingerlinge des Methodenarmes gemäss 2.5.6. mit zusätzlichem Zentrifugationsschritt. Die postkoitalen Intervalle lagen bei neun bis 47 Stunden (Abbildung 11). Auf eine Präparaterstellung aus Filter und Filtrat wurde verzichtet.

Elf von insgesamt 13 Fingerlingen waren positiv zu befunden (84,6%), dies umfasst alle neun der durch Probandinnen erstellten Abstriche.



Legende: F- Fingerling; GF- Gesichtsfeld; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien; Zentr- Zentrifugationsschritt

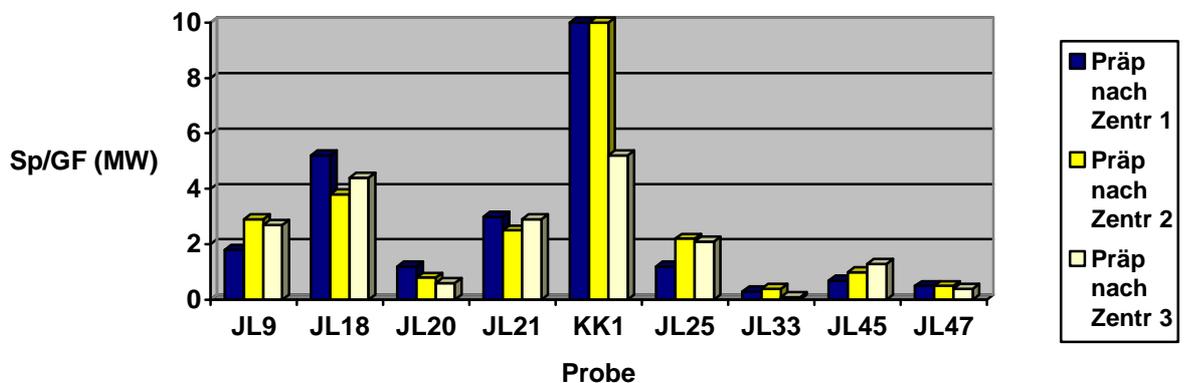
Abbildung 10 Vergleichsarm: Ärztlich erhobene Abstriche der postkoitalen Intervalle 24 +/-4 bzw. 66 +/-6 Stunden (Zentrifugationsreihe)

Ad Abbildung 10: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

Fingerlinge F1/004 und F3/004 wiesen sowohl vor als auch nach der Zentrifugation keine Spermien und kaum weibliche Zellen auf. Hinsichtlich Fingerling F1/006 und F3/006 waren in beiden Fällen die ersten Präparate

aufgrund massiver drängender Zellüberlagerung und ausgeprägt hoher Zellzahl kaum auswert- und Spermien nicht detektierbar. Schaubild und Tabelle zeigen eine enorme Erleichterung der Auswertbarkeit der Präparate durch die Zentrifugation.

Beachte: Der Datenpunkt für KK 1 / Präparat nach Zentrifugation 1 liegt im Unermesslichen aufgrund der massenhaften lichtmikroskopischen Darstellung der Spermatozyten (nicht mehr zählbar); der für KK 1 / Präparat nach Zentrifugation 2 bei 17. Aus Gründen der besseren Darstellbarkeit liessen wir die y-Achse nur bis Datenpunkt 10 zu.



Legende: GF- Gesichtsfeld; JL sowie KK- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien; Zentr- Zentrifugationsschritt

Abbildung 11 Eigenständig entnommene Fingerlingspuren unterschiedlicher postkoitaler Intervalle (KK1 entspricht 24 Stunden) (Zentrifugationsreihe)

Ad Abbildung 11: (Tabelle im tabellarischen Anhang)

Im Wesentlichen sind die Untersuchungen anhand der Methodenfingerlinge mit den Ergebnissen aus Schaubild 10/Tabelle 10 vergleichbar. In den Fällen JL9, JL 25 und JL 45 konnte die Darstellbarkeit aus oben genannten Gründen deutlich verbessert werden.

In den Fällen JL 18, JL 21, JL 33 und JL 47 war zumindest keine wesentliche Verschlechterung zu sehen.

Der Rückgang der Spermienzahl durch die Zentrifugationsschritte bei JL 20 und KK1 ist nicht klar begründbar. Auffallend war, dass bei JL 20 durch den ersten Zentrifugationsschritt zwar die Epitheliendichte in den Präparaten sehr gut reduziert werden konnte, dennoch wenige Spermien detektierbar waren.

Vergleiche mit JL 21; bei vergleichbarem postkoitalem Intervall und Spurenlegung durch das identische Probandenpaar, war hier die Spermienzahl deutlich höher. Präparat JL 20 zeigt jedoch durchgehend eine sehr hohe Granulocytenzahl.

KK1 zeigt hier als Ausreisser aussergewöhnlich hohe Zellzahlen. (Im genuinen Präparat 20 Spermien pro Gesichtsfeld; nach erstem Zentrifugationsschritt 17). Die Reduktion der Spermienzahl durch die Zentrifugationsschritte ist uns nicht erklärlich.

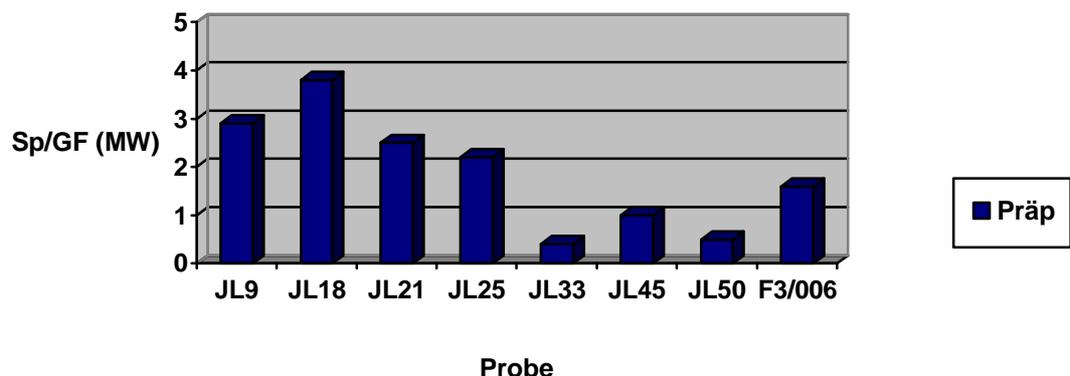
In der Regel wiesen die Mikroskopiepräparate nach dem dritten Zentrifugationsschritt kaum noch Epithelien auf. Sie wurden durch die zwei vorangehenden Zentrifugationsschritte zuverlässig entfernt.

Man beachte, dass auch bei einem postkoitalen Intervall von 47 Stunden noch leicht Spermien aufgefunden werden konnten, in einem vereinzelt Fall sogar begeißelt.

Im Hinblick auf die postkoitalen Intervalle wurde hier ein deutlicher Rückgang des Spermienachweises im Zeitraum zwischen 25 und 33 Stunden gesehen.

### 3.2.8 Korrelation zum postkoitalen Spurensicherungsintervall

Es sind exemplarisch Mikroskopiepräparate aus Fingerlingspuren nach Zentrifugation bei 1000 U/min aufgeführt.



Legende: F- Fingerling; GF- Gesichtsfeld; JL- probenspezifische Betitelung; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien; UHU- probenspezifische Betitelung

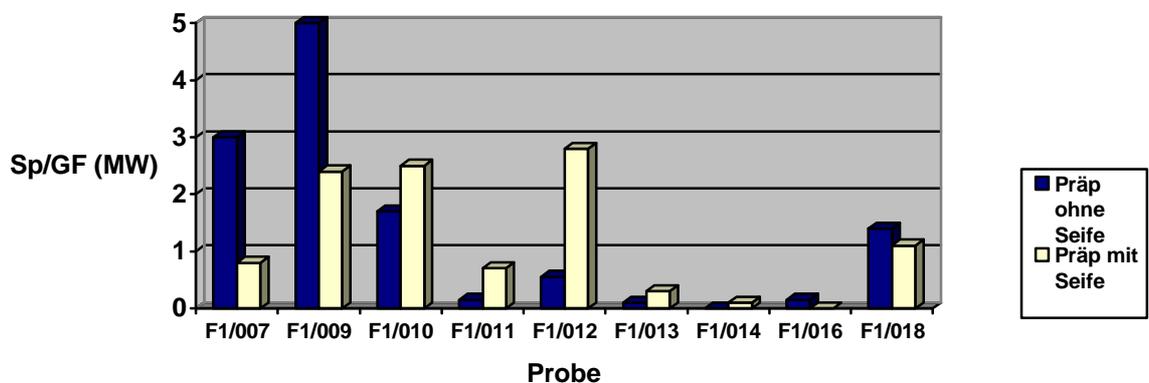
Abbildung 12 Korrelation zwischen Spermien detektion und Intervall zwischen GV und Spurensicherung

Ad Abbildung 12: Es gelang der Nachweis von Spermien bis zu einem Zeitpunkt von mindestens 66 +/- 6 Stunden nach erfolgtem GV mittels der Fingerlingmethode (beispielhaft hier F3/006).

Es wird ein erster deutlicher Abfall der Spermienzahl in den ersten wenigen Stunden und erneut in einem Zeitraum von 25 bis 33 Stunden deutlich.

### 3.2.9 Korrelation zur Verwendung von Detergentien

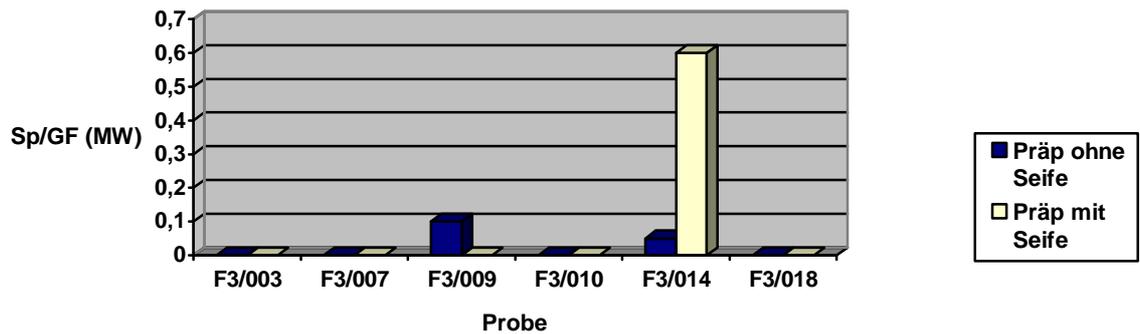
Es werden Mikroskopiepräparate des gleichen Fingerlings gegenübergestellt. Alle Fingerlinge waren als Teil des Vergleichsarms bereits ein Mal ohne Seife ausgewaschen worden und wurden als Teil des Methodenarms erneut verwendet. Die zweite Auswaschung erfolgte mit Zugabe von ca. einem ml handelsüblicher Seife. Die Darstellung zeigt Präparate noch vor der Weiterverarbeitung durch Filtration oder Zentrifugation.



Legende: F- Fingerling; GF- Gesichtsfeld; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien

Abbildung 13 Vergleichsarm: Ärztlich erhobene Abstriche postkoitaler Intervalle 24 +/- 4 Stunden ohne/mit Seifenzusatz im Auswaschprozess

Ad Abbildung 13: Die Darstellung zeigt, dass auch eine zweite Auswaschung noch eine ausreichend grosse Ausbeute an verwertbarem Spurenmaterial zu erbringen mag. In mehr als der Hälfte der Fälle konnte durch die zusätzliche Verwendung von Seife die detektierte Spermienzahl sogar, u. U. sehr deutlich, erhöht werden.



Legende: F- Fingerling; GF- Gesichtsfeld; MW- Mittelwert; Präp- Präparat; Sp- Spermien

Abbildung 14 Vergleichsarm: Ärztlich erhobene Abstriche postkoitaler Intervalle 66 +/- 6 Stunden ohne/mit Seifenzusatz im Auswaschprozess

Ad Abbildung 14: Im Falle der höherintervalligen Vergleichsfingerlinge lag eine ohnehin sehr geringe Nachweiszahl vor. Von hier verglichenen sechs Fingerlingen waren bei vieren keinerlei Spermien nachzuweisen. Bei F3/009 konnte in der ersten Auswaschung eine geringe Spermienzahl identifiziert werden, bei der zweiten Auswaschung keine mehr. Es muss angenommen werden, dass die ohnehin geringe Spermienzahl bereits vollständig abgewaschen worden war. Alternativ ist es möglich, dass noch Spermien auf dem Fingerling befindlich waren, jedoch eine Art der Aufkonzentration notwendig ist, um sie darstellen zu können. Dies wurde auch durchgeführt. Schaubild 5 gibt Aufschluss: Bei der zweiten Auswaschung waren alle Präparate beim Filtrationsprozess mittels der Vivaclear®-Methode spermienleer, insbesondere das Filterabklatschpräparat blieb leer.

F3/014 zeigt hier bei der zweiten Auswaschung mit Seife noch vor der Aufkonzentration deutlich bessere Ergebnisse als nach der ersten Auswaschung. Die Spur aus F3/014 wurde bei erster Auswaschung durch den Spritzenvorsatzfilter filtriert. Hier fiel vor der Filtration eine enorme Überlagerung durch Vaginalepithelien auf, die die Auswertung ausgeprägt erschwerten. Nach Filtration waren die Präparate deutlich besser beurteilbar (Schaubild 4). Nach zweiter Auswaschung wurde die Spur aus F3/014 durch die Vivaclear®-Methode behandelt. Hier fiel vor dem Filtrationsprozess schon eine deutlich reduzierte Vaginalepitheldichte auf, verglichen mit der in den Präparaten der ersten Auswaschung: es war also in der ersten Auswaschung zu einem geringen Spermien- und hohen Vaginalepithelienverlust gekommen.

### 3.3 Interpretation der Ergebnisse

Bezugnehmend auf die Fragen aus Kapitel 1.8 sollen die Ergebnisse zusammengefasst werden.

#### **Wie kann die Mischspur zuverlässig vom Spureträger abgetrennt werden?**

Eine Auftrennung der Fingerlinge in kleinere Untereinheiten und deren Übertragen in die weitere Laborverarbeitung kam aufgrund des Konzeptes der flächenhaften Spurensicherung nicht in Betracht. Es erfolgte daher die Auswaschung der spurentragenden Fingerlinge durch Schüttelinkubation mit isotoner Natriumchloridlösung im hinreichend großen Falcongefäß. Die mikroskopische Untersuchung der Tropfpräparate konnte regelhaft aufzeigen, dass mindestens Teile der Spur abgewaschen worden waren, jedoch mit erheblichem Überhang der Vaginalepithelfraktion. Spätere Untersuchungsgänge mit Abwaschen unter Verwendung von Detergentien (in diesem Fall praktikabel durch handelsübliche Seife) zeigten eine verbesserte Ablösbarkeit der Spur vom tragenden Grund und darüber hinaus im Falle der doppelt ausgewaschenen Fingerlinge auch, dass sich nach der ersten Auswaschung ohne Seife weiterhin Spermien auf dem Fingerling befunden hatten, die nun zugänglich wurden. Dies sagt uns, dass nur unter Natriumchloridverwendung die Ablösung der relevanten Teile der Spur, die männliche Fraktion, zumindest nur teilweise erfolgt und möglicherweise unzureichend ist. Das Abwaschen der Spur vom Fingerling durch Schüttelinkubation ist möglich und wird durch Zugabe von Detergentien noch verbessert. Zusätzlich konnte jedoch auch gezeigt werden, dass der Fingerling wiederholt untersuchbar ist im Gegensatz zum herkömmlichen Watteträger, der durch direktes Einsetzen in die Differentielle Lyse damit verloren ist. Der Fingerling kann somit auch der Qualitätssicherung dienen.

#### **Wie können die Spermien von den weiblichen Komponenten separiert werden?**

Evaluiert wurden zunächst mehrere Filtrationstechniken welche allesamt aus verschiedenen Gründen nicht befriedigend sind.

Mittels der selbstgebauten Filtrationsvorrichtung konnte aus unserer Sicht eine zufrieden stellende Zellfraktionstrennung erreicht werden, Alltagstauglichkeit besteht jedoch nicht.

Der Filtrationsprozess über die noch provisorische Filtrationsvorrichtung verlief zunächst einmal erfolgreich. Spermien waren vor und nach Filtration nachweisbar, jedoch wurde durch das Zurückhalten der Epithelien auf dem Filter die Detektierbarkeit der Spermien im Filtrat deutlich verbessert, was eine Zeit- und daher Kostenersparnis durch die verbesserte Durchmusterbarkeit bedeutet.

Der Effekt wurde insbesondere bei höherintervalligen Proben deutlich, da sich hier im Ursprungspräparat anteilig an der Epitheliendichte weniger Spermien befinden und diese daher lichtmikroskopisch schlechter gesichtet werden können. Nicht in allen, jedoch in der überwiegenden Zahl der Fälle, war die Auffindbarkeit der Spermien nach Filtration deutlich verbessert. In allen Fällen wurde die Zahl der Vaginalepithelien massiv reduziert oder fast vollständig entfernt, sodass das Durchmustererheblich vereinfacht war. Wie später ersichtlich wurde, steht dies im Gegensatz zu den Filtratpräparaten bei Verwendung von Spritzenvorsatzfilter oder Vivaclear®, wo im Filtrat regelhaft nur wenige oder keinerlei Zellen mehr aufzufinden waren. Das provisorische Filtersystem hält die Epithelien zuverlässig zurück. Spermien sind durchgängig, nach unserem Dafürhalten jedoch hauptsächlich aufgrund der Undichte des Systems, die der Aufbau mit sich brachte. Wir vermuten den Durchtritt in den Randbereichen der Vorrichtung. Es wurden Materialien verwendet (Blutserumröhrchen und Multiadapter), die nicht für Filtrationszwecke vorgesehen sind, daher entsteht eine eigentlich nicht erwünschte Durchlässigkeit. Dies zeigte sich auch in der Tatsache, dass das Niederdrücken der Stempel beim Filtrationsvorgang bis zur Neige ohne Anstieg des Widerstandes möglich war. Bei Verlegen des Filters durch darauf zurückgehaltene Zellen, wie in der Versuchsanordnung aufgrund der hohen Zahl an Vaginalepithelien zu vermuten, sollte man einen Anstieg des Widerstandes vermuten, der grösseren Druck auf den Stempel notwendig machen wird. Dass an undichten Stellen eher Spermien als Epithelien hindurchwandern, begründet sich in geringerer Grösse und Dichte der Spermien.

Insgesamt ist das provisorische System aufgrund vieler zeitintensiver Arbeitsschritte (Ausschneiden und Einpassen von kleinem Filtermaterial) sowie grosser Unsauberkeit für die Laborroutine nicht geeignet. Zusätzlich führen mehrere Behältniswechsel zu Spurenverlust.

Unabhängig von der Verarbeitungsmethode soll ein Nebenbefund nicht unerwähnt bleiben: Im direkten Vergleich der K- und F-Präparate, die jeweils einer Probandin zugeordnet werden konnten, stellten wir eine gewisse Vergleichbarkeit der weiblichen Fraktion fest: unter allen Cytologiepräparaten, die der gleichen Probandin zuzuordnen war, war die Vaginalepitheldichte im Ursprungspräparat vergleichbar. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl an Präparaten kann dies jedoch nur als Tendenz und nicht als sichere Reproduzierbarkeit angesehen werden.

Die Benutzung des Spritzenvorsatzfilters ist durch die aufwändige Reinigung sowie die manuell durchzuführende Filtration ebenfalls nicht unkompliziert und die Ergebnisse waren unzureichend. Ein zuverlässiges Zurückhalten der Epithelien konnte gezeigt werden (sofern die Präparate suffizient waren), jedoch zeigte sich auch ein erheblicher Rückgang der Anzahl der detektierten Spermien. Wir vermuten analog zu den Vivaclear®-Ergebnissen, dass der überwiegende Teil der Spermien im Filter zurückgehalten wurde aufgrund Verlegung durch die Überzahl an Epithelien.

Ein Verarbeitungsfehler konnte identifiziert werden: Eine Vielzahl an Präparaten war sowohl vor als auch nach Filtration kaum oder nicht verwertbar, da sie nahezu zell-leer waren, was insbesondere die HE-Präparate betraf. Es war im Rahmen des Färbeprozesses mutmaßlich zu einem Herabspülen der Zellen gekommen. Die PAP-Präparate sind aufgrund des aufgetragenen Fixiersprays in deutlich geringerem Ausmaß betroffen. Die spätere Verwendung von Objektträgern mit Polylysinbeschichtung konnte den Fehler zuverlässig beheben.

Bezüglich der verwertbaren Präparate vor Filtration war die Spermiedichte im Vergleich zu den zuvor verwendeten Fingerlingen reduziert. Da die Auswaschmethode identisch war, ist dies nicht ohne weiteres erklärlich, sondern am ehesten der Tatsache geschuldet, dass biologische Spuren keiner Norm zu unterwerfen sind.

Der Filtrationsmechanismus über den Spritzenvorsatzfilter ist nicht nur zeitaufwendig, sondern auch mit unsauberem Arbeiten verbunden, was mit der Routinearbeit in einem Labor nicht zu vereinbaren ist. Der Spritzenvorsatz muss nach jedem Filtrationsgang sorgfältig gereinigt und getrocknet werden, was Zeit kostet. Vollständige Sicherheit, alle Zellen beim Reinigen abgespült zu haben,

kann nicht erwartet werden. Daher ist es möglich, dass es beim nächsten Präparat zur Kontamination kommt. Durch das mehrfache Übertragen der Spur in Folgegefäße besteht das Risiko, einen wesentlichen Anteil der Spur zu verlieren. Wir halten die Filtration über den Spritzenvorsatzfilter daher für einen ungeeigneten, da nicht praktikablen und nicht funktionierenden Mechanismus.

Die Benutzung des Vivaclear®-Systems stellte sich für unsere Zwecke als ebenfalls ineffizient dar. Spermien fanden sich regelhaft jeweils auf dem einliegenden untersuchten Filter zusammen mit Epithelien, wodurch sie zwar aufkonzentriert werden konnten, jedoch keine Zellfraktionstrennung gelang. Insgesamt birgt dies jedoch die Möglichkeit, bei sehr geringer Zelldichte unter sauberem Arbeiten eine Aufkonzentration der Zellen zu erreichen. Dies zeigte sich bspw. anhand des Präparates F3/007.

Zur Evaluation des Vivaclear®-Systems wurden in der überwiegenden Zahl der Fälle (15 von insgesamt 16) Fingerlinge verwendet, die bereits ein Mal ausgewaschen worden waren. Dennoch zeigten 11 der doppelt ausgewaschenen Fingerlinge noch einen ausreichend guten Spermienfund. Die übrigen vier waren durchgehend höherintervallige Präparate mit ca. 66 Stunden, was die Spermienzahl per se reduziert. Epithelien waren auch hier in hoher Dichte zu sehen. Dies lässt insgesamt darauf schließen, dass die Spermien-dichte aufgrund des höheren zeitlichen Intervalls und nicht aufgrund des bereits vorangegangenen Auswaschens reduziert war.

Es fällt Präparat F3/014 auf: auch im Ursprungspräparat war hier die Vaginalepitheldichte nicht störend hoch, sodass auch dieses neben dem Abklatschpräparat eine gute Auswertbarkeit mit gutem Spermienfund offenbarte. Der Grund hierfür mag die durchgeführte zweimalige Auswaschung sein: Bei der ersten Auswaschung nur mit Natriumchloridlösung war es vorwiegend zum Wegwaschen der Epithelzellen gekommen, während die Spermien aufgrund ihrer Oberflächenstruktur besser am Fingerling anhaften konnten. Im zweiten Waschvorgang mit Detergens wurden verbessert die Spermien abgelöst, während die Epitheldichte in der Spur bereits reduziert war.

Insgesamt ist die Handhabung der Filtrationstubes einfach und sauber; einzig das Heraustrennen des Filters ist aufwendig.

Die zuletzt evaluierte Zentrifugationsmethode wird unsererseits eindeutig favorisiert: Es sind nur wenige Arbeitsschritte nötig, Unsauberkeiten und Materialverlust können durch die geringe Zahl der Übertragungen in weitere Gefässe minimiert werden. Die benötigten Geräte und Materialien sind Teil der üblichen Laborausstattung und müssen nicht eigens angeschafft werden. Die Zellfraktionstrennung gelang sicher und reproduzierbar. Insgesamt lässt sich durch einen Zentrifugationsschritt bei 1000 U/min das Vaginalepithel gut abtrennen und ein hinreichend grosser Anteil der Spermien durch eine weitere Zentrifugation des verbleibenden Überstandes bei 2000 U/min im Pellet aufkonzentrieren. Zwei Zentrifugationsschritte sind demnach ausreichend.

Das Ergebnis konnte im Rahmen mehrerer Zentrifugationsreihen unter ähnlichen Bedingungen erfolgreich reproduziert werden. Es gelang eine zuverlässige Entfernung der weiblichen Fraktion mit dadurch ausgeprägt verbesserter Auswertbarkeit der Präparate und eine sehr gute Aufkonzentration der im Gesamtpräparat nun nicht mehr unterrepräsentierten Spermienfraktion.

Negative Ausreisser waren Präparate F1/004 und F3/004 und KK 1, was eine punktuelle Schwäche entweder der Entnahme oder der Auswaschprozedur vermuten lässt. Vermutete Auffälligkeiten bei der Scheidenflüssigkeit z. B. auch im Sinne eines vaginalen Infektes der Probandin bestanden nicht. Das Sekret war weder auffallend gering viskös noch in ausgeprägt grossen Mengen vorhanden, sodass ein erhöhter Ausspüleffekt aus der Vagina durch das Vaginalsekret keine Erklärung bietet.

Anders bei Ausreisserpräparat JL 20; hier zeigte sich ebenfalls ein Rückgang der Spermienzahl durch die Zentrifugationsschritte insbesondere in der Gegenüberstellung mit Präparat JL 21, welches von der gleichen Probandin mit vergleichbarem postkoitalem Intervall stammt. Die im Präparat JL 20 gesehene erhöhte Granulocytenzahl lässt auf einen vaginalen Infekt und daher raschere Drainage der Spermatozyten schliessen mit folgender Unterrepräsentation derselben auch bei guter Epithelreduktion.

Alternativ oder zusätzlich zum zweiten Zentrifugationsschritt kann durch Filtration des zuletzt verbleibenden Überstandes ebenfalls eine Aufkonzentration der Spermien auf dem Filter mittels des Vivaclear®-Systems erreicht werden. Das

verbleibende Filtrat bot in unseren Untersuchungen keine verwertbaren Spuren mehr. Der Filter muss dann aber etwas aufwändig herausgetrennt werden.

### 3.4 DNA-Analytik

Es erfolgte wie im Methodenteil beschrieben auch die Sequenzierung mittels PCR und DNA-Sequenzierung. Wie ersichtlich, geriet die Verfeinerung der Methodik von Spurenablösung vom Spureträger und die Abtrennung der männlichen von der weiblichen Zellfraktion derart in den Focus unserer Arbeit, dass wir auf die Darstellung der Sequenzierungsergebnisse verzichten zugunsten der cytologischen Ergebnisse.

## 4. Diskussion

Die Spurensicherung nach angegebenem Sexualdelikt und deren Auswertung macht sowohl eine grosse gynäkologische als auch rechtsmedizinische Expertise notwendig. Eine Vielzahl von Störfaktoren kann den Nachweis der Spur und die eindeutige Zuordnung zum Täter deutlich erschweren:

1. Eine erste Schwachstelle kann die gynäkologische Spurensicherung an sich sein, die möglicherweise aufgrund der Art der Durchführung von der zu Untersuchenden nicht toleriert wird. Daher ist es wichtig, auf eine Möglichkeit der opferschonenden Spurensicherung zurückgreifen zu können. Bei groben Abweichungen in Untersuchung und Spurensicherung kann es zu untersucherbezogenen Fehlern kommen. Ein einfach handhabbares Procedere minimiert dies.
2. Im Rahmen der labortechnischen Verarbeitungsprozesse kann es zu deutlichen Schwierigkeiten kommen: ein ausgeprägter Überhang der weiblichen Zellfraktion als Teil der herkömmlich erhältlichen Mischspur kann das Auffinden der männlichen Zellen deutlich erschweren bis unmöglich machen. In diesem Fall ist die DNA-Typisierung dementsprechend verkompliziert. Es ist daher unabdingbar, Mechanismen zu finden, die die männliche sicher von der weiblichen Zellfraktion trennt.
3. Bei verlängertem zeitlichem Abstand zwischen Spurenlegung und –sicherung kann die vergleichsweise geringe Menge der herkömmlich gesicherten Spur unter Umständen nicht ausreichend sein, um im Anschluss den Nachweis von Spermatozyten zu ermöglichen. Ein großflächig die Spur sichernder Träger wird in diesem Fall benötigt. Es ist zudem von hohem Interesse, wie lang in noch ausreichender Anzahl Spermien im Spurenmaterial detektierbar sind.

Das **Ziel unserer Studie** war es, einen **alternativen Spureträger** ausfindig zu machen, der es möglich macht, die Spurensicherung nach angegebenem Sexualdelikt **opferschonend und großflächig** durchzuführen. Beide Kriterien werden von dem Baumwollfingerling erfüllt (s. u. Ad 1). Wir führten daher initial eine Untersuchungsreihe mit dem Ziel des direkten Vergleichs zwischen

Fingerling- und herkömmlicher Spurensicherungsmethode durch. Hierbei stellten wir jedoch erhebliche **Schwierigkeiten hinsichtlich der Verarbeitung der Fingerlingspuren** fest, was eine erneute Experimentalreihe zur Evaluation einer adäquaten Labormethodik notwendig machte (s. u. Ad 2). Nach deren Optimierung war es von grossem Interesse, inwiefern der Fingerling **auch bei prolongiertem postkoitalem Intervall noch männliche Spuren nachzuweisen vermag**. (s. u. Ad 3)

Ad 1.

Die Spurensicherung unter Verwendung der etablierten Spureenträger (langstieliger Watteträger) verläuft unter Sicht meist in Steinschnittlage auf einem gynäkologischen Untersuchungsstuhl. Zeitgleich wird hierbei der körperliche Untersuchungsbefund unter rechtsmedizinischen und gynäkologischen Aspekten erhoben.

Häufig sind zwei Untersucher vor Ort, insbesondere bei vorhandener Kooperation zwischen der involvierten gynäkologischen Klinik mit einem Institut für Rechtsmedizin. Die Geschädigte offenbart also in diesem Fall gegenüber mehreren ihr unbekanntenen Personen den intimsten Bereich ihres Körpers; dies geschieht unter Umständen nur wenige Stunden nach einem schweren Eingriff in ihre körperliche Selbstbestimmung. Insgesamt kann somit die Untersuchung und Spurensicherung, obwohl selbstverständlich unerlässlich vonnöten, eine retraumatisierende Qualität annehmen. Möglicherweise veranlaßt dies die Betroffene im Sinne eines angstgeprägten Vermeidungsverhaltens, sich der Spurensicherung erst gar nicht zu stellen. Sollten aus diesem Grunde die zur strafrechtlichen Verfolgung des Spurenlegers nötigen Spuren nicht erhoben werden können, wäre dies ein sehr unglücklicher Umstand.

**Wie kann die Spurensicherung zuverlässig unter dem Aspekt der grösstmöglichen Schonung der Geschädigten durchgeführt werden?**

Hier stellt die Spurensicherung mittels des Baumwollfingerlings eine sinnvolle Alternative dar. Im praktischen Teil der Studie zeigte sich, dass die Anfertigung der vaginalen Abstriche unter Verwendung des Fingerlings rasch und komplikationslos durchführbar ist; dies betraf sowohl die Eigen- als auch die Fremduntersuchung. Die Spurensicherung an sich ist für die zu Untersuchende, das Fehlen grösserer Verletzungen vorausgesetzt, **schmerzfrei und komfortabel**. Die initial von uns angebotene intravaginale Eingabe von Salbe oder

Gleitmittel nach Abstricherstellung wurde von den Probandinnen in keinem Fall gewünscht oder als notwendig beschrieben. Sowohl die ärztlichen Untersucher als auch die Probandinnen bestätigten die **einfache und praktikable Handhabung**, was nicht nur die Berührungsängste in Bezug auf die Abstricherhebung, sondern auch das Auftreten von insuffizienten Abstrichpräparaten minimiert. Die Abstricherstellung in Eigenregie durch die Probandinnen verlief komplikationslos. Dies wird zusätzlich durch die hohe Anzahl der als spermientragend ermittelten Fingerlinge untermauert (75 % bei Fremd-, 100% bei Eigenabstrich; beachte: die ärztlich erhobenen Abstriche waren überwiegend durch die anfänglichen Missstände der Methode nicht ausreichend gut auswertbar). Daher halten wir es für möglich, dass im Echtfall eines Sexualdelikts die Spurensicherung alleine durch die Geschädigte unter Verwendung des Fingerlings **opferschonend** durchführbar ist. Die körperliche Untersuchung ersetzt dies nicht! Die Fingerlingmethode ermöglicht jedoch selbst bei einer Geschädigten, die die Untersuchung auf dem Untersuchungsstuhl ablehnt, eine Spurensicherung, sodass eine Zuordnung des vorhandenen Spurenmaterials zu einem Verdächtigen möglich wird und die strafrechtliche Verfolgung des Spurenlegers optimiert werden kann.

Nach unserem Dafürhalten reduziert die Abstricherstellung mittels Fingerling aufgrund der sehr einfachen und gut reproduzierbaren Handhabung den untersucherbezogenen Fehler deutlich.

Ad 2.

Anspruch an den Spurenräger ist eine möglichst einfach handhabbare Einbindung in den Laboralltag.

**Wie kann die vaginal gesicherte Sekretmischspur zuverlässig von dem Spurenräger abgetrennt werden? Wie kann die männliche Zellfraktion sicher von der weiblichen abgetrennt werden?**

**Wissenschaftliche Vorerfahrungen mit einem vergleichbaren grossflächig die Spur sichernden Spurenräger konnten in ausführlicher Literaturrecherche nicht gefunden werden.**

Simple Ausschneiden von mit der Spur benetzten Stellen des Baumwollfingerlings und deren direktes Einsetzen in die Differentielle Lyse kamen nicht in Betracht. Dies hätte das Konzept der grossflächig gesicherten und

vollständig nutzbaren Spur in Frage gestellt. Wir suchten daher nach einer Methode, die Spur vom Fingerling als Ganzem abzutrennen und entschieden uns für ein **Auswaschen des Fingerlings in einem Falcongefäß** adäquaten Volumens durch Schüttelinkubation.

Die Trennung der Zellfraktionen ist aufgrund des massiven Überschusses an weiblichem Vaginalepithel, besonders auf einem so grossflächig sichernden Spurenträger wie dem Baumwollfingerling, unabdingbar. Die Literatur beschreibt hierbei in Bezug auf die herkömmlichen Spurenträger eine Vielzahl von Möglichkeiten: Differentielle Lyse [92; 98; 59; 90], FACS [80], Filtrationsverfahren [10; 26], mikrofluidische Auftrennungsmethoden [37; 38] und die Laser-mikrodissektion [14; 20; 81]. Mit dem Ziel einer möglichst einfachen und wenig kostspieligen Handhabung sowie gute Reproduzierbarkeit entschieden wir uns initial für eine Auftrennung der Zellfraktionen auf Basis der **Filtrationsmethodik**.

In unserer anfänglich durchgeführten Vergleichsreihe (Wattestäbchen vs. Vergleichsfingerlinge) war es das Ziel, die Nachweisbarkeit von Spermien und männlicher DNA via lichtmikroskopischer Durchmusterung und DNA-Typisierung gegenüber zu stellen. Die Vergleichsreihe konnte aufgrund anfänglicher methodischer Schwierigkeiten nicht zufriedenstellend abgeschlossen werden. Die Spurenverarbeitung der Watteträger erfolgte nach etablierter Methode, die der Fingerlinge wie beschrieben durch Schüttelauswaschung und Filtration der resultierenden Flüssigkeit. Wir stellten bzgl. der Prozessierung der Fingerlinge erhebliche Schwierigkeiten fest: Die Auswaschung der Fingerlinge in den Falcongefäßen war einfach handhabbar und gut praktikabel, konnte jedoch später noch durch Seifenzugabe verbessert werden. Der initial vielversprechende Ansatz der Zellfraktionstrennung durch Filtration war letztlich nicht erfolgreich. In einem vorangestellten Filtrationstestlauf mittels der selbstgebauten Vorrichtung sahen wir zunächst zufrieden stellende Ergebnisse. Jedoch ist die Methode aus bereits aufgeführten Gründen für die Laborroutine nicht geeignet. Als weiterführenden Schritt wandten wir die Filtration über auswechselbare Filter im Spritzenvorsatzfilterhalter und mittels des Vivaclear®-Systems an. Auch diese Methode war aufwendig und letztlich als Routineprozess aufgrund erheblicher Unsauberkeit, zeitintensiver Arbeitsschritte und methodischer Insuffizienz wie weiter oben beschrieben nicht gut geeignet.

Nicht zuletzt stellte sich auch die Wahl der Objektträger aufgrund des Abspülfehlers bei nicht beschichteten Exemplaren als maßgeblicher Störfaktor heraus, sodass der vorgesehene Vergleich zwischen Fingerling- und zugeordneten Watteträgerpräparaten oftmals nicht stattfinden konnte. **Nach Wahl der polylysinbeschichteten Objektträger waren alle Präparate einwandfrei.**

Aus den genannten Gründen stellten wir den Vergleichsarm zurück. Insgesamt war nach den nicht befriedigenden Ergebnissen eine **weitere Versuchsreihe mit dem Ziel der Methodenoptimierung** vonnöten. Dies geschah wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben durch die Experimentalreihe mit Verwendung der durch die Probandinnen in Eigenregie gesicherten Fingerlingspuren ohne Vergleichspräparate sowie von vier Präparaten der ärztlich gesicherten Spur, zu der wir die vorhandenen Vergleichspräparate unberücksichtigt ließen. Darüberhinaus verwandten wir erneut einen Grossteil der Vergleichsfingerlinge in zweiter Auswaschung. Hervorzuheben ist hier der einmalige Vorteil der Wiederverwendbarkeit des Fingerlings, was bei den Watteträgern nicht möglich ist, da diese durch das direkte Einsetzen in die Differentielle Lyse damit verloren sind. Der Fingerling hingegen kann nach einer ersten Untersuchung aufbewahrt und im Bedarfsfall erneut untersucht werden. So kann falls vonnöten auch ein anderes Labor involviert werden; ebenfalls kann dies der Qualitätssicherung dienen.

Darüberhinaus sahen wir grosse Vorteile durch Seifenzugabe in der zweiten Auswaschung (s. bspw. Abbildung 13 / Kap. 3), was sich mit der langen Tradition der Detergentienzugabe von z.B. SDS deckt (Vgl. Quelle [59; 90]).

Cave: Soll die so abgetrennte Spur später der DNA-Typisierung zugeführt werden, wird die zugehörige PCR durch das Detergens deutlich gestört, sodass zunächst eine Aufreinigung erfolgen muss.

Zusätzlich sahen wir anhand der Ergebnisse auch die Möglichkeit der Doppelauswaschung zur Aufkonzentration der Spermien: eine erste Abtrennung der Vaginalepithelien durch simples Auswaschen durchzuführen verringert bereits den Überhang der Vaginalepithelien, sodass in der zweiten Auswaschung besonders unter Seifenverwendung ein günstigeres Verhältnis von Spermien zu Epithelien zu erwarten ist.

Bei für unsere Zwecke geringer Praktikabilität verwarfen wir die Methode der ausschliesslichen Filtration zur Fraktionstrennung und evaluierten die Trennung von Epithelien und Spermien durch **Zentrifugation**. Sie stellte sich als **zuverlässig und gut praktikabel** heraus. Durch wenige Arbeitsschritte und Verzicht auf kostenintensive Geräte ist sie zeitsparend und preisgünstig. Durch wenige Behältniswechsel wird der Materialverlust minimiert. Die Spermienfraktion wird zuverlässig und reproduzierbar von den restlichen Bestandteilen der Mischspur abgetrennt. Eine Einschränkung besteht jedoch: Sollte es sich bei gelegten Spur lediglich um männliche Epithelien handeln, bspw. bei Ausbleiben der Ejakulation oder Azoospermie wie bei Sexualstraftätern überdurchschnittlich oft vorhanden, ist die Zentrifugationsmethode nicht sinnvoll, da sie die Zellfraktionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften trennt.

Ad 3.

Alle Präparate auch vor Optimierung der Präprozessierung berücksichtigend, gelang der lichtmikroskopische Spermiennachweis aus Fingerlingspuren des Vergleichsarms **regelmäßig bis zu einem postkoitalen Intervall von 66 +/- 6 Stunden** (ärztlich erhobene Spur). Bzgl. der eigenständig erhobenen Spurensicherung im Methodenarm war die lichtmikroskopische Durchmusterung bis **mindestens 50 Stunden postkoital** spermienpositiv.

In zwei Fällen (F2/009 und P III) wurde bei fehlender Ejakulation kein positiver Befund in der Spurensicherung erwartet; dennoch wurden im Cytologiepräparat Spermien gesichtet. Der für F2/009 in Frage kommende GV mit Ejakulation hatte nach Angaben der Probandin drei Tage zuvor stattgefunden. Eine Abstrichentnahme direkt diesem Verkehr zugeordnet wurde nicht durchgeführt. In diesem Fall wurde mittels der Fingerlingspuresicherung erneut drei Tage postkoital Spermien detektiert. Bei P III lag das errechnete postkoitale Intervall ebenfalls bei ca. 62 Stunden. Jedoch war in der Zwischenzeit schon einmal eine Abstrichentnahme erfolgt, sodass **der Fingerling hier noch verwertbare Spuren nachwies, nachdem bereits einmal eine Spurensicherung durchgeführt worden war**. Über die Spermiedichte in den direkt dem Verkehr zugeordneten Präparaten kann keine Aussage getroffen werden, da die Präparate vor Filtration

nicht vorliegen, die nach Filtration nicht verwertbar sind aufgrund des erwähnten Abspülfehlers.

**Von insgesamt 34 einen GV mit Ejakulation abbildenden Fingerlingen wurden auf 29 Fingerlingen Spermien lichtmikroskopisch nachgewiesen. (Detektionsrate ~85,3%). Regelmäßig gelang der Spermienachweis im Rahmen der erfassten Zeitintervalle bis 66 Stunden postkoital. Als weiterer Einzelfall konnten bei Fehlen vergleichbarer Präparate durch den Fingerling auch nach bereits erfolgter Spurennahme in zweiter Abstricherstellung Spermien gesichert werden. Es ist denkbar, dass bei verzögerter Abstrichentnahme im Realfall nur aufgrund dieser Eigenschaft des Fingerlingspureenträgers die Strafverfolgung des Spurenlagers möglich ist.**

Dem Vergleich mit in der Literatur aufgeführten Daten hält der Fingerling in diesem Sinne stand:

Rupp berichtete 1969 von einer Nachweisdauer von acht Stunden bzgl. motiler, 14 Stunden hinsichtlich unbeweglicher Spermien [78]. Die Spurensicherung erfolgte hierbei nicht mittels Watteträgerabstriche, sondern durch Absaugen der Vaginalflüssigkeit unter Verwendung einer sterilen Saugglocke. Es handelte sich um Echtfälle mit einer Fallzahl n=84; in allen Fällen lag das Zeitintervall zwischen Spurennahme und erfolgreicher -sicherung bei maximal 14 Stunden. In weiteren 12 Fällen postkoitaler Intervalle drei bis 34,5 Stunden hingegen schlug bei positivem SP- der lichtmikroskopische Spermienachweis fehl, was teilweise durch Duschbäder oder Menstruationsblutung erklärt wurde. [78] Der Fingerling mit einer Nachweisdauer bis 66 Stunden regelmäßig ist als Spurensicherungsmethode sicher überlegen. Bzgl. des angeschlossenen labortechnischen Verfahrens ist eine Fraktionstrennung bei Rupp nicht beschrieben; die Verwendung einer unbehandelten Mischspur bringt jedoch mutmaßlich eine sehr hohe Dichte an Vaginalepithel hervor und erschwert somit die Auffindbarkeit der Spermien. Die von uns praktizierte Fraktionstrennung bringt hier einen deutlichen Vorteil. Dies sollte auch das bei uns sehr abweichende Maximalnachweisintervall (14 versus 66 Stunden) erklären. Oberhalb von 14 Stunden sind sehr sicher noch Spermien zu erwarten. Jedoch liegen sie aufgrund der Drainage in geringerer Anzahl vor und sind schlechter auffindbar. Dies gleicht die Zentrifugationsmethode zur Abtrennung der die Auswertung erschwerenden

Epithelien aus. Ein Abgleich mit dem SP-Nachweis ist nicht möglich, da wir ihn nicht regelhaft durchgeführt haben.

Morrison veröffentlichte 1972 weniger unter forensischen als gynäkologischen Gesichtspunkten eine Untersuchungsreihe unter Mitwirkung von 104 Patientinnen einer britischen Klinik [55]. In insgesamt 178 Fällen wurden u. a. Abstriche aus Cervix uteri und Vagina erstellt. In 104 (entsprechend 58,4 %) aller Fälle wurden Spermien detektiert; hierbei zum überwiegenden Anteil in der Cervix. Als zeitliches Optimum für die Nachweisbarkeit von Spermien wurde ein Intervall bis 48 Stunden angegeben, wobei der intravaginale Spermiennachweis insgesamt bis neun Tage postkoital gelang (keine Nennung von Fallzahlen), der cervicale bis 12 Tage (Einzelfall). Regelhaft gelang ab einem postkoitalen Intervall von 10 Tagen kein Spermiennachweis mehr. Die Fingerlingmethode ist hier alle Präparate berücksichtigend mit einer Detektionsrate von 85,3 % deutlich überlegen. Insgesamt vermögen wir aufgrund der vergleichsweise geringen Probenanzahl pro Zeitintervall keinen klaren Zeitpunkt als Optimum für die Spurensicherung zu benennen. Es wurden in nahezu allen Präparaten auch deutlich längerer postkoitaler Intervalle (bis 66 Stunden) Spermien detektiert. Man beachte, dass der Fingerling den Cervikalkanal im Spurensicherungsprozess nicht mit abdeckt. Nach Angaben von Morrison wurden bei Cervicalabstrich noch bei deutlich längerem postkoitalem Intervall Spermien nachgewiesen als bei vaginalem Abstrich, bzgl. dessen die Maximalnachweisdauer bei neun Tagen benannt wurde. [55] Fingerlinge mit vergleichbarem postkoitalem Intervall wurden nicht regelhaft angefertigt. Der Nachweis bis mindestens drei Tage war jedoch sicher erbracht, sodass auch bei deutlich längerer zeitlicher Verzögerung zwischen Koitus und Spurensicherung spermienpositive Ergebnisse zu erwarten sind.

Besonderes Augenmerk legten die Autoren auf die Korrelation zum Menstruationszyklus, wobei man zu der Feststellung gelangte, dass ein prolongiertes Verbleiben von Spermien im weiblichen Genitale durch die erste Zyklushälfte begünstigt wird [55]. An späterer Stelle des Kapitels sind probandinnenbezogene Fakten berücksichtigt.

Eungprabanth berichtete 1974 über seine Untersuchungsreihe hinsichtlich der maximalen Nachweisdauer von Spermien. Es wurden sowohl Spuren aus

Sexualdeliktsfällen als auch Vaginalabstriche von Regelpatientinnen berücksichtigt; die Spurensicherung erfolgte im hinteren Scheidengewölbe. [22] Das Maximalintervall spermienpositiver Befundung lag bei sieben Tagen. Insgesamt wies Eungprabanth bei einer Gesamtpräparatzahl von n=55 bei den 40 Spuren mit postkoitalem Intervall von 24 Stunden überwiegend massenhaft, ab 32 Stunden bis sechs Tagen jeweils nur noch vereinzelt Spermien in den Lichtmikroskopiepräparaten nach. Ein Präparat aus einer Spur, gesichert 36 Stunden nach Koitus, konnte massenhaft Spermien aufweisen. Die maximale Nachweisdauer betrug als Einzelfall zehn Tage (eines von drei entsprechend vorliegenden Präparaten). [22] Wie beschrieben wies der Fingerling gesichert und in ausreichender Zahl bis drei Tage Spermien auf. Alle Präparate der postkoitalen Intervalle bis 24 Stunden berücksichtigend (also einschliesslich derer vor Methodenoptimierung), lagen Spermien überwiegend d.h. in der Hälfte der Fälle vereinzelt vor; die verbleibende Hälfte der Fälle zeigt neben wenigen Präparaten, bei denen der Spermiennachweis misslang, in gleich vielen Fällen mittelgradig guten bis massenhaften Spermiennachweis. Nach Methodenoptimierung erfolgt der Spermiennachweis überwiegend mittelgradig gut. Alle höherintervalligen Präparate vor und nach Methodenoptimierung ab 24 Stunden zeigten überwiegend vereinzelt und in etwas weniger Fällen keinen Spermiennachweis. Bzgl. der Häufigkeit mittelgradig gut Spermien nachweisender Präparate ergab sich auch bei ausgereifter Methode keine Änderung. Die Zahl der Präparate jedoch, die keinerlei Spermiennachweis erbrachten, reduzierte sich jedoch sehr massiv.

Davies und Wilson [15] beschrieben 1974, bis zu einem postkoitalen Intervall von 30 Stunden keinen, bis 48 Stunden nur wenige negative Befunde erhoben zu haben (16%). Bei bis 72 Stunden postkoital gesicherten Spuren war die Ausfallquote 33%. Hier läge eigentlich der Vergleich mit den Vergleichsfingerlingen *Abstrich 3* nahe, jedoch umfassen diese ausschliesslich das Intervall von rund 66 Stunden, die Proben bei Davies und Wilson schließen jedoch auch die niedrigeren postkoitalen Intervalle ein mit entsprechend höheren Nachweisquoten. Ein Vergleich kann daher nicht angestrengt werden. Maximale Nachweisdauer bei Davies und Wilson war 144 Stunden, bzgl. der Fingerlingmethode liegen hier keine Daten vor, da diese Intervalle nicht mehr

berücksichtigt wurden. In allen Proben der höherintervallig gesicherten Spuren (i. e. ab 90 Stunden) waren bei Davies und Wilson die Spermien äusserst schwierig zu identifizieren. Ab 96 Stunden waren in der Regel 50% der Präparate negativ zu befunden. Die Gesamtfallzahl war aus den Angaben nicht ersichtlich. [15] Man vergleiche erneut mit den durch die Fingerlingabstriche abgedeckten Maximalintervalle von 66 Stunden und die nach Optimierung der Präprozessierung erreichte sehr gute Darstellbarkeit der Spermien im Mikroskopiepräparat. Bei optimierter Methode wurden bis 50 Stunden postkoital keine negativen Befunde erhoben. Darüberhinaus erfolgten keine regelhaften Untersuchungen, sodass hier erneut die Vergleichsmöglichkeit fehlt.

Willott und Allard veröffentlichten 1982 eine umfassende Studie unter Berücksichtigung einer sehr grossen Anzahl von Sexualdeliktsskizzen. [95] Insgesamt wurden 2410 Abstriche untersucht, darunter auch rectal und oral gesicherte Spuren. Bzgl. der intravaginal erstellten Abstriche betrug das Maximalintervall für positiven Spermienachweis 120 Stunden. [95] Unsere Studie bietet hier keine Daten für das genannte Zeitintervall.

Begeisselte Spermien waren bei Willott und Allard auffindbar bis zu 26 Stunden nach GV. Im Abgleich mit den Fingerlingabstrichen wird nun ein Vorteil deutlich – hier gelang der Nachweis begeisselter Spermien auf den in Eigenregie erstellten Abstrichen bis 50 Stunden. Insgesamt wurde die Nachweisrate intakter Spermien bei 24-stündigem postkoitalem Intervall bei Willott und Allard mit 58% angegeben. Der Vergleich mit den Vergleichsfingerlingen *Abstrich 1* ergibt für diesen eine Nachweisrate von etwas mehr als 90% (10 von 11 spermienpositiv).

Randall beschrieb 1986 eine breit angelegte Untersuchungsreihe mit insgesamt 542 Abstricherhebungen (untersucherabhängig vaginal, endo- oder cervical). [71] Abgedeckt wurden postkoitale Intervalle bis maximal 5 Tage, wobei bei maximal 5 Tagen in 18% dieser Fälle Spermien nachweisbar waren. Die Detektionsrate bei 12 bis 24-stündigem postkoitalem Intervall lag nach Randall bei 25% (vergleiche die Fingerlinge *Abstrich 1* mit 90 % und vier in Eigenregie erstellte Abstriche vergleichbaren Intervalls mit 100 %); bei 60 bis 72-stündigem Intervall bei 12% (vergleiche die Fingerlinge *Abstrich 3* mit 66%). Die Fingerlingmethode kann also als überlegen bezeichnet werden.

1997 berichtete Allard über den Aufbau einer Datenbank unter Berücksichtigung einer sehr grossen Anzahl von Sexualdeliktsfällen. [1] Neben vaginalen (nicht cervicalen) wurden auch anale und orale Abstriche in Augenschein genommen. Die Maximalnachweisdauer von Spermien im vaginalen Abstrich lag bei 168 Stunden, wobei nur noch sehr wenige Spermien detektiert werden konnten (zu diesem Zeitraum liegen bzgl. der Fingerlingspuren keine Daten vor). Begeisselte Spermien konnten bis 120 Stunden postkoital gesichtet werden (bzgl. des Fingerlings wurden ebenfalls keine Daten in diesem Zeitraum erhoben). Bei zuvor überwiegend hoher Spermatozytenzahl stieg der Anteil der Präparate mit nur vereinzelt vorkommenden Spermien ab einem postkoitalen Intervall von 19 bis 24 und dann erneut bei 37 bis 48 Stunden rasant an (29 bzw. 59%) [1]; vergleiche hierzu Schaubilder 4c und 5 in Kapitel 3. Hier lag der Zeitpunkt der ersten deutlichen Dezimierung wie zu erwarten in den ersten Stunden (erste Drainage der initial massiv hohen Spermienzahl) und dann erneut bei einem Zeitintervall von 25 bis 33 Stunden. Im Vergleich zu Allard liegt hier also eine Vorverlagerung um 12 bis 13 Stunden vor; ein schlüssiger Vergleich ist jedoch aufgrund der geringen Fingerlingzahl nicht möglich.

2005 erfolgte durch Delfin et al. die Auswertung von 26 Realfällen unter der Besonderheit, dass die Betroffenen Kinder waren [17]. Schwerpunkt war die DNA-Sequenzierung mittels Y-STR, es erfolgte jedoch auch die lichtmikroskopische Durchmusterung der zugehörigen Ausstriche. Bzgl. 15 untersuchter Präparate, vaginal oder anal entnommen (nicht weiter spezifiziert) waren 4 spermienpositiv, davon eines von einem männlichen Opfer also mutmaßlich anal entnommen. Dies entspricht einer Nachweisrate von 26,67%. Das postkoitale Intervall war in jedem Falle genau angegeben; in den positiven Fällen lag jenes bei min. 21, max. 30 Stunden. Das maximale untersuchte Intervall betrug 51 Stunden. Angaben zur Frage ob eine Ejakulation stattgefunden hatte, lagen bzgl. jedes Präparates vor (bzgl. der spermienpositiven Proben war in 3 von 4 Fällen vom Opfer eine Ejakulation berichtete worden). Abgesehen von einer günstigeren Nachweisrate ist in diesem speziellen Fall des kindlichen Missbrauchs auch zu überlegen, ob die Spurenentnahme mittels eines Fingerlinges schonender sein kann als die Verwendung von herkömmlichen Spurentägern. Alternativ kann zumindest durch

ein jugendliches Opfer die Spurensicherung damit selbst mit zufriedenstellender Präparatqualität erfolgen; bei einem Kind ist dies anzuzweifeln.

Eine sehr ähnlich angelegte Studie wie die letztgenannte dokumentierte 2011 durch Maiquilla et al. eine lichtmikroskopische Spermiennachweisrate von 15 % in der Untersuchung von Realfällen mit Fallzahl  $n=154$  [49]. Als maximales postkoitales Intervall wurden hier 72 Stunden angegeben; die meisten Probenentnahmen erfolgten jedoch innerhalb von 24 Stunden. Unsicherheitsfaktor ist hier aber die fehlende dezidierte Angabe bzgl. einer stattgehabten Ejakulation. Ein Vergleich zu unserer vorgelegten Studie erscheint uns also nicht möglich.

Auch Hammer et al. veröffentlichten 2006 eine Arbeit zur Nachweisbarkeit verschiedener Ejakulatbestandteile. [32] Verwendet wurden von Probandinnen bereitgestellte Spuren ( $n=20$ ). In der lichtmikroskopischen Durchmusterung konnte bis maximal, jedoch als Einzelfall, am fünften Tag post coitum noch ein Spermium gesichtet werden. Überwiegend waren bis zum dritten und vierten Tag, jedoch jeweils vereinzelt Spermien nachweisbar; massenhafter Nachweis gelang ausnahmslos am ersten Tag, eine deutliche Dezimierung fand bereits zwischen erstem und zweitem Tag statt. Wir sehen hier, dass der Fingerling als spurensicherndes Medium diesen recht aktuellen Untersuchungsergebnissen problemlos standhalten kann, nachdem in unserer Studie in den Zeiträumen von 24 bis 50 Stunden nach Methodenoptimierung in jedem Präparat massenhaft und auch leicht detektierbar Spermien identifiziert wurden.

Culhane et al. bezifferten 2008 die Spermiendetektionsrate bei zweitägigem Intervall post coitum mit 15,2% bei Probenzahl  $n=302$ . [13] Hierzu lagen uns sieben Proben mit postkoitalen Intervallen von 45 bis 51 Stunden vor; sechs davon zeigten Spermien auf, davon drei bei noch nicht optimierter Methode vereinzelt, drei reichlich. Die Detektionsrate wäre hiermit bei insgesamt 85,57 % deutlich verbessert.

In einer retrospektiven Studie evaluierten Evers et al. 2009 eine große Probenzahl  $n=786$ , entnommen im Rahmen von Realfällen ( $n=226$ ); abgestrichene Lokalisationen waren hier überwiegend das innere weibliche Genitale, aber auch

Textilien, äußeres Genitale sowie anale und orale Cavität [24]. Angaben zum postkoitalen Intervall waren nicht zu entnehmen. Der Anteil der eindeutig spermiennegativen aus 784 untersuchten Ausstrichen war mit 659 aus unserer Sicht außergewöhnlich hoch; dies entspricht einer Nachweisrate von 15,95% und ist damit deutlich unter der unseren. Zentrale Idee der Studie war jedoch, die Korrelation zwischen SP- und lichtmikroskopischem Nachweis von Sperma / Spermien .

2009 wurde durch Gingras et al eine grosse Zahl von Realfällen (n=1000) ausgewertet. [28] Die Proben umfassten jedoch auch Anal-, Oral- und Hautabstriche; die Begutachtung erfolgte nur unter dem Gesichtspunkt der DNA-Analytik, also Erhalt eines suffizienten Täterprofiles; die vorangehenden Nachweismethoden wurden nicht gewertet. Ein direkter Vergleich zu unseren Daten kann, da wir uns auf die Mikroskopie beschränkten, nicht gezogen werden. Bzgl. der Vaginalabstriche betrug der Anteil der Proben, welche ein qualitativ gutes DNA-Profil erbrachten, 35% bei eintägigem, 26% bei zweitägigem und 23% bei dreitägigem postkoitalem Intervall. Bei längeren Intervallen verschlechterten sich die Daten deutlich, es wurde jedoch auch einem Abstrich 100 Stunden postkoital noch ein hinreichendes Profil erhalten.

Eine retrospektive Studie unter Verwendung von Echtfällen durch Hellerud et al. 2010 konzentrierte sich überwiegend auf die Untersuchung der Unterwäsche der geschädigten Frauen, es erfolgte jedoch auch die Spurensicherung im Genitale identisch zu unserem Watteträgervorgehen [33]. Exakte zeitliche Intervalle wurden nicht angegeben, das mediane Intervall zwischen Spurenlegung und –sicherung betrug 12,4 Stunden. In 37% bei Fallzahl n=181 wurden lichtmikroskopisch Spermien detektiert, zu den Ausstrichen zählten jedoch auch solche, die aus Proben aus Unterwäsche erstellt wurden. Eine genaue Aufschlüsselung ist nicht berichtet, sodass kein direkter Vergleich erfolgen kann. 69% der spermienpositiven Proben entstammten Fällen mit weniger als 12-stündigem postkoitalem Intervall. Erwähnt ist ein Casus, in dem der mikroskopische Nachweis in Präparaten (cervicale und vaginale Entnahme) mit 96-stündigem postkoitalem Intervall gelang. Derlei Intervalle wurden durch uns nicht untersucht.

Durch Astrup et al. wurden 2012 ebenfalls Daten zur lichtmikroskopischen Detektierbarkeit von Spermien veröffentlicht [4]. Die Probenentnahme fand identisch zu den Watteträgerabstrichen unseres Vergleichsarms im äußeren Genitale, dem hinteren Scheidengewölbe und dem Cervicalkanal mit herkömmlichen Watteträgern statt. Die Studienpopulation umfasste 60 freiwillige Probandinnen. In 88% der insgesamt 32 Fälle mit angegebener Ejakulation konnten Spermatozyten gesehen werden (demnach etwas höher als unsere Detektionsrate von 85,3%) und auch in 14% der Fälle, bei denen bzgl. des untersuchten GV keine Ejakulation stattgefunden hatte. Ein direkter zeitbezogener Vergleich dieser mit unserer Studie ist nicht möglich da das postkoitale Intervall bei Astrup et al. nicht genauer beziffert wurde als „bis maximal 48 Stunden bis zur geplanten Untersuchung“. Das mittlere Zeitintervall lag bei 21 Stunden, minimal 1, maximal 96. Es wurde aber, wie auch bei uns, gesehen, dass die lichtmikroskopische Nachweisbarkeit von Spermien sinkt mit der zeitlichen Latenz zwischen Spurenlegung und –sicherung.

In einer weiteren 2014 von Smith et al. vorgelegten Studie Realfälle berücksichtigend wurden neben genitalen (vaginal, anal) Abstrichen Mundspülungen und Urinproben berücksichtigt [87]. Die Fallzahl betrug n= 100. Vaginale Abstriche wurden von den Labien, tief- und hochintravaginal, cervical sowie vom Perineum abgenommen und als in einer Gruppe subsummiert. Unterschieden wurde in eine möglichst zeitnahe frühe Spurensicherung, welche mittels einer Gaze-Wisch-Probenentnahme durchgeführt wurde, und eine spätere ausführliche Spurensicherung bestehend aus den oben genannten Abstrichen. Postkoitales Intervall bzgl. Ersterem war im Mittel 5,4, bzgl. Letzterem 14,4 Stunden. Einschränkend muß gesagt sein, dass in der überwiegenden Zahl der Fälle (n=50) nicht klar war ob eine Ejakulation stattgefunden hatte. In 27 Fällen wurde dies bejaht, in 57 negiert. Zusätzlich war in 5 Fällen sicher ein Kondom benutzt worden, in 57 nicht, in den verbleibenden Fällen war es unklar. Due unterschiedlichen Proben wurden nicht in jedem Fall gesichert. Bzgl. der berichteten vaginal-penilen Penerationen war in 57 Fällen die frühe Spurensicherung die Vulva betreffend erfolgt mit einer lichtmikroskopischen Spermidetektionsrate von 32%, in den frühen Urinproben (n= 63) zu 35 %. Die Spurensicherung beider Lokalisationen erbrachte eine Detektionsrate von 40%.

Bei Auswertung der späteren ausführlichen Spurensicherung konnte zu 45 % Spermien aufzeigen. Formal scheinen diese Zahlen den unseren somit unterlegen, wir können sie jedoch nicht zum Vergleich heranziehen aufgrund der oben genannten Einschränkungen (Ejakulation überhaupt erfolgt? Kondom benutzt?). Sehr interessanter Focus der Studie von Smith et al. unter Realbedingungen war die Evaluation, ob Urinproben herangezogen werden können (was der Fall ist) und die Sinnhaftigkeit der frühen, aber weniger ausführlichen Spurensicherung, die in abgelegenen ländlichen Gebieten ohne schnelle Verfügbarkeit einer rechtsmedizinischen oder gynäkologischen Untersuchung stattfinden kann (die Daten wurden in Australien erhoben, wo aufgrund der geographischen Weiträumigkeit der unmittelbare Zugang zu einer professionellen rechtsmedizinischen Untersuchung oftmals erschwert ist).

Sehr aktuelle Daten liegen nun durch Casey et al. mit einer Veröffentlichung 2016 vor [9]. Es wurde eine Vielzahl von Proben per lichtmikroskopischer Durchmusterung ausgewertet zur Fragestellung einer wahrscheinlichen Nachweisbarkeit von Spermien innerhalb welcher postkoitaler Intervalle. Ein weiterer Inhalt war der Ejakulatnachweis mittels der Sauren Phosphatase. Insgesamt war die Probenzahl mit N= 5581 sehr hoch, hiervon waren 3508 vaginale Ausstriche unterschiedlicher Lokalisation (endocervical, hoch-, mittel-, tief-vaginal, externes Genitale. Darüberhinaus wurden orale, anale Proben evaluiert. Alle genitalen Abstriche betrachtet, waren in einem postkoitalen Intervall bis 24 Stunden 34% spermienpositiv, im Intervall 24-48 Stunden 28%, im Intervall 48-72 Stunden 6%. Insgesamt wurden auf all diesen Proben bis 72 Stunden postkoital Spermien nachgewiesen in 31% der Fälle. Noch differenzierter untergliedert bedeutet dies: spermienpositiv waren 39% der Proben im postkoitalen Intervall bis 6 Stunden, 36% bei 6-12 Stunden, 35 % bei 12-18 Stunden, 26 % bei 18-24 Stunden, 28% bei 24-48 Stunden, 6% bei 48-72 Stunden, 6 % bei 72-96 Stunden. Die Fallzahlen pro postkoitalem Intervall waren durchweg hoch abgesehen von den über 96-stündigen Intervallen. Hier waren jedoch noch 2% der Präparate spermienpositiv. Das Auffinden von Spermien in Proben mit postkoitalen Intervallen länger als 72 Stunden wurde zusammenfassend als sehr unwahrscheinlich betitelt.

Wir weisen zunächst drauf hin, dass in unserer Studie sehr viel kleinere Fallzahlen pro Zeitintervall vorliegen, sodass ein valider Vergleich nicht erfolgen kann. Orientierend lässt sich aber festhalten: Zum Intervall bis 6 Stunden postkoital liegt uns lediglich ein Fingerling vor (2 Stunden postkoital), der reichlich Spermien aufwies. Das Intervall 6-12 Stunden bildet bei uns ebenfalls nur ein Präparat (9 Stunden postkoital) ab mit sehr gutem Spermienachweis; dies trifft auch auf das Intervall 12-18 Stunden zu (ein Fingerling 18 Stunden postkoital). Bzgl. des Intervalls 18-24 Stunden liegen uns die ärztlich gesicherten Fingerlinge vor (alle 24 +/- 4 Stunden), die zu 90 % spermienpositiv waren sowie 3 eigenständig gesicherte mit 100 % Spermienachweis. Die ärztlich gesicherten Präparate nicht weiter berücksichtigend, da zum 24 Stunden-Intervall gehörend, existieren zum Intervall 24-48 Stunden 6 Fingerlinge, durch die Probandinnen selbst erstellt, mit durchgehend lichtmikroskopischem Spermatozytenachweis. Zum postkoitalen Intervall 48 – 72 Stunden liegen uns vor: 5 Fingerlingproben die durch die Probandinnen selbst erstellt wurden mit einer Spermienachweisrate von 80% (1 aus 5 negativ) sowie die ärztlich gesicherten Fingerlinge der Abstrich 3 /xxx in einer Anzahl von insgesamt 8. 6 hiervon wurden der noch unausgereiften Zellfraktionstrennung mittels Spritzenvorsatzfolger unterzogen; 50 % der Fingerlinge zeigten Spermien. Von zweien die mittels der Zentrifugation der Zellfraktionstrennung zugeführt wurden, waren ebenfalls 50 % spermienpositiv. Wenn auch bedingt durchmischbar aufgrund der unterschiedlichen Prozessierung, war die Spermienachweisquote im genannten Zeitintervall bei insgesamt 13 Fingerlingen 61,54 %, was die Daten erhoben durch Casey et al. doch sehr deutlich übersteigt, zumal sich unsere zum Vergleich herangezogenen Fingerlinge doch überwiegend am oberen Ende des genannten Zeitintervalles bewegen. Zum Zeitintervall 72-96 Stunden liegen uns ein durch eine Probandin gesicherte Fingerling zum postkoitalen Zeitpunkt 96 Stunden vor, auf dem keine Spermien gesichert werden konnten.

Bei wie schon vorgebracht sehr begrenzter Vergleichbarkeit aufgrund der sehr unterschiedlichen Probenanzahl kann anhand der vorlegten Zahlen aus unserer Studie zumindest vermutet werden, dass die Fingerlingmethode dazu geeignet ist, Spermien mit höherer Wahrscheinlichkeit zu sichern als mit herkömmlichen punktuellen Abstrichmethoden.

Die Spermiedetektionsrate in einem postkoitalen Gesamtintervall bis 24 Stunden lag in unserer Studie bei 90% im Falle der ärztlich gesicherten Vergleichspräparate, bei 100% im Falle der eigenständig getätigten Abstriche bei jedoch geringer Probenzahl von 4.

Es wurde ferner eine differenzierte Untergliederung die intravaginalen Areale betreffend aufgestellt, die für den Vergleich mit dem Fingerling aufgrund seines flächenhaften Spurensicherungskonzeptes nicht herangezogen werden kann.

In allen Fällen muss hier berücksichtigt werden: Das individuelle Verhalten nach der Spurenlegung differiert stark. Abhängig vom Ausmaß der körperlichen Aktivität wird der Drainageeffekt geringer oder stärker ausgeprägt sein. Somit entsteht sowohl in wissenschaftlichen Studien als auch in der realen Fallkasuistik ein nicht korrigierbarer Fehler. Vergleiche jedoch bspw. mit der 2001 veröffentlichten Untersuchung von Collins und Bennett, die sich mit der Spermienachweisdauer in Leichen befasst. [12] 199 Fälle von Leichenfunden wurden herangezogen, von denen 107 vaginal, rectal oder oral Spermien aufwiesen. Bis maximal 120 Stunden post mortem wurden intravaginal intakte Spermien, bis maximal 168 Stunden post mortem intakte Spermien und Spermienköpfe gefunden. Spermienköpfe konnten in einem Einzelfall noch über zwei Monate post mortem in einer begrabenen Frau nachgewiesen werden. Durchschnittlich lagen die entsprechenden postmortalen Intervalle bei intravaginaler Spurensicherung bei 23 Stunden, was im Vergleich zu den o.g. Veröffentlichungen keine wesentliche Verlängerung der Nachweiszeiten darstellt. Der Zeitpunkt der Spurenlegung war jedoch jeweils unbekannt und muss nicht mit dem Todeszeitpunkt übereinstimmen. Eine weitere Erklärung für die als länger angenommenen Nachweisintervalle wären auch postmortale Verwesungsprozesse.

Ein Vergleich der o.g. Studien zeigt auch, dass im Verlauf der Jahrzehnte trotz grosser Fortschritte in der Forschung keine deutliche Ausweitung der maximalen Nachweisdauer stattfand.

Aktuellere Literatur als die aufgeführte liegt unseres Wissens derzeit nicht vor.

### Korrelation zu probandinnenbezogenen Fakten

Im Vergleichsarm lagen uns Angaben zum Zyklus der Studienteilnehmerinnen und zur Verhütungsmethode vor; ausserdem wurden durch die ärztlichen Mitarbeiter Beschaffenheit des Vaginalsekrets und anatomische Besonderheiten festgestellt und dokumentiert.

In der Literatur wird angegeben, dass Verkehr und Spurensicherung in der ersten Zyklushälfte eine erhöhte Spermienausbeute erbringen können (Morrison; 81). Im Vergleichsarm wurden sieben Fingerlingspuren in der ersten Zyklushälfte gesichert. (**F3/003**, **F3/006**, **F1/011**, **F1/013**, **F3/014**, **F1/015**, **F1/018**); im Methodenarm wurde der Menstruationszyklus nicht dokumentiert.

Ein Vergleich all dieser Spuren mit den restlichen fällt sehr schwer aufgrund verschiedener Verarbeitungsmethoden. Eine Probenzahl von n=7 ist nicht repräsentativ, sodass wir hier nur einen groben Vergleich anstellten. Insgesamt fiel nicht auf, dass diese Fingerlinge eine deutlich verbesserte Spermienausbeute erbrachten.

Vier Frauen verhüteten kontinuierlich mit der Pille, eine weitere setzte im Studienverlauf die Pille ab und wurde schwanger (**F3/010**). Der hier erhaltene Fingerling erbrachte sowohl in der ersten als auch in der zweiten Auswaschung (mit Seifenzugabe) keinerlei Spermienachweis. Ob die Nachweisbarkeit von Spermien in Zusammenhang mit einer bereits bestehenden Schwangerschaft steht, ist unklar. Das Ergebnis der Spurensicherung wäre jedoch andererseits ohne Weiteres durch das postkoitale Intervall von rund 66 Stunden erklärlich.

Eine Studienteilnehmerin war Spiralen­trägerin (Hormonspirale). Die ihr zugeordneten Fingerlinge waren **F1/007** und **F3/007**. Die Spirale hemmt die Spermienmotilität und erschwert durch eine Zunahme der Sekretviskosität im Gebärmutterhals das Vorankommen der Spermien. Bei zäherem Sekret sollte man ein geringeres Ausspülen der Spermien annehmen; auch blockiert der verdickte Schleim den Spermien den Zugang zur Gebärmutter. Die Vermutung, dass daher mehr Spermien auffindbar sein sollten, wurde durch die zwei Präparate nicht bestätigt. F1/007 zeigte ausreichend Spermien, jedoch nicht deutlich ausgeprägter als andere Präparate. F3/007 war spermienfrei.

Eine Probandin verhütete mit einem Vaginalverhütungsring (**F3/003, F1/004, F3/004**). Auf hormoneller Ebene basiert er auf dem Prinzip der Pille. Dementsprechend erwarteten wir hier keine Besonderheiten. Jedoch fällt auf, dass alle Fingerlinge spermienfrei waren.

Eine Studienteilnehmerin verhütete nicht. (**F1/009, F3/009**). F1/009 zeigte eine sehr gute Spermienzahl, F3/009 konnte kaum Spermien nachweisen. Dies kann leicht durch das Spurensicherungsintervall von rund 24 bzw. 66 Stunden erklärt werden.

Die Beschaffenheit des Vaginalsekrets wurde nicht durchgehend dokumentiert. Von den vorliegenden Stellungnahmen der Untersucher hierzu wurde das Vaginalsekret in neun Fällen als wenig viskös, in zwei Fällen als mittelgradig viskös und in vier Fällen als zäh oder eher zäh bezeichnet (**F 3/006, F1/010, F3/010, F3/014**). F3/006 und F3/014 zeigten eine hohe Spermienzahl, F1/010 ebenfalls eine gute Spermienausbeute. F3/010 hingegen war in unseren Untersuchungen durchgehend spermienfrei. Es zeigt sich als eine erwartete Tendenz, dass bei zähem Scheidensekret durch geringeren Drainageeffekt mehr Spermien in der Vagina verbleiben. Bei der Spurensicherung **F3/009** wurde das Scheidensekret als äusserst zäh angegeben. Hier jedoch war die Spermienausbeute allenfalls gering.

Bei einer Studienteilnehmerin wurde eine Rectozele festgestellt (**F 1/009, F3/009**) bei einer weiteren eine Portioektomie (**F1/018, F3/018**).

#### Ausblick

Bezüglich der Anwendung und Handhabung des Baumwollfingerlings als Instrument der intravaginalen Spurensicherung besteht noch weiterer Forschungsbedarf:

Nachdem der Baumwollfingerling in gut ausreichender Anzahl von Testpräparaten Spermien bis 66 Stunden postkoital nachweisen konnte, wäre die Maximalnachweisdauer von Interesse: **Bis zu welchem maximalen postkoitalen Intervall vermag der Fingerling Spermien aus der Vaginalkavität zu sichern?** Aufgrund des grossflächigen Abstrichverhaltens liegt die Vermutung nahe, dass

durch diese Methode Spermien weit länger als bisher nachweisbar sind, was durch eine entsprechende Versuchsreihe mit Fingerlingabstrichen noch längerer postkoitaler Intervalle beleuchtet werden könnte.

Wir stellten fest, dass bei zweimaligem Auswaschen auch beim zweiten Mal Spermien gesichert werden konnten, teilweise lag hier ein deutlich günstigeres Verhältnis von Vaginalepithelien zu Spermien vor. Dies wäre dadurch erklärlich, dass beim ersten seifenfreien Auswaschgang die Epithelien grösstenteils abgewaschen werden, sodass beim zweiten Auswaschen die verbleibenden Spermien in der Auswaschlösung befindlich sind. **Kann ein System zweier Auswaschungen die Spermienausbeute unter deutlicher Reduktion der Vaginalepithelien reproduzierbar verbessern?**

Für unsere Zwecke war die Verwendung der aus dem Zentrifugationsprozess entstehenden Pellets zweckmässig. Wir stellten jedoch auch fest, dass im Rahmen der Filtrationsmethodik Spermien gesichert werden können. Dies geschah jedoch nicht wie ursprünglich angenommen durch Passage der Spermien über die Filterporen in das Filtrat, sondern durch ein Auffangen auf demselben. Bei einem geringen Anteil der weiblichen Fraktion wäre eine Verwendung des Filters mit dem nun darauf konzentrierten Anteil an Spermien denkbar. **Ist der Filter mit den darauf befindlichen Spermien in die differentielle Lyse einsetzbar und somit ähnlich wie die etablierten Wattetupfer in die Laborroutine integrierbar? Wie kann hier u. U. im Vorfeld der Anteil der weiblichen Zellfraktion reduziert werden?** Denkbar wäre hier z. B. eine Doppelfiltration unter Berücksichtigung der Größeneigenschaften der verschiedenen Zellen – zunächst die Filtration über einen großporigen Filter zum Separieren der weiblichen Fraktion, dann über einen kleinporigen, um die Spermien auf kleinem Raum zu sammeln. (Vgl. [10; 26]) Auch eine weitere Evaluation der unter Kap. 3.2.7 beschriebenen Kombinationsmethodik, die Zentrifugation und Filtration beinhaltet, ist sinnvoll.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, einen alternativen Spureträger für die Spurensicherung im weiblichen Genitale nach angegebenem Sexualdelikt hinsichtlich seiner Funktionalität zu evaluieren. Wir entschieden uns unter dem Aspekt der grösstmöglichen Opferschonung für den Baumwollfingerling, der einfach anwendbar ist und somit ggf. auch die Spurensicherung durch das Opfer selbst möglich macht. Hierdurch kann eine Spurensicherung zur weiteren Strafverfolgung des Spurenlegers auch dann gelingen, wenn die Geschädigte eine körperliche Untersuchung ablehnt. Die Handhabung für Untersucher und Geschädigte ist einfach umsetzbar und bietet daher wenig Raum für untersucherbedingte Fehler. Die Vaginalantragung wird nicht wie mit der herkömmlichen Methode punktuell, sondern flächenhaft gesichert und bietet daher insbesondere bei verlängertem postkoitalem Intervall eine gute Spermienausbeute. Durch die faltbare stabile Kartonbox kann er ohne erhöhtes Risiko von bakteriellem oder fungalem Wachstum sicher transportiert und falls vonnöten längere Zeit gelagert werden.

Eine Herausforderung war die Integration des Fingerlings in den Laboralltag, da sowohl das Ablösen der Spur vom Spureträger als auch die weitere Bearbeitung der Spur nach herkömmlicher Methodik nicht möglich ist.

Durch Schüttelinkubation der Fingerlingsspur mit Natriumchlorid unter Seifenzusatz kann die Spur hervorragend abgelöst werden. Dennoch verbleibt aufgrund der Grösse des Spureträgers auf diesem noch genügend Material für weitere Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt. Es deutete sich an, dass eine Doppelinkubation zunächst ohne, beim zweiten mal mit Detergentienzusatz dazu geeignet ist, bereits grob die männliche von der weiblichen Zellfraktion zu trennen, da die Spermien stärker am Spureträger zu haften scheinen.

Die initial angewandte Trennung der Zellfraktionen durch Filtration scheiterte durch fehlende Praktikabilität der Methode sowie fehlende Trennung, da die Spermien trotz adäquater Porengrösse des Filters an diesem haften blieben, nachdem der Filter durch die wesentlich grösseren Epithelzellen verlegt wurden.

Sedimentationsversuche mit simplem Stehenlassen des Inkubationsansatzes zeigten bereits eine gute Trennung der Fraktionen aufgrund deren unterschiedlicher Sedimentationseigenschaften mit Absiedelung der Epithelien auf

dem Gefässboden und Verbleiben der Spermien im Überstand. Darauf basierend evaluierten wir die Abtrennung der Spermien von der Epithelzellfraktion durch Zentrifugation, was sich als reproduzierbar erfolgreich herausstellte. Die Verarbeitungsmethodik ist verlässlich kontaminationsfrei in den Laboralltag zu integrieren. Hier sticht eine deutliche Kostenersparnis im Vergleich zu anderen Methoden ins Auge, da nicht nur das Spurensicherungsmaterial kostengünstig ist, sondern auch kein spezielles Instrumentarium wie bspw. bei der Lasermikrodissektion vorgehalten werden muss. Die Abtrennung der Spermien vom Spurenräger und das Separieren der Spermienfraktion von den weiteren Bestandteilen der gesicherten Mischspur gelingen durch den Zentrifugationsprozess sicher und wiederholbar. Somit sind die Spermien, falls vorhanden, auf dem Mikroskopiepräparat deutlich einfacher und dadurch mit erheblicher Zeitersparnis detektierbar.

Der Baumwollfingerling ist ein geeignetes Instrument zur Spurensicherung nach angegebenem Sexualdelikt. Seine Anwendung kann unter dem Gesichtspunkt der grösstmöglichen Schonung der Geschädigten stattfinden. Der Baumwollfingerling ist in der Lage, in hohem Maße Spermien aus der Vaginalkavität sichern; diese werden durch unsere Untersuchungen bis zu einem Intervall von 66 Stunden zwischen Spurenlegung und –sicherung nachgewiesen. Bei derartigen Zeitintervallen kann unter Umständen nur aufgrund der Nutzung des Fingerlings mit seinen langen Nachweiszeiten die Strafverfolgung möglich sein oder überhaupt nachgewiesen werden, dass ein Sexualkontakt stattgefunden hat.

Darüberhinaus zeigt diese Studie, dass unter Verwendung des Fingerlings nach erstmaliger Verarbeitung auch eine Zweitextraktion möglich ist. Auch eine zweite Auswaschung erbringt noch Präparate mit Spermiennachweis. Im Gegensatz zum herkömmlichen Spurenräger, der nach Verarbeitung unwiederbringlich verloren ist, stellt dies einen enormen Vorteil dar. Der Fingerling kann aufbewahrt und im Falle zu einem späteren Zeitpunkt aufkommender Fragen erneut untersucht werden.

Cave: Die umfassend flächenhafte Spurensicherung und dadurch die Möglichkeit, auch bei langem postkoitalem Intervall noch Spermien nachzuweisen, kann dazu führen, dass auch Spuren nachgewiesen werden, die noch vor dem Zeitpunkt des angegebenen Sexualdelikts verursacht wurden. Dadurch könnten im Weiteren

Desoxyribonucleinsäure - Profile unterschiedlicher Spurenleger zur Darstellung kommen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Allard JE. The collection of data from findings in cases of sexual assault and the significance of spermatozoa on vaginal, anal and oral swabs. *Science & Justice* 37: 99 - 108 (1997)
2. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci* 46: 349-351 (2001)
3. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Rapid detection of sperm: comparison of two methods. *J Clin Forensic Med* 10: 5 – 7 (2003)
4. Astrup BS, Thomsen JL, Lauritsen J, Ravn P. Detection of spermatozoa following consensual sexual intercourse. *Forensic Sci Int* 221: 137 – 141 (2012)
5. Benschop CCG et al. Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic Sci Int Genet* 2009, doi: 10.1016/j.fsigen.2009.07.003
6. Bjartell A, Malm J, Moller C, Gunnarsson M, Lundwell A, Lilja H. Distribution and tissue expression of semenogelin I and II in man as demonstrated by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Androl* 17: 17 – 26 (1997)
7. Brinkmann, B. Forensische DNA-Analytik, *Dtsch Arztebl* 101: A 2329 – 2334 (2004)
8. Brück S, Evers H, Heidorn F, Müller U, Kilper R, Verhoff MA. Single cells for Forensic DNA Analysis – From Evidence Material to Test tube. *J Forensic Sci* 56, 176 – 180 (2011)
9. Casey DG, Domijan K, MacNeill S, Rizet D, O`Connell D, Ryan J. The Persistence of Sperm and the Development of Time Since Intercourse (TSI) Guidelines in Sexual Assault Cases at Forensic Science Ireland, Dublin, Ireland. *J Forensic Sci*, Wiley Online Library (2016)
10. Chen J, Kobilinsky L, Wolosin D, Shaler R, Baum H. A physical method for separating spermatozoa from epithelial cells in sexual assault evidence. *J Forensic Sci* 43: 114 – 118 (1998)
11. Christoffersen S. Immunohistochemical staining of human sperm cells in smears from sexual assault cases. *Int J legal Med* 125: 887 – 890 (2011)
12. Collins KA, Bennett AT. Persistence of spermatozoa and prostatic acid phosphatase in specimens from deceased individuals during varied post-mortem intervals. *Am J Forensic Med Pathol* 22: 228 – 232 (2001)

13. Culhane JF, Nyirjesy P, McCollum K, Casabellata G, Di Santolo M, Cauci S. Evaluation of semen detection in vaginal secretions: comparison of four methods. *Am J Reprod Immunol* 60: 274 – 281 (2008)
14. Curran S, McKay JA, McLeod HL, Murray GI. Laser capture microscopy. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 64 – 68 (2000)
15. Davies A, Wilson E. The persistence of seminal constituents in the human vagina. *Forensic Sci* 3: 45 – 55 (1974)
16. Davies A. Evaluation of results from tests performed on vaginal, anal and oral swabs received in casework. *J Forens Sci Soc* 17: 127 – 133 (1977)
17. Delfin FC, Madrid BJ, Tan MP, De Ungria MCA. Y-STR analysis for detection and objective information of child sexual abuse. *Int J Legal Med* 11: 158 – 163 (2005)
18. Diamandis EP, Yu H. Nonprostatic sources of Prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am* 24: 275 – 282 (1997)
19. Eisenberg AJ. Development of a spermatozoa capture system for the differential extraction of sexual assault evidence. Paper presented at: Profiling PCR and beyond Conference, 2002; Washington DC, USA
20. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science* 274: 998 – 1001 (1996)
21. Enos WF, Beyer JC, Mann GT. The Medical Examination of Cases of Rape. *J Forensic Sci.* 17, 50-56 (1972)
22. Eungprabanth V. Finding of the spermatozoa in the vagina related to elapsed time of coitus. *Z. Rechtsmedizin* 74: 301 – 304 (1974)
23. Evans RS, Herr J. Immunohistochemical localization of the MHS-5 antigen in principal cells of human seminal vesicle epithelium. *Anat Rec* 214: 372-377 (1986)
24. Evers H, Heidorn F, Gruber C, Lasczkowski G, Riße M, Dettmeyer R, Verhoff MA. Investigative strategy for the forensic detection of sperm traces. *Forensic Sci Med Pathol* 5: 182 – 188 (2009)
25. Gaensslen RE. Sourcebook in forensic serology, immunology and biochemistry. US Department of Justice, National Institute of Justice, Washington S. 149 – 181 (1983)
26. Garvin AM. Filtration based DNA preparation for sexual assault cases. *J Forensic Sci* 48: 1084 – 1087 (2003)
27. Gill P, Jeffreys A, Werrett D. Forensic application of DNA “fingerprints”. *Nature* 318: 577 – 579 (1985)

28. Gingras F, Paquet C, Bazinet M, Granger D, Marcoux-Legault K, Fiorillo M, Ségiun D, Baltzer F, Chamberland C, Jolicoeur Ch. Biological and DNA evidence in 1000 sexual assault cases. *Forensic Sci Int: Genet Supple Ser 2*: 138 – 140 (2009)
29. Goldberg E. Isozymes in testes and spermatozoa. *Isozymes. Curr Top Biol Res 1*: 79 – 124 (1977)
30. Graves HC, Sensabaugh GF, Blake ET. Postcoital detection in a male-specific semen protein. Application to the investigation of rape. *N Engl J Med 312*: 338 – 343 (1985)
31. Haimovici F, Anderson DJ. Detection of semen in cervicovaginal secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 8*: 238 – 238 (1995)
32. Hammer K, Rauch E, Anslinger K. Nachweisdauer der verschiedenen Samenflüssigkeitsbestandteile in Vaginalabstrichen post coitum. *Rechtsmedizin 16*: 313 – 316 (2006)
33. Hellerud BB, Bouzga M, Hoff-Olsen P, Mevag B. Semen detection: A retrospective overview from 2010. *Forensic Sci Int: Genet Supple Ser 3*: 391 – 392 (2011)
34. Herr J, Woodward MP. An ELISA assay for human semen identification based on a biotinylated monoclonal antibody to a seminal vesicle – specific antigen. *J Forensic Sci 32*: 346-356 (1987)
35. Hochmeister M, Rudin O, Meier R, Pecciolo M, Borer U, Eisenberg A, Nagy R, Dirnhofer R. Eine faltbare Kartonbox zur Trocknung und Aufbewahrung von mittels Wattetupfern gesicherten biologischen Spuren. *Archiv für Kriminologie, 200. Band, 113 – 120 (1997)*
36. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, Gehrig C, Borer U, Thali M, Dirnhofer R. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test arrays for the forensic identification of seminal fluid. *J Forensic Sci 44*: 1057 – 1060 (1999)
37. Horsman KM, Barker SLR, Ferrance JP, Forrest KA, Koen KA, Landers JP. Separation of sperm and epithelial cells in a microfabricated device: potential application to forensic analysis of sexual assault evidence. *Anal Chem 77*: 742 – 749 (2005)
38. Horsman KM, Bienvenue JM, Blasier KR, Landers JP. Forensic DNA Analysis in microfluidic devices: a review. *J Forensic Sci 52*: 784 – 799 (2007)
39. Kamenev L, Leclercq M, Francois-Gerard C. An enzyme immunoassay for prostate-specific p30 antigen detection in the postcoital vaginal tract. *J For Sci Soc 29*: 233 – 241 (1989)

40. Landeskriminalamt Baden-Württemberg, Kriminaltechnisches Institut FG 63 (Mai 2010): Merkblatt zur ärztlichen Untersuchung nach Sexualdelikten (KTI 690D308)
41. Lawson ML, Macaluso M, Bloom A, Hortin G, Hammond KR, Blackwell R. Objective markers of condom failure. *Sex Transm Dis* 25: 427 – 432 (1998)
42. Li TS, Beling CG. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril* 24: 143 – 144 (1973)
43. Lundwall A, Bjartell A, Olsson AY, Malm J. Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in non-genital tissues. *Mol Human Reprod* 8: 805 – 810 (2002)
44. Macaluso M, Lawson L, Akers R, Valappil T, Hammond K, Blackwell R, Hortin G. Prostate-specific antigen in vaginal fluid as a biologic marker of condom failure. *Contraception* 59: 195 – 201 (1999)
45. Madea, Burkhard: *Praxis Rechtsmedizin*. 2. aktualisierte Auflage, Springer Medizin-Verlag, Heidelberg, S. 259, 2007
46. Madea, Burkhard: *Praxis Rechtsmedizin*. 2. aktualisierte Auflage, Springer Medizin-Verlag, Heidelberg, S. 260 – 264, 2007
47. Madea, Burkhard: *Praxis Rechtsmedizin*. 2. aktualisierte Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 505 - 506, 2007
48. Madea, Burkhard: *Praxis Rechtsmedizin*. 2. aktualisierte Auflage, Springer Medizin-Verlag, Heidelberg, S. 513, 2007
49. Maiquilla SMB, Salvador JM, Calacal GC, Sagum MS, Dalet MRM, Delfin FC, Tabbada KA, Franco SAEL, Perdigon HB, Madrid BJ, Tan MP, De Ungria MCA. Y-STR DNA analysis of 154 female child sexual assault cases in the Philippines. *Int J Legal Med* 125: 817 – 824 (2011)
50. Mann T, Lutwak-Mann C. *Male reproductive function and semen*. Springer Verlag, Berlin, S. 183, 1981.
51. Mauck CK. Biomarkers of semen exposure. *Sex Transm Dis* 36: 81 - 83 (2009)
52. McCluggage WG, Ganesan R, Hirschowitz L, Miller K, Rolason TP. Ectopic prostatic tissue in the uterine cervix and vagina: report of a series with a detailed immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol* 30: 209 – 215 (2006)
53. McGee RS, Herr J. Human seminal vesicle-specific antigen is a substrate for prostate-specific antigen (or P-30). *Biol Reprod* 39: 499 – 510 (1986)
54. McGee RS, Herr J. Human seminal vesicle-specific antigen during semen liquefaction. *Biol Reprod* 37: 431 – 439 (1987)

55. Morrison AI. Persistence of spermatozoa in the vagina and cervix. *Brit J vener dis* 48: 141 – 143 (1972)
56. Mülhardt: *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. 3. Auflage, Spektrum/ Fischer, Heidelberg Berlin, S. 71 – 81 (2002)
57. Nicholl: *Gentechnische Methoden*. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag G. Fischer, Heidelberg Berlin, S 119 – 125 (2002)
58. Nicholl: *Gentechnische Methoden*. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag G. Fischer, Heidelberg Berlin, S. 227 -230 (2002)
59. Norris JV, Manning K, Linke SJ, Ferrance JP, Landers JP. Expedited, chemically enhanced sperm cell recovery from cotton swabs for rape kit analysis. *J Forensic Sci* 52: 800 – 805 (2007)
60. Northrup MA, Benett B, Hadley D, Landre P, Lehew S, Richards J et al. A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers. *Anal Chem* 70: 918 – 922 (1998)
61. Nowakowska D, Kurnatowska A, Stray-Pedersen B, Wilczynski J. Activity of hydrolytic enzymes in fungi isolated from diabetic pregnant women: is there any relationship between fungal alkaline and acid phosphatase activity and glycemic control? *APMIS* 112: 374 – 383 (2004)
62. Pang BCM, Cheung BKK. Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *For Sci Int* 169: 27 – 31 (2007)
63. Pawlowski R, Brinkmann B. Evaluation of sperm-specific lactate dehydrogenase C4 (LDH C4) – Application to semen detection in stains. *Int J Leg Med* 105: 123 – 126 (1992)
64. *Polizeiliche Kriminalstatistik 2004*. 52. Ausgabe, Bundeskriminalamt Wiesbaden, Kriminalistisches Institut, FB KI 12; S.137 ff (2005)
65. *Polizeiliche Kriminalstatistik 2007*. 55. Ausgabe, Bundeskriminalamt Wiesbaden, Kriminalistisches Institut, FB KI 12; S.133 ff (2008)
66. *Polizeiliche Kriminalstatistik 2015*. 63. Ausgabe, Bundesministerium des Inneren Berlin. S. 28 ff (2016)
67. *Polizeiliche Kriminalstatistik 2015*. 63. Ausgabe, Bundesministerium des Inneren Berlin. S. 83 (2016)
68. Pollen JJ, Dreilinger A. Immunohistochemical identification of prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen in female periurethral glands. *Urology* 23: 303 – 304 (1984)

69. Poyntz FM, Martin PD. Comparison of p30 and acid phosphatase levels in post-coital vaginal swabs from donor and casework studies. *For Sci Int* 24: 17 – 25 (1984)
70. Prins GS. Semen. In: Knobil E, Neill JD. *Encyclopedia of reproduction*, Academic Press San Diego, Kalifornien, USA, S. 360-366 (1998)
71. Randall B. Persistence of vaginal spermatozoa as assessed by routine cervicovaginal (Pap) smears. *J Forensic Sci* 32: 678 – 683 (1986)
72. Rauch E, Riedel-Reidemeister W, Spann W, Eisenmenger W. Sexualdelikte 1987 – 1996. *Kriminalistik* 2, 96 (2002)
73. Reddi PP, Shore AN, Acharya KK et al. Transcriptional regulation of spermiogenesis: Insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *J Reprod Immunol* 53: 25 – 36 (2002)
74. Ricci LR, Hoffmann SA. Prostatic acid phosphatase and sperm in the postcoital vagina. *Ann Emerg Med* 11: 530 – 534 (1982)
75. Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell Mol Life Sci* 55: 1057 – 1060 (1999)
76. Roewer L, Eppelen J. Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *J Forensic Sci Int* 53: 163 – 171 (1992)
77. Roewer L. Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol* 5: 77 – 84 (2009)
78. Rupp JC. Sperm survival and prostatic acid phosphatase activity in victims of sexual assault. *J. Forensic Sci* 14: 177 – 183 (1969)
79. Sambrook, Fritsch, Maniatis: *Molecular Cloning – A laboratory manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, Kap 14.2 – 14.19 (1989)
80. Schoell WMJ, Klintschar M, Mirhashemi R, Strunk D, Guilian A, Bogensberger G, Pertl B. Separation of sperm and vaginal cells based on ploidy, MHC class I-, CD 45- and cytokeratin expression for enhancement of DNA typing after sexual assault. *Cytometry* 36: 319 – 323 (1999)
81. Schütze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 16: 737 – 742 (1998)
82. Seligman AM, Manheimer LH. New method for histochemical demonstration of Acid Phosphatase. *J Nat. Cancer Inst* 9: 427 – 434 (1949)
83. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma. A potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci* 23: 106 – 115 (1978)

84. Seyffert: Lehrbuch der Genetik. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag G. Fischer, Heidelberg Berlin, S. 94 – 96 (2003)
85. Seyffert: Lehrbuch der Genetik. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag G. Fischer Heidelberg Berlin, S. 1127 – 1128 (2003)
86. Simich JP, Morris SL, Klick RL, Rittenhouse-Diakun K. Validation of the use of a commercially available kit for the identification of prostate-specific antigen (PSA) in semen stains. J Forensic Sci 44: 1229 – 1231 (1999)
87. Smith DA, Webb LG, Fennell AI, Nathan EA, Bassindale CA, Phillips MA. Early evidence kits in sexual assault: an observational study of spermatozoa detection in urine and other forensic specimens. Forensic Sci Med Pathol 10: 336 – 343 (2014)
88. Stryer: Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag G. Fischer, Heidelberg Berlin Oxford, S. 138 – 140 (1996)
89. Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Van Nieuwerburgh F, Deforce D. Automatic detection of spermatozoa for capture laser microdissection. Int J Legal Med 123: 169 – 175 (2009)
90. Vorhees JC, Ferrance JP, Landers JP. Enhanced elution of sperm from cotton swabs via enzymatic digestion for rape kit analysis. J Forensic Sci 51: 574 – 579 (2006)
91. Wheat TE, Goldberg E. Sperm-specific lactate dehydrogenase C4: antigenic structure and immunosuppression of fertility. Isozymes. Curr Top Biol Med Res 7: 113 – 130 (1983)
92. Wiegand P, Schürenkamp M, Schütte U. DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. Int J Legal Med 104: 359 – 360 (1992)
93. Wiegand P, Rolf B. Analyse biologischer Spuren, Teil I: Funktionelle Blutspurenmorphologie, Körpersekrete, Haare. Detektions- und Nachweismethoden. Rechtsmedizin 13: 103 – 113 (2003)
94. Wiegand P, Rolf B. Analyse biologischer Spuren, Teil II: DNA-Typisierung. Rechtsmedizin 13: 375 – 383 (2003)
95. Willott GM, Allard JE. Spermatozoa – their persistence after sexual intercourse. Forensic Sci Int 19: 135 – 154 (1982)
96. [www.gesetze-im-internet.de/stgb/\\_174.html](http://www.gesetze-im-internet.de/stgb/_174.html)
97. [www.jurathek.de/4846](http://www.jurathek.de/4846) – Jurathek - das juristische Portal
98. Yoshida K, Sekiguchi K, Mizuno N, Kasai K, Sakai I, Sato H, Seta S. The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal

epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Sci Int* 72: 25 – 33 (1995)

99. Zweiter periodischer Sicherheitsbericht; Bundesministerium des Inneren, Bundesministerium der Justiz. 1. Auflage, S. 118 – 121 (2006)

## Fotografische Abbildungen

Abdruck aller Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Dr. K.M.Stein, Heidelberg



Abb. 15: Herkömmlicher Spureträger in Faltschachtel



Abb. 16: Fingerling, steril verpackt mit Faltschachtel



Abb. 17: Fingerling in Faltschachtel



Abb. 18: Verpacken des Fingerlings



Abb. 19: Vorbereitung des Auswaschens

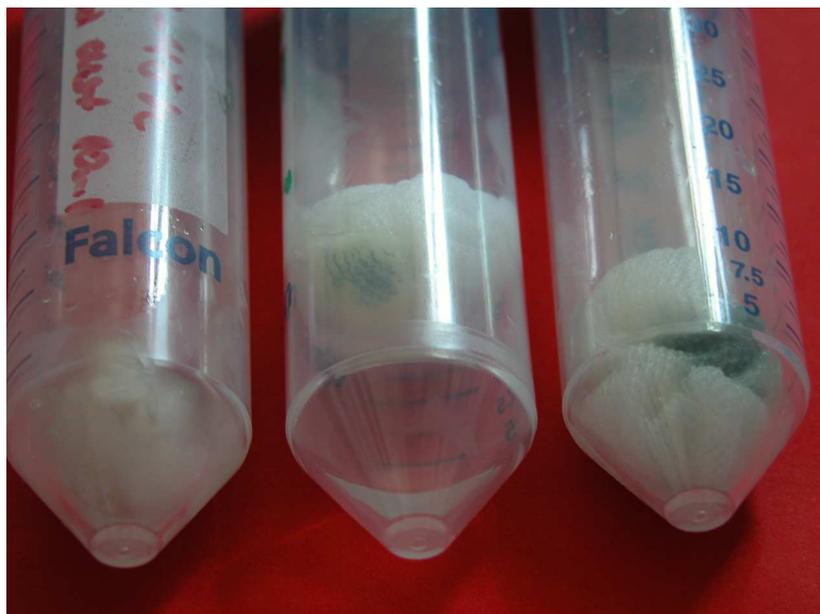


Abb. 20: Auswaschprozess, beachte die Schimmelantragungen!



Abb. 21: Selbstgebaute Filtrationsvorrichtung



Abb. 22: Antragnungen nach Filtrationsvorgang

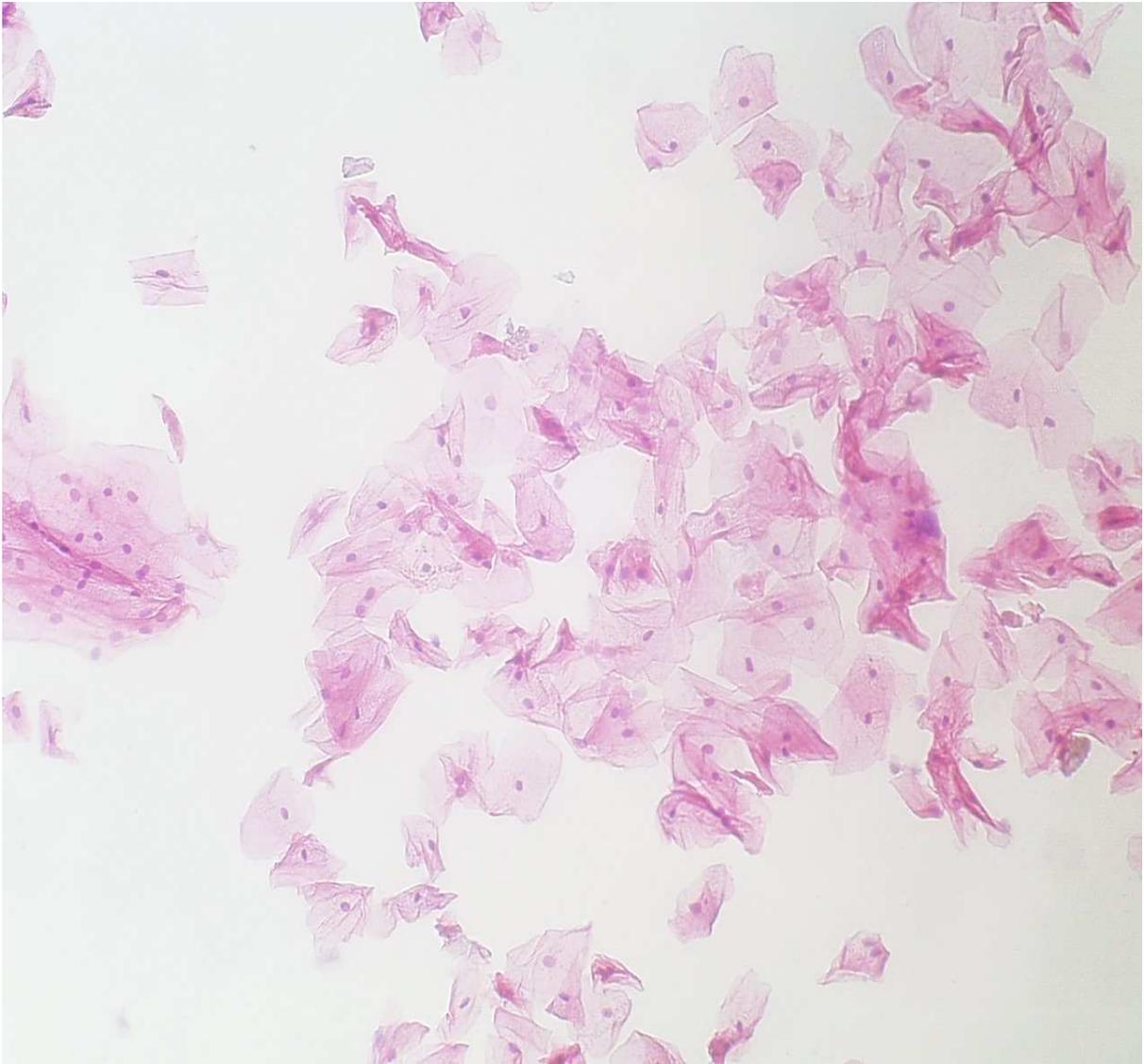


Abb. 23: F1/006 (24 h postkoital) 1. Pellet nach Zentrifugation mit 500 U. Hohe Dichte von sowohl Vaginalepithelien als auch Spermien.

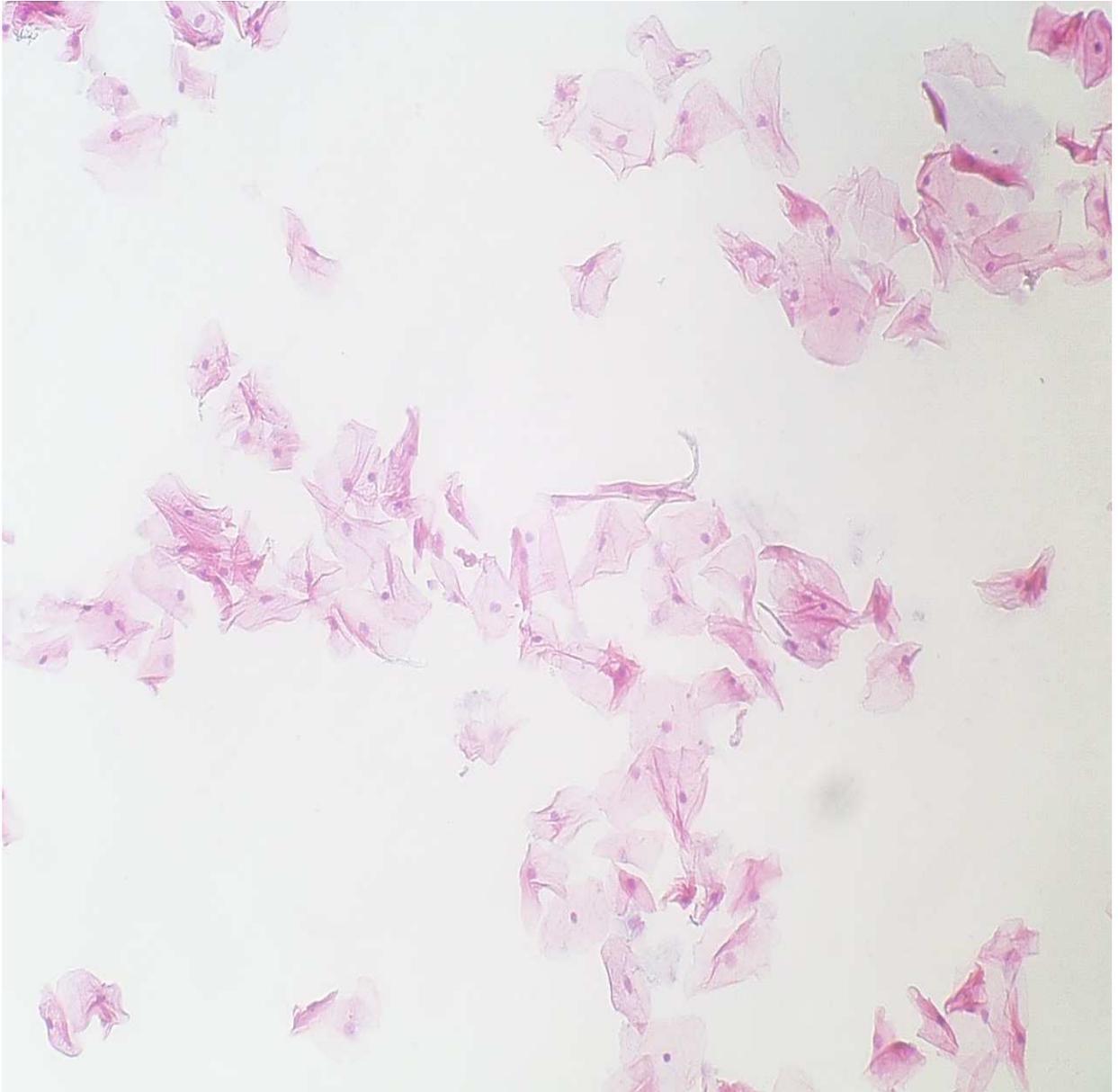


Abb. 24: F1/006 (24 h postkoital) 2. Pellet nach Zentrifugation mit 1000 U. Bereits gut detektierbare Spermien bei reduzierter Vaginalepitheliendichte.

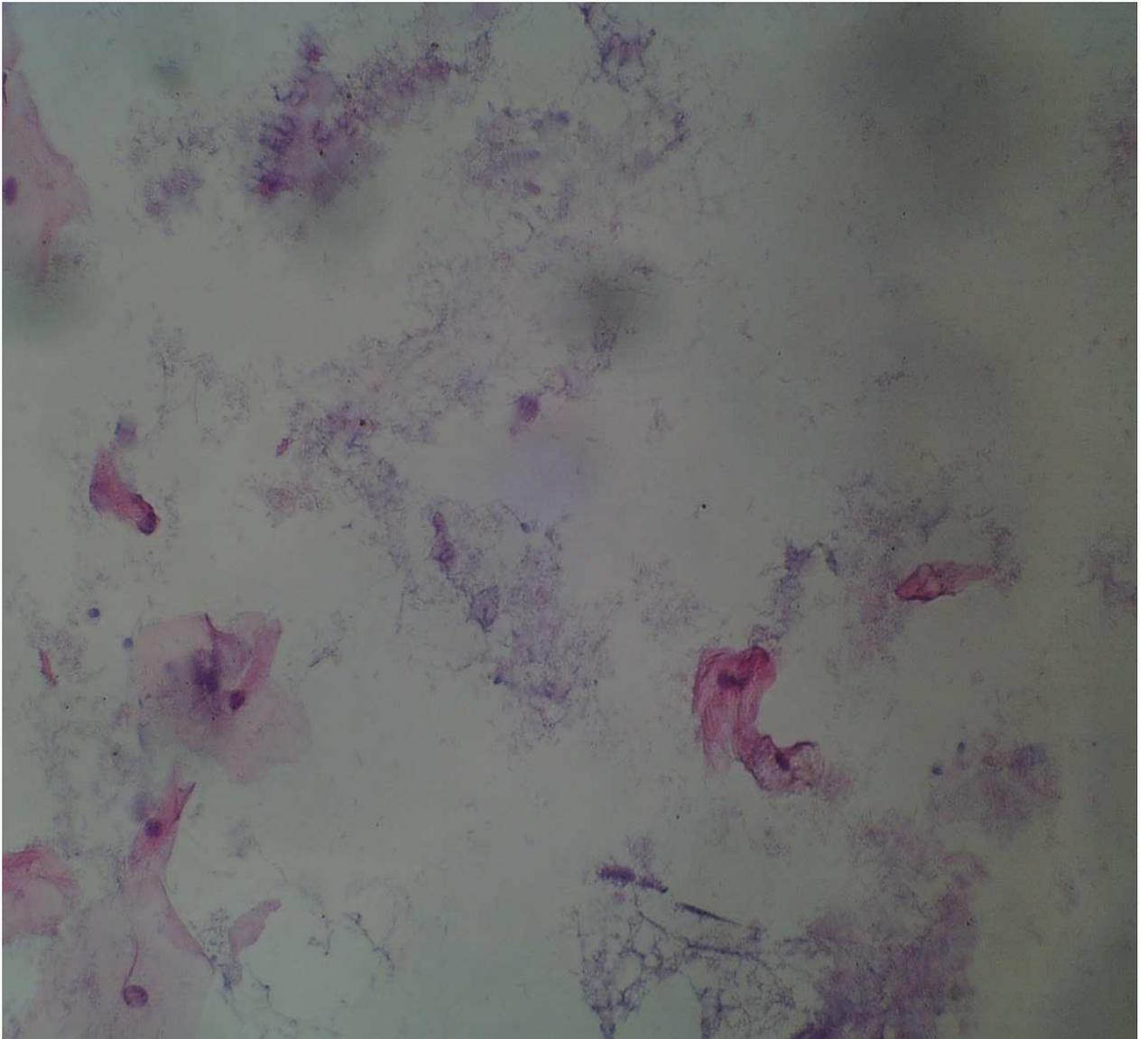


Abb. 25: F1/006 (24 h postkoital), 3.Pellet nach Zentrifugation mit 6000 U. Vaginalepithel deutlich rarefiziert, gut detektierbare Spermien.

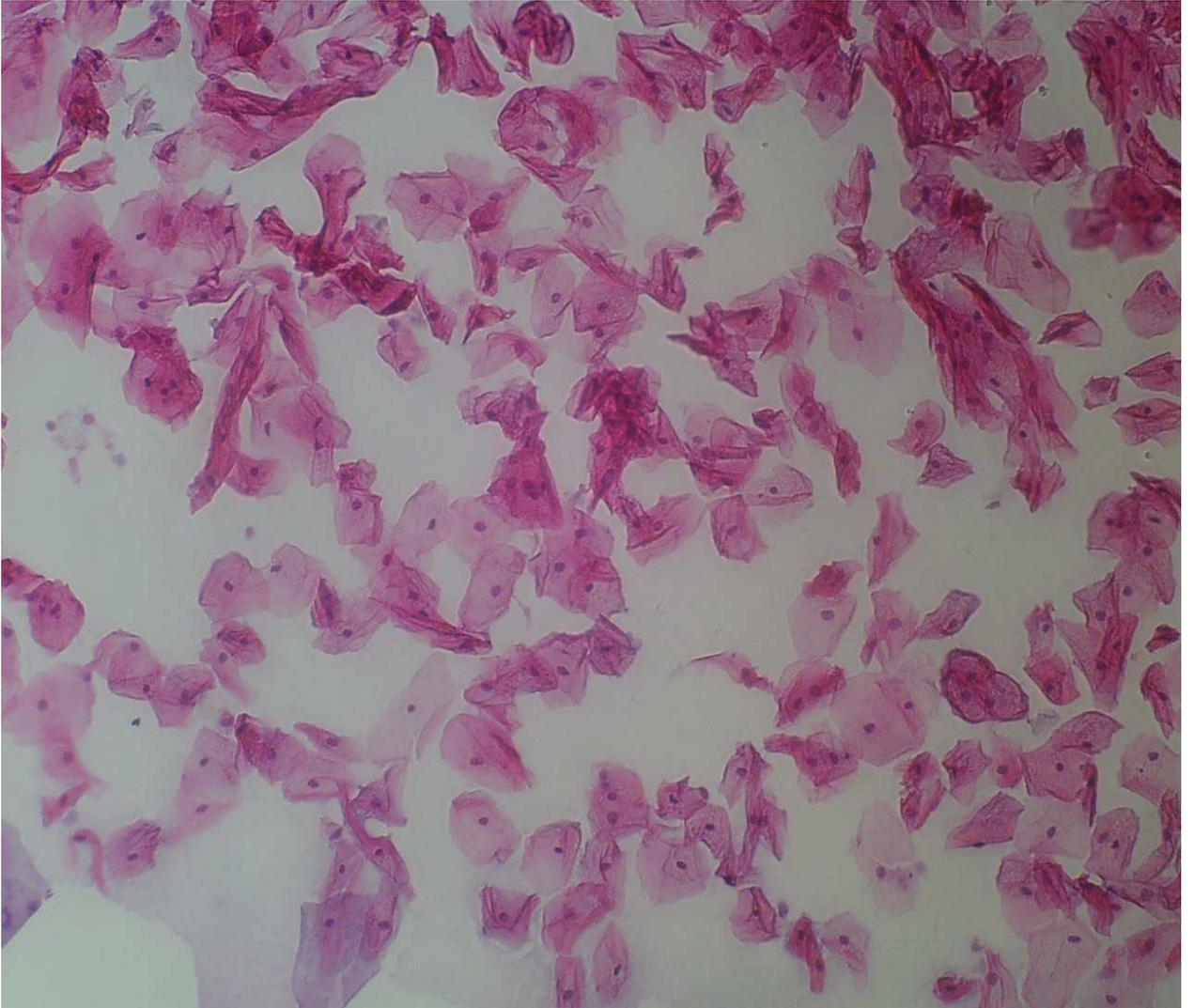


Abb. 26: F3/006 (67 h postkoital) 1. Pellet nach 1. Zentrifugation mit 500 U. Hohe Vaginalepitheldichte

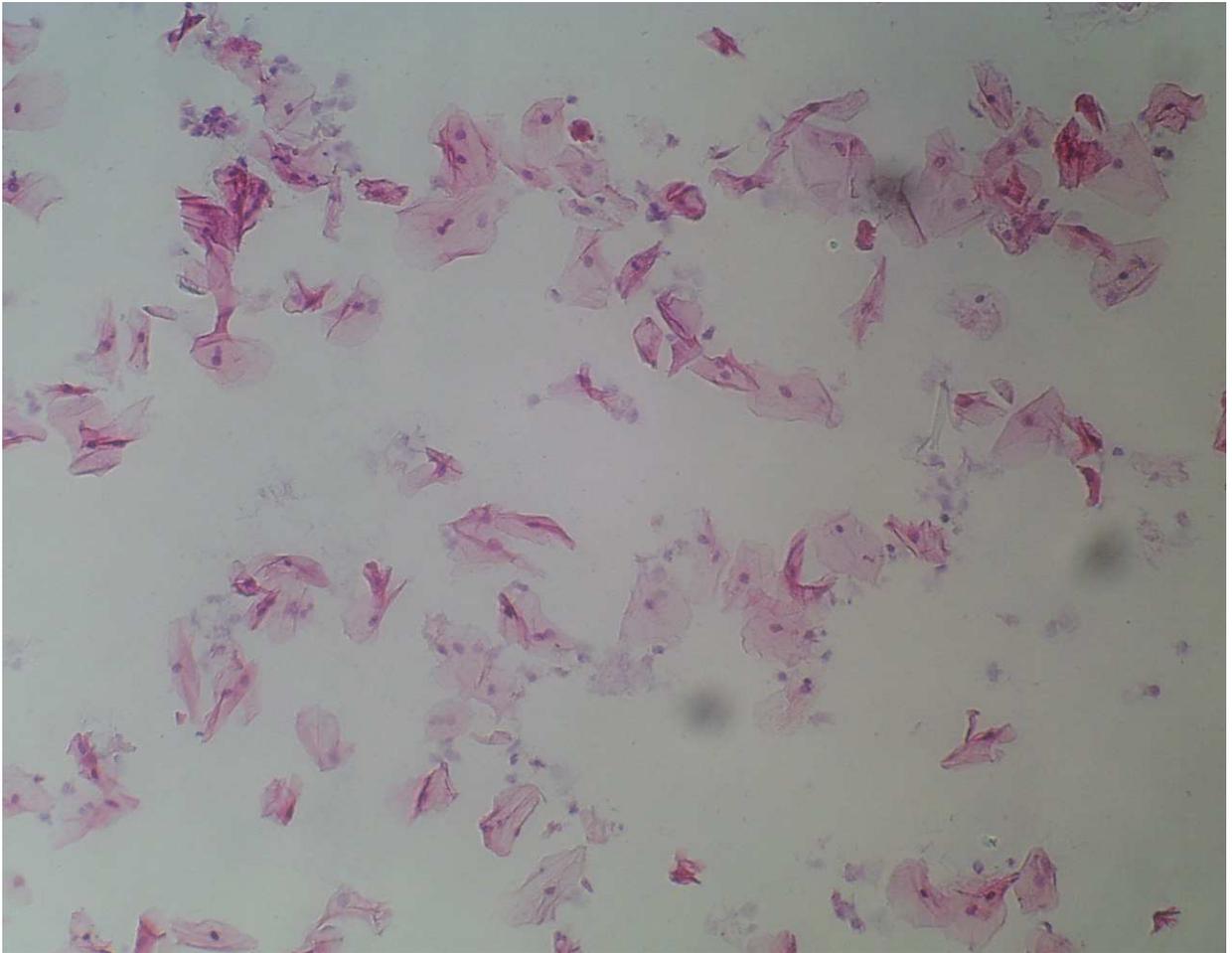


Abb. 27: F3/006 (67 h postkoital) 2.Pellet nach Zentrifugation mit 1000 U. Bereits reduzierte Vaginalepitheldichte

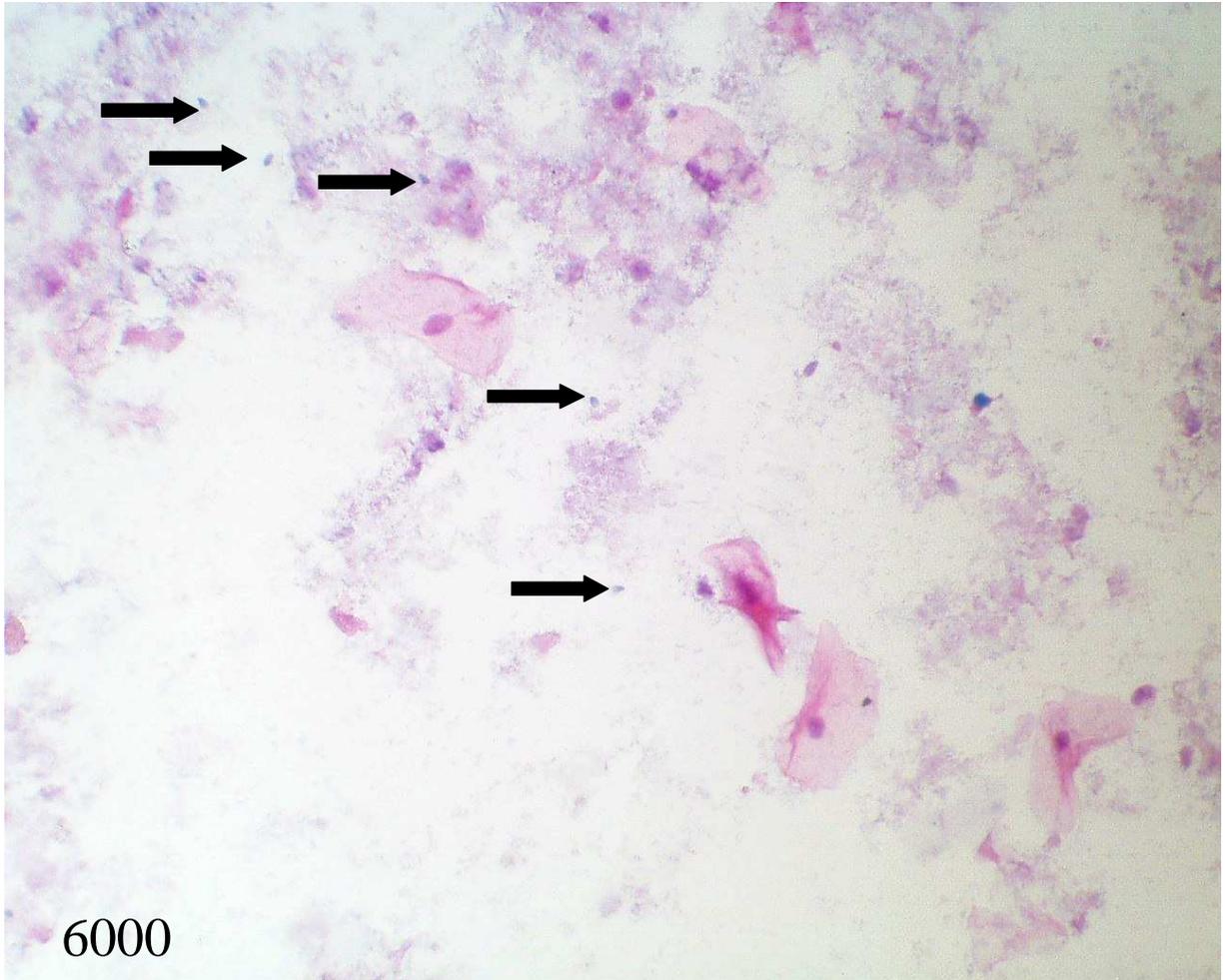


Abb. 28: F3/006 (67 h postkoital), 3. Pellet nach Zentrifugation mit 6000 U. Vaginalepithel deutlich rarefiziert, gut detektierbare Spermien.



## Anhang

### Anlage 1 / Probandeninformation

#### Probandeninformation

Liebe Probanden,  
wir planen eine Studie zur Verbesserung der Spurensicherung nach angegebenem Sexualdelikt.

Bei angegebenen Sexualdelikten ist es von großer Bedeutung, DNA - haltiges Material der beschuldigten Person am Opfer nachzuweisen. DNA kann sowohl im Ejakulat als auch in Form von abgeriebenen Hautschüppchen am Opfer nachweisbar sein. Der Nachweis dieser Spuren ist von erheblicher Bedeutung, da ein Täter unter Umständen nur durch diese überführt werden kann. Um die Spurensicherung zu optimieren, wollen wir im Rahmen der Studie herkömmliche Watteträgerabstriche mit dem neu entwickelten Baumwoll-Fingerling-Abstrich vergleichen.

Konkret sieht das für Sie folgendermaßen aus:

Wenn Sie an der Studie teilnehmen wollen, sollten Sie bereit sein, sich nach ungeschütztem Geschlechtsverkehr in der Universitäts-Frauenklinik zur Spurensicherung vorzustellen. Sie brauchen keinen Geschlechtsverkehr wegen der Studie haben.

In der Klinik werden aus dem Bereich des hinteren Scheidengewölbes, des Gebärmuttermundes und des Gebärmutterhalses sowie dem Scheidenvorhof Abstriche angefertigt. Dabei wird der herkömmliche Q-tip-ähnliche Watteträger verwendet. Im Anschluss wird mit der neu entwickelten Methode mit dem Baumwollfingerling die gesamte Scheide ausgewischt.

Der Termin der Abstrichnahme wird von Ihnen selbst nach stattgehabtem Geschlechtsverkehr (GV) mit der zuständigen Ärztin der Frauenklinik abgestimmt.

Zwischen den gemeldeten Sexualkontakten und der Spurensicherung dürfen Sie keinen weiteren Intimkontakt haben. Auch sollten Sie weder baden noch Scheidenspülungen durchführen oder in der Zwischenzeit Tampons benutzt haben. Auch durch eine zwischenzeitlich einsetzende Menstruation erübrigt sich die Abstrichnahme.

Zur Prüfung der Empfindlichkeit der Methode insbesondere auch auf Hautabriebzellen (Epithelzellen) vom männlichen Glied ist es wichtig, einmal Geschlechtsverkehr ohne Ejakulation in die Scheide zu praktizieren. In diesem Fall sollten Sie vor dem betreffenden Verkehr mindestens 4 Tage keinen ungeschützten Intimkontakt (d.h. ohne Kondom) gehabt haben.

Der Studienablauf sieht wie folgt aus:

- Abstriche am ersten Tag nach GV mit Samenerguss des Partners, seitdem normale Körperpflege
- Abstriche am ersten Tag nach GV ohne Samenerguss des Partners, seitdem normale Körperpflege
- Abstriche am dritten Tag nach GV mit Samenerguss des Partners, seitdem normale Körperpflege

Die Spurensicherung ist mit einer normalen gynäkologischen Untersuchung zu vergleichen und wird ungefähr 5 Minuten dauern. Da sich in seltenen Fällen nach dem Auswischen mit dem Fingerling die Scheide trocken anfühlen kann, wird auf Wunsch nach dem Fingerling-Abstrich ein Gleitmittel in die Scheide appliziert. Bei der Untersuchung soll auch ein Fragebogen ausgefüllt werden.

Das gewonnene Material (Mischspur aus Schleim und Hautzellen der Frau sowie Ejakulat und Hautzellen des Geschlechtspartners) wird ausschliesslich darauf geprüft, ob nicht-codierende Bereiche des Erbguts des Mannes nachweisbar sind. Somit werden nur solche Merkmale untersucht, die KEINEN Rückschluss auf Persönlichkeitsmerkmale, Krankheiten oder ähnliches zulassen.

Das Abstrichmaterial wird bereits in der Frauenklinik anonymisiert und mit einer Nummer versehen (codiert). Eine Zuordnung zur Probandin ist nur durch die Studienleitung möglich. Nach Abschluss der letzten Untersuchung werden die Daten komplett anonymisiert, sodass auch die Studienleitung eine Zuordnung zur Probandin nicht mehr durchführen kann.

Um die Lagerungsbeständigkeit der Sekretpuren auf dem Fingerling zu testen, sollen die Proben innerhalb von 2 Jahren erneut untersucht werden. Danach sind die Proben in der Regel aufgebraucht. Eventuell vorhandene Reste werden vernichtet.

Die erhobenen und personenbezogenen Daten unterliegen dem Datenschutz.

Für die Empfängnisverhütung ist durch die Probandin selbst zu sorgen. Kosten hierfür oder für im Rahmen der Studie eingetretene Schwangerschaften werden nicht erstattet. Ebenso wird keine Verantwortung für eine mögliche Ansteckung mit einer sexuell übertragbaren Krankheit übernommen.

## Anlage 2 / Einverständniserklärung

Einverständniserklärung der Probanden

Einverständnis der Probanden:

Herr/Frau Dr. \_\_\_\_\_ hat heute mit uns ein Aufklärungsgespräch geführt.

- Ich/Wir wurde/n darüber informiert, dass die Teilnahme an der Studie freiwillig ist und dass ich/wir jeder Zeit, auch ohne Angaben von Gründen sowie ohne Nachteile für mich/uns von der Studie zurücktreten kann/können.
- Für die Empfängnisverhütung ist durch mich/uns selbst zu sorgen; für eventuelle im Rahmen der Studie entstehende Schwangerschaften steht mir/uns keine Unterstützung zu.
- Für eine mögliche Ansteckung mit einer sexuell übertragbaren Krankheit (wie z.B. Syphilis, Gonorrhoe, HIV) übernimmt die Studienleitung keine Verantwortung.
- Die Ärztliche Schweigepflicht und der Datenschutz bleiben gewahrt. Es werden lediglich anonymisierte Spurenträger zur DNA-Untersuchung weitergeleitet. Dritten wird kein Einblick in die Originalunterlagen gestattet, es sein denn, ich/wir erkläre/n mich/uns schriftlich damit einverstanden.
- Ich/Wir habe/n noch folgende Fragen:
  
- Ich/Wir willige/n hiermit in die oben beschriebenen Untersuchungen ein.

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum, Unterschrift der Probandin

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum, Unterschrift des Probanden

Sollte der männliche Partner zur Wahrung der Anonymität nicht bereit sein, seine Unterschrift auf dem Einverständnisbogen zu leisten, ist die nachfolgend aufgeführte Erklärung der Frau zwingend.

- Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass mein Partner von mir über den Inhalt der Studie und über die Teilnahme daran in Kenntnis gesetzt wurde.

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum; Unterschrift der Probandin

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum; Unterschrift des Arztes/ der Ärztin

### Anlage 3 / Fragebogen zur Untersuchung

Codenummer: \_\_\_\_\_

Datum:

Liebe Probandin,  
zusätzlich zur Spurensicherung möchten wir Sie noch bitten, einige Fragen zu beantworten:

- Datum und Uhrzeit des letzten Geschlechtsverkehrs:
- Mit oder ohne Ejakulation?
- Wenn ohne Ejakulation: Dauer des Geschlechtsverkehrs?
- Ist der Partner beschnitten?
- Datum und Uhrzeit des vorletzten Geschlechtsverkehrs:
- Haben Sie seitdem gebadet oder eine Scheidenspülung vorgenommen?
- Welche Methode der Verhütung haben Sie verwendet?
- Wann war Ihre letzte Menstruation? Wie regelmäßig ist Ihr Zyklus?
- Sind Sie im Moment schwanger; wenn ja, in welcher Woche?

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!

## Anlage 4 / Untersucherprotokoll

Datum:

VerschlüsselungsNr:

Gynäkologisches Protokoll

Untersuchender Arzt:

Zeitpunkt des letzten Geschlechtsverkehrs:

Mit oder ohne Ejakulation?

Wenn ohne Ejakulation: Dauer des Geschlechtsverkehrs?

Zeitpunkt des vorletzten Geschlechtsverkehrs:

Beschaffenheit des Vaginalsekrets

- Viskosität:
- Menge:

Anatomische Besonderheiten:

Hinweis auf Infekte:

## Tabellen

### Zu 3.2.3

Tabelle 2 Methodenarm: Orientierende Filtration. Eigenständige Spurensicherung mit postkoitalen Intervallen bis 21 Stunden **Zu Abbildung 1**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min/Max	Anmerkung
Jun 01 vor Fil	7	17	5	14	7	12	5	4	4	8	7,7	4 / 14	
Jun 01 nach Fil	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	ne	m	Keinerlei Epithel
Jun 02 vor Fil	39	41	32	21	28	22	15	16	11	6	23,1	6 / 39	
Jun 02 nach Fil	m	24	10	14	5	27	30	7	25	32	ne	7 / m	Keinerlei Epithel
Jun 03 vor Fil	4	8	5	5	4	5	8	2	8	5	5,4	2 / 8	
Jun 03 nach Fil	12	m	4	2	4	2	5	3	5	3	ne	2 / m	Keinerlei Epithel
P VI nach Fil	15	0	0	0	0	5	0	0	1	0	2,1	0 / 15	1 be-geißelt; wenig Epithel
Test 7 vor Fil	35	25	12	14	26	20	7	9	17	17	16,4	7 / 35	Massiv überlagert
Test 7 nach Fil	19	30	40	40	40	0	0	0	0	0	16,9	0 / 40	Wenige GF's
Jun 04 vor Fil	0	0	1	2	2	0	0	2	2	2	1,1	0 / 2	
Jun 04 nach Fil	7	8	4	4	1	1	4	m	2	5	ne	1 / m	Wenige GF's, kein Epithel
Jun 05 vor Fil	9	6	22	24	12	17	9	13	6	5	12,3	5 / 24	
Jun 05 nach Fil	5	7	3	2	2	7	3	2	3	6	4,0	0 / 7	Wenige GF's, kein Epithel
Jun 06 vor Fil	4	2	2	1	1	4	2	2	2	1	2,1	1 / 4	
Jun 06 nach Fil	4	1	2	3	3	1	1	0	0	0	1,5	0 / 4	Wenige GF's, kein Epithel
Test 13 vor Fil	0	0	2	0	0	1	0	1	0	1	0,5	0 / 2	Massiv überlagert
Test 13 nach Fil	11	1	3	2	1	1	0	0	0	0	1,9	0 / 11	2 be-geißelt, wenige GF's, kein Epithel
P I vor Fil	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0,3	0 / 3	Massiv überlagert
P I nach Fil													Leer

Legende: Fil: Filtration; GF: Gesichtsfeld; Jun: probenspezifische Betitelung; m: massenhaft; MW: Mittelwert; n: nicht erhebbar; P: probenspezifische Betitelung

**Tabelle 3** Methodenarm: Orientierende Filtration. Eigenständige Spurensicherung mit postkoitalen Intervallen 24 bis 96 Stunden **Zu Abbildung 2**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmerkung
K3 vor Fil	1	6	3	3	4	6	22	1	3	13	6,2	1 / 22	Massiv überlagert
K3 nach Fil	4	5	2	1	1	1	1	3	5	0	2,3	0 / 5	Wenig GF's
JL 24 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Unzureichende Anfertigung
F3 vor Fil	7	8	4	7	11	6	9	9	4	6	7,1	4 / 11	
K5 vor Fil	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0 / 1	Massiv überlagert
K5 nach Fil													Leer
F5 vor Fil	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0,2	0 / 2	
PV vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Massiv überlagert
PV nach Fil													leer
K1 vor Fil	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0 / 1	Überlagert;Kaum auswertbar
K1 nach Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Wenig sichtbares Material
K2 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Massiv überlagert
K2 nach Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Wenig sichtbares Material

Legende: Fil: Filtration; GF: Gesichtsfeld; K: probenspezifische Betitelung; MW: Mittelwert; P: probenspezifische Betitelung

### Zu 3.2.4

**Tabelle 4** Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 24 +/-4 Stunden bzw. 24 Stunden bei eigenständiger Spurensicherung durch Probandin (KK1/Methodenarm)

### **Zu Abbildung 3**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmerkung
F1/007 HE1	2	1	3	3	4	6	11	3	3	9	4,5	1 / 11	12 begeißelt

F1/007 PAP1	1	3	1	1	3	1	3	1	1	1	1,6	1 / 3	5 begeißelt
F1/007 HE2	0	0	11	1	0	0	2	0	1	0	1,5	0 / 11	1 begeißelt; keine Epithelien
F1/007 PAP2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0,2	0 / 2	1 begeißelt; keine Epithelien
F1/009 HE1	24	46	6	13	17	5	15	16	22	31	19,5	5 / 46	5 begeißelt; viele Zelllagen
F1/009 PAP1	26	8	11	44	64	37	45	17	9	15	27,6	8 / 64	1 begeißelt; viele Zelllagen
F1/009 HE2													Leer
F1/009 PAP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F1/010 HE1	9	4	1	4	1	2	1	1	1	1	2,5	1 / 9	
F1/010 PAP1	0	1	1	2	0	1	0	1	2	1	0,7	0 / 2	
F1/010 HE2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0,2	0 / 2	Kein Epithel
F1/010 PAP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F1/011 HE1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,1	0 / 1	
F1/011 PAP1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0,2	0 / 1	1 begeißelt
F1/011 HE2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0,3	0 / 1	
F1/011 PAP2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0,2	0 / 1	
F1/012 HE1	0	3	1	1	0	1	0	1	0	1	0,8	0 / 3	
F1/012 PAP1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0,3	0 / 1	
F1/012 HE2													Leer
F1/012 PAP 2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,2	0 / 1	
F1/013 HE1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,2	0 / 1	
F1/013 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F1/013 HE2													Leer
F1/013 PAP2													Leer
F1/014 HE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 in > 30 GF´s
F1/014 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 in > 30 GF´s
F1/015 HE1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0 / 1	Zellkonglo- merate
F1/015 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

F1/016 HE1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,2	0 / 1	
F1/016 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F1/016 HE2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0 / 1	Spermium lytisch
F1/018 HE1	2	6	2	3	1	1	3	2	1	0	2,1	0 / 6	4 begeißelt
F1/018 PAP1	1	1	0	1	1	1	0	2	0	0	0,7	0 / 2	
F1/018 HE2	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0,4	0 / 3	
F1/018 PAP2	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0,5	0 / 1	1 begeißelt
KK1 HE1	3	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1,5	0 / 3	4 begeißelt
KK1 PAP1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1,3	1 / 2	1 begeißelt; 1 isolierte Geißel
KK1 HE2	2	2	1	2	0	6	0	0	0	0	1,3	0 / 2	
KK1 PAP2	2	3	0	2	0	2	0	0	3	3	1,5	0 / 3	1 begeißelt

Legende: F: Fingerling; GF: Gesichtsfeld; HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; KK: probenspezifische Betitelung; MW: Mittelwert; PAP: Papanicolaou-Färbung

Tabelle 5 Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 66 +/-6 Stunden bzw. 48 Stunden bei eigenständiger Spurensicherung durch Probandin (KK2 Methodenarm)

**Zu Abbildung 4**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmerkung
F3/003 HE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/003 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/003 HE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Epithelfragmente
F3/003 PAP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Vereinzelt Epithelien
F3/007 HE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/007 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/007 HE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Keine Epithelien
F3/007 PAP2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0 / 1	Keine Epithelien
F3/009 HE1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0,2	0 / 2	
F3/009 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/009 HE2													Leer
F3/009													Leer

PAP2													
F3/010 HE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/010 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/010 HE2													Leer
F3/010 PAP2												0	Leer
F3/014 HE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Massive Konglomerate
F3/014 PAP1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0 / 1	Beginnend lytisch
F3/014 HE2													Leer
F3/014 PAP2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,2	0 / 1	
F3/018 HE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 in > 30 GF's
F3/018 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 in > 30 GF's
F3/018 HE2												0	Leer
F3/018 PAP2												0	Leer
KK2 HE1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0 / 1	
KK2 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Legende: F: Fingerling; GF: Gesichtsfeld; HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; KK: probenspezifische Betitelung; MW: Mittelwert; PAP: Papanicolaou-Färbung

### Zu 3.2.5

**Tabelle 6** Vorangehende Läufe mittels Vivaclear® **Zu Abbildung 5**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmerkung
Pur1 HE	1	1	2	0	0	0	2	3	3	0	1,2	0 / 3	4 begeißelt
Pur1 PAP	0	0	0	1	17	0	0	0	1	1	2,0	0 / 17	1 begeißelt
Mix1 HE1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0,4	0 / 1	1 begeißelt
Mix1 PAP1	0	1	0	0	0	0	1	2	1	3	0,8	0 / 3	1 begeißelt
Mix1 HE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mix1 PAP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Test1 HE1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0,4	0 / 1	
Test1 PAP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Test1 HE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Rar Epithelien
Test1 PAP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Nahezu zellfrei

Legende: GF: Gesichtsfeld; HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; MW: Mittelwert; PAP: Papanicolaou-Färbung

Tabelle 7 Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 24+/-4 bzw. 20 Stunden bei eigenständiger Spurensicherung durch Probandin (JL20/Methodenarm) **Zu**

**Abbildung 6**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmerkung
JL20 vor Fil	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0,4	0 / 1	Granulocyten, sehr dicht
JL20 nach Fil													Zellos
JL20 Abklatsch	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0,5	0 / 1	Granulocyten
F1/007 vor Fil	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0,8	0 / 2	2 begeisselt
F1/007 nach Fil													Zellos
F1/007 Abklatsch	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0,4	0 / 1	Zellarm
F1/009 vor Fil	9	3	3	3	0	1	0	1	3	1	2,3	0 / 9	
F1/009 nach Fil													Zellos
F1/009 Abklatsch	3	0	0	1	0	0	3	1	1	0	0,9	0 / 3	Geringe Zelldichte
F1/010 vor Fil	2	0	5	3	2	0	4	2	2	5	2,5	0 / 5	
F1/010 nach Fil													Äusserst zellarm
F1/010 Abklatsch	4	1	2	7	3	13	3	5	2	1	4,1	1 / 13	
F1/011 vor Fil	1	0	1	0	0	3	0	1	0	1	0,7	0 / 3	
F1/011 nach Fil													Zellos
F1/011 Abklatsch	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0,3	0 / 3	Zellarm
F1/012 vor Fil	8	2	3	4	1	2	1	3	2	2	2,8	0 / 8	
F1/012 nach Fil													Zellos
F1/012 Abklatsch	5	3	3	3	0	1	0	1	3	1	2,0	0 / 5	
F1/013 vor Fil	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,3	0 / 1	Hohe Zelldichte, überlagert
F1/013 nach													Zellos

Fil													
F1/013 Abklatsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F1/014 vor Fil	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0 / 1	z.T. überlagert
F1/014 nach Fil													Leer
F1/014 Abklatsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Äusserst zellarm
F1/016 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Hohe Zell- dichte, über- lagert
F1/016 nach Fil													Zellos
F1/016 Abklatsch	1	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0,5	0 / 1	Zellreich
F1/018 vor Fil	0	0	3	0	0	2	0	2	3	1	1,1	0 / 3	
F1/018 nach Fil													Äusserst zellarm
F1/018 Abklatsch	1	0	2	2	2	0	0	1	3	1	1,2	0 / 3	

Legende: F: Fingerling; Fil: Filtration; GF: Gesichtsfeld; HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; JL: probenspezifische Betitelung; MW: Mittelwert; PAP: Papanicolaou-Färbung

**Tabelle 8** Vergleichsarm: Ärztlich gesicherte Spur mit postkoitalem Intervall 66 +/- 6 Stunden  
**Zu Abbildung 7**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmer- kung
F3/003 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/003 nach Fil													Zellos
F3/003 Abklatsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Zellarm
F3/007 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/007 nach Fil													Zellos
F3/007 Abklatsch	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0,3	0 / 3	
F3/009 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Zellreich, teils überlagert
F3/009 nach Fil													Zellos
F3/009 Abklatsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Geringe Zelldichte
F3/010 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Hohe Zell- dichte, teils überlagert
F3/010 nach Fil													Zellos

F3/010 Abklatsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/014 vor Fil	0	0	2	0	1	0	1	0	1	1	0,6	0 / 2	
F3/014 nach Fil													Kein Epi- thel, 2 Zellfragm ente
F3/014 Abklatsch	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0,5	0 / 2	Epithel- fragmente
F3/018 vor Fil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/018 nach Fil													Zelllos
F3/018 Abklatsch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Äusserst zellarm

Legende: F: Fingerling; Fil: Filtration; GF: Gesichtsfeld; MW: Mittelwert

### Zu 3.2.6

Tabelle 9 Methodenarm - Zentrifugationsreihe Probe AS1 **Zu Abbildung 8**

<b>Pellet nach</b>	<b>GF 1</b>	<b>GF 2</b>	<b>GF 3</b>	<b>GF 4</b>	<b>GF 5</b>	<b>GF 6</b>	<b>GF 7</b>	<b>GF 8</b>	<b>GF 9</b>	<b>GF 10</b>	<b>MW</b>	<b>Min / Max</b>	<b>Anmerkung</b>
300 U	15	8	13	7	10	10	13	5	9	7	9,7	5 / 15	Gut auswertbar
500 U	15	14	13	13	10	18	11	5	7	12	11,8	5 / 18	Gut auswertbar
800 U	8	18	13	m	20	19	27	6	3	19	ne	3 / m	Deutlicher Epithelien-rückgang
1300 U	7	11	11	3	9	7	8	6	6	5	7,3	5 / 11	Dtl. Rückgang von Spermien und Epithel
2000 U	24	12	15	14	17	17	9	6	8	11	13,3	6 / 24	Kaum noch Epithel
3000 U	1	1	0	0	0	0	2	0	0	2	0,6	0 / 2	Kein Epithel, Spermienverlust
4000 U	7	0	3	0	0	3	0	1	0	2	1,6	0 / 7	Kein Epithel, Spermienverlust
5000 U	5	1	2	0	3	3	0	0	3	3	2,0	0 / 5	Teils Epithel-fragmente
6000 U	1	0	0	1	0	0	0	7	0	1	1,0	0 / 7	Kein Epithel

Legende: AS: probenspezifische Betitelung; GF:Gesichtsfeld; m: massenhaft; MW: Mittelwert; n: nicht erhebbar; U: Umdrehungen pro Minute

**Tabelle 10** Methodenarm - Zentrifugationsreihe Probe AS 2 **Zu Abbildung 8**

<b>Pellet nach</b>	<b>GF 1</b>	<b>GF 2</b>	<b>GF 3</b>	<b>GF 4</b>	<b>GF 5</b>	<b>GF 6</b>	<b>GF 7</b>	<b>GF 8</b>	<b>GF 9</b>	<b>GF 10</b>	<b>MW</b>	<b>Min / Max</b>	<b>Anmerkung</b>
300 U	9	10	2	3	7	10	5	3	6	3	5,8	2 / 10	Gut auswertbar
500 U	15	14	13	13	10	18	11	5	7	12	11,8	5 / 18	Gut auswertbar
800 U	13	20	13	26	8	30	12	13	9	13	14,7	9 / 30	Deutlicher Epithelienrückgang
1300 U	22	21	26	15	32	20	20	27	18	25	22,6	15 / 32	Epithelienrückgang
2000 U	14	11	14	17	17	17	16	10	9	12	13,7	9 / 17	Kaum noch Epithel
3000 U	1	0	0	0	3	0	0	1	0	1	0,6	0 / 3	Kein Epithel, Spermienverlust
4000 U	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0,3	0 / 1	Kein Epithel, vereinzelt Spermien
5000 U	1	0	2	0	1	4	0	1	0	2	1,1	0 / 4	Kein Epithel
6000 U	1	0	3	0	0	1	0	1	0	2	0,8	0 / 3	Kein Epithel

Legende: AS: probenspezifische Betitelung; GF:Gesichtsfeld; MW: Mittelwert; U: Umdrehungen pro Minute

**Tabelle 11** Methodenarm - Zentrifugationsreihe Probe UHU 2 **Zu Abbildung 8**

<b>Pellet Nach</b>	<b>GF 1</b>	<b>GF 2</b>	<b>GF 3</b>	<b>GF 4</b>	<b>GF 5</b>	<b>GF 6</b>	<b>GF 7</b>	<b>GF 8</b>	<b>GF 9</b>	<b>GF 10</b>	<b>MW</b>	<b>Min / Max</b>	<b>Anmerkung</b>
300 U	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	ne	m	Sehr hohe Epithelien-dichte
500 U	22	35	30	30	25	30	m	11	18	12	ne	11 / m	Dtl. Epithelienrückgang
800 U	m	m	m	m	32	m	40	m	m	m	ne	32 / m	Epitheliendichte unverändert
1300 U	m	m	m	m	m	m	28	m	m	m	ne	28 / m	Dtl. Epithelienrückgang
2000 U	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	ne	m	Geringe Epithelienreduktion
3000 U	4	8	9	11	12	11	10	12	5	7	8,9	4 / 12	Epithelfragmente, Spermienreduktion
4000 U	0	2	0	3	0	7	4	1	0	2	1,9	0 / 7	Kein Epithel
5000 U	4	6	3	4	6	3	6	3	7	4	4,6	3 / 7	Kein Epithel

6000 U	0	0	1	1	0	1	1	2	0	3	0,9	0 / 1	Kein Epithel
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-----	-------	--------------

Legende: GF:Gesichtsfeld; m: massenhaft; MW: Mittelwert; ne: nicht erhebbar; U: Umdrehungen pro Minute; UHU: probenspezifische Betitelung

### Zu 3.2.7

Tabelle 12 Methodenarm: Kombinierte Methodik (zwei Zentrifugationen plus Abschlussfiltration)  
**Zu Abbildung 9**

Probe	GF1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmerkung
JL34 Z1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,2	0 / 1	Massiv überlagert
JL34 Z2	1	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0,5	0 / 2	
JL34 Abklatsch	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0,3	0 / 1	
JL34 Filtrat													Leer
JL37 Z1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0,4	0 / 1	Massiv überlagert
JL37 Z2	2	0	3	1	1	3	2	2	0	1	1,5	0 / 3	1 begeißelt! Überlagert
JL37 Abklatsch	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,2	0 / 1	
JL37 Filtrat													Leer
JL50 Z1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0,3	0 / 1	Zellarm
JL50 Z2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0,3	0 / 1	
JL50 Abklatsch	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0,4	0 / 1	1 begeißelt!
JL50 Filtrat													Leer

Legende: GF:Gesichtsfeld; JL: probenspezifische Betitelung; MW: Mittelwert; Z: Zentrifugations-schritt

Tabelle 13 Vergleichsarm: Ärztlich erhobene Abstriche der postkoitalen Intervalle 24 +/-4 bzw. 66 +/-6 Stunden (Zentrifugationsreihe) **Zu Abbildung 10**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	MW	Min / Max	Anmerkung
F1/004 Z1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Äusserst zellarm
F1/004 Z2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Äusserst zellarm
F1/004 Z3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Äusserst

													zellarm
F3/004 Z1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/004 Z2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F3/004 Z3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F1/006 Z1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Massiv überlagert
F1/006 Z2	0	0	0	1	2	0	0	1	0	1	0,5	0 / 2	
F1/006 Z3	1	3	0	1	3	0	1	4	3	2	1,8	0 / 4	
F3/006 Z1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Massiv überlagert
F3/006 Z2	0	2	3	1	2	4	1	2	0	1	1,6	0 / 4	
F3/006 Z3	4	3	2	2	1	4	1	2	5	4	2,8	0 / 4	

Legende: F: Fingerling; GF:Gesichtsfeld; MW: Mittelwert; Z: Zentrifugationsschritt

**Tabelle 14** Eigenständig entnommene Fingerlingspuren unterschiedlicher postkoitaler Intervalle (KK1 entspricht 24 Stunden) (Zentrifugationsreihe) **Zu Abbildung 11**

Probe	GF 1	GF 2	GF 3	GF 4	GF 5	GF 6	GF 7	GF 8	GF 9	GF 10	M W	Min / Max	Anmerkung
JL9 Z1	1	1	1	1	2	3	2	2	2	3	1,8	1 / 3	
JL9 Z2	0	1	3	2	7	4	4	1	2	5	2,9	0 / 7	
JL9 Z3	1	3	2	2	3	1	1	5	3	6	2,7	1 / 6	
JL18 Z1	1	3	3	2	3	2	23	7	5	3	5,2	1 / 23	
JL18 Z2	5	3	1	4	4	2	3	8	3	5	3,8	1 / 8	
JL18 Z3	4	7	2	4	4	5	2	9	4	3	4,4	2 / 9	
JL20 Z1	4	2	0	1	1	1	1	1	0	1	1,2	0 / 12	Stark überlagert, viele Granulocyten
JL20 Z2	1	1	0	1	1	1	0	2	0	1	0,8	0 / 2	Viele Granulocyten
JL20 Z3	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0,6	0 / 1	Viele Granulocyten
JL21 Z1	5	2	3	2	1	1	1	2	4	9	3,0	0 / 9	Sehr gut auswertbar
JL21 Z2	4	3	1	3	3	1	5	2	2	1	2,5	1 / 5	
JL21 Z3	5	7	4	1	1	2	2	2	2	3	2,9	1 / 7	Kaum Epithel
KK1 Z1	28	33	m	25	44	14	8	8	49	28	ne	1 / m	

KK1 Z2	15	17	13	26	25	9	13	19	9	24	1,7	9 / 26	Wenig Epithel
KK1 Z3	3	5	9	3	4	6	6	7	5	4	5,2	3 / 7	Kein Epithel
JL25 Z1	0	2	2	0	0	2	1	1	1	3	1,2	0 / 3	
JL25 Z2	2	1	1	3	3	3	2	2	2	3	2,2	1 / 3	
JL25 Z3	2	0	2	1	3	2	3	3	3	2	2,1	0 / 3	Kaum Epithel
JL33 Z1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0,2	0 / 1	
JL33 Z2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0,4	0 / 1	
JL33 Z3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,1	0 / 1	Kaum Epithel
JL45 Z1	0	1	0	0	0	1	2	0	0	3	0,7	0 / 3	
JL45 Z2	3	2	0	0	1	1	0	2	0	1	1	0 / 3	
JL 45 Z3	4	2	2	1	0	1	1	1	0	1	1,3	0 / 4	
JL47 Z1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0,5	0 / 1	
JL47 Z2	0	0	1	1	0	2	0	0	1	0	0,5	0 / 2	1 begeißelt, noch zellreich
JL47 Z3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0,4	0 / 1	Kaum Epithel

Legende: GF: Gesichtsfeld; JL sowie KK: probenspezifische Betitelung; m: massenhaft; MW: Mittelwert; ne: nicht erhebbar; Z: Zentrifugationsschritt

## Danksagung

Aus Datenschutzgründen entfernt

## Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfernt