

Nachweis und Typenbestimmbarkeit der sauren Erythrocytenphosphatase in Blutspuren

T. NAGATA und G. DOTZAUER *

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität zu Köln

Eingegangen am 16. Juni 1970

The Identification and Typing of SEP in Blood Stains

Summary. The limits of the SEP identification in the blood spots under various circumstances i.e. the dependence on blood quantity, temperature, and carrier have been studied. Heidel's statement that she has been able to identify the SEP in 30 days old spots could not be confirmed. In our own experiments we have been able to identify the SEP in 32 hours old blood stains using 20 mg of dry blood substance. The deep temperature (-40°C) gives better results and from criminalistics point of view we recommend the preservation of the specimens under such conditions.

Key-Words: Blutspuren — Saure Erythrocytenphosphatase in Blut — Spuren — Spurenuntersuchungen, SEP.

Zusammenfassung. 1. Die Angaben Heidels sind nicht zu bestätigen. 2. Die Typenbestimmbarkeit der SEP steht in Abhängigkeit von der Trocknungszeit der Blutspuren, der Menge des vorzulegenden Untersuchungsmaterials, dem Spurenträger. 3. Die Variablen wurden dargestellt, die Ergebnisse tabellarisch festgehalten. 4. Wir machten die Erfahrung, daß Spuren, die nach Asservierung sofort in die Kältetruhe (-40°C) gebracht werden, längere Zeit verwertbare Resultate erzielen lassen. Spuren, die bereits den größten Teil ihrer Aktivität bei Zimmertemperatur verloren hatten, können durch die Kälte nicht reaktiviert werden. Wenn Blutspuren jedoch längstens bis 8 Std bei $20-24^{\circ}\text{C}$ getrocknet, sofort asserviert und unmittelbar, z.B. am Wochenende, in -40°C überführt werden, dürfte am Montag ein Ergebnis noch zu erzielen sein. Radam und Strauch (1966) werden insoweit bestätigt, als die Aktivitätshaltbarkeit des Enzyms in tiefer Temperatur größer ist.

I.

Heidel (1968) will es aus 30 Tage alten Blutspuren gelungen sein, den Phosphatasetyp zu bestimmen. Smerling trug 1968 vor, sie hätte möglichst viele Blutschüppchen in einem Tropfen aqua dest. gelöst, für 30 min bei -25°C eingefroren, nach Auftauen verimpft und aus einer 30 Std alten Blutspur den SEP-Typ identifiziert.

II.

Wir führten Reihenuntersuchungen speziell zur Prüfung der Angaben Heidels durch.

Fragestellungen:

1. Typenbestimmbarkeit in Abhängigkeit von der Menge angetrockneten Blutes:

- a) Ermittlung der *geringsten Blutmenge*,
- b) *zeitliche Nachweisgrenze* bei Vorlage einer ausreichenden Blutmenge.

* Fr. Helene Ösze sei für die tatkräftige Hilfe herzlich gedankt.

2. Einfluß der *Intervalle* zwischen Alter der Spuren, Zeitpunkt der Asservierung und der Untersuchung auf die Befunderhebungen unter Berücksichtigung von Lichteinfluß, in trockener oder feuchter Umgebung.

III. Methode und Material

a) *Spurenträger*. Filterpapierplättchen (Whatman), Durchmesser 0,6 cm beschickt mit jeweils konstanter Blutmenge (0,03 ml = 9—10 mg), des weiteren mit Mengen, die nach Trocknung ca. 1,5; 3; 6; 9 mg Trockenblut ergaben. Textilgewebe wie Objektträger ausgewaschen bzw. gereinigt, mehrfach gespült, getrocknet.

Flanell mit 0,1 ml Blut getränkt; Objektträger desgl. = 25—28 mg Trockenblut.

Daneben wurde verglichen, welche Übertragungsverluste beim Vergleich Filterpapier — Glasplatte bestehen (1,5; 3; 6; 9; 15; 20 mg Trockenblutmengen gegenübergestellt).

b) *Blut* wurde unmittelbar nach Entnahme mit geeichter Mikropipette auf Spurenträger getropft oder mit ACD versetzt, zentrifugiert 2000 U/min —, das Erythrocytenkonzentrat verwendet. ACD-Blut wurde zur Herstellung von Verdünnungsreihen verwendet (0,005 bis 0,03 ml).

c) *Weiterbehandlung*. Lichtundurchlässiger Schrank bzw. Labortisch bei Raumtemperatur bzw. feuchter Kammer. Wurde Material eingefroren, dann bei — 40°C.

d) Verimpfung in der bekannten Technik; Elektrophorese nach Biotest-Methode.

e) Befunderhebungen stets unter Kontrolle eines nicht über die Bedingungen orientierten Mitarbeiters. Fleckengröße, Farbintensität und Lokalisation der Typen konnten durch Kontrollen mit Frischbluten standardisiert werden.

IV. Ergebnisse

Zu II. 1a). Eine von Filterpapier aufgesogene und angetrocknete Blutmenge ist noch bis zu 16 Std zu befunden. Mit abnehmender Blutmenge werden die Reaktionen schwächer: der Phänotyp war bei Vorlagen von 0,02 ml Blut zweifelsfrei nur noch bis zu 8 Std zu diagnostizieren. Dies gilt für bei Zimmertemperatur gelagerte Spuren.

Unter Versuchsbedingungen ist die kleinste Blutmenge zwar zu ermitteln, in praxi ist es schwer, die einem Spurenträger anhaftenden Trockenblutmengen abzuschätzen.

Schwerd und Spies haben bei Testungen der Eiweißdifferenzierung nach Uhlenhuth-Ouchterlony daran erinnert, „daß die Feststellung der für eine positive Reaktion erforderlichen *Mindestflecken* gewiß insofern auf Schwierigkeiten stößt, als bekanntlich die Saugfähigkeit der Gewebe eine wesentliche Rolle spielt. So ergaben aus einer Capillare mit 1 mm² Durchmesser abgetropfte Bluts tropfen:

auf Seide	einen Flecken von 6,5 cm ²
auf Leinen	einen Flecken von 4,3 cm ²
auf Hemdenpopeline	einen Flecken von 2,7 cm ²
und bei dicken Wollgeweben	einen Flecken von 1,1 cm ²

Wir ermittelten: 0,2 ml spitzauslaufende Blaubrandpipette (Versuch 1—10) bzw. 1,0 ml Pipette (Versuch 11—18).

Tropfvolumina. Senkrecht gehaltene Pipette, freier Fall. In der Tabelle 2 sind Feuchtgewicht, Trockengewicht wie Gewichtsverlust gegenübergestellt. Wenn innerhalb von 16 Std bei Bestimmungen in Zimmertemperatur zur Trocknung gekommener Spuren noch eindeutige Ergebnisse zu erzielen sind, so nicht etwa

Tabelle 1. Identifizierung der SEP-Typen aus auf Filterpapier aufgetropften und bei Zimmer-temperatur angetrockneten Blutspuren

Aufgetropfte Blutmenge	Reaktionsstärke (in Klammern: Zahl der Untersuchungen)				Anzahl der Versuche
0,03 ml = ca. 9 mg	++ (4)	+(4)	± (4)	- (1)	13
0,02 ml = ca. 6 mg	+(3)	± (4)	- (1)		8
0,01 ml = ca. 3 mg	- (2)	- (1)			3
Spurenalter	8 Std	16 Std	24 Std	32 Std	
Anzahl der Versuche (9)		(9)	(5)	(1)	

Tabelle 2

Nr.	Volumen (ml)	Gewicht nach Auftröpfung (mg)	Gewicht nach 8 Std (mg)	Gewicht nach 24 Std (mg)	Gewichtsverlust in 24 Std (mg)
1	0,032	31,6	10,1	10,0	21,6
2	0,033	33,3	11,1	11,1	22,2
3	0,032	31,0	9,9	9,8	21,2
4	0,032	30,9	9,8	9,7	21,2
5	0,032	31,5	10,7	9,9	21,1
6	0,030	29,5	8,9	8,9	20,6
7	0,033	32,9	10,5	10,3	22,6
8	0,034	34,0	11,6	11,6	22,4
9	0,032	32,1	10,0	10,0	22,1
10	0,032	31,2	9,7	9,6	21,6
11	0,05	49,0	16,7	16,7	32,3
12	0,05	52,3	18,2	18,2	34,1
13	0,05	51,3	18,2	17,9	33,4
14	0,05	47,5	16,8 ^a	16,0	31,5
15	0,05	47,0	16,9 ^a	14,5	32,5
16	0,05	48,1	17,3 ^a	16,3	31,8
17	0,05	49,4	18,5 ^a	17,4	32,0
18	0,05	49,0	17,3 ^a	16,3	32,7

^a Abwägung nach 7 Std.

an einzelnen Blutspritzen, sondern zumindest an Mengen, die einem Blutstropfen entsprechen (s. Tabelle 1 und 2).

Zu II. 1b). Ein Tatort wird erst viele Stunden nach dem Geschehen entdeckt. Sinnvoll wäre es nur dann, Blutspuren von Opfern wie eventuell auch Tätern einer Typenbestimmung zuzuführen, wenn bei Vorliegen ausreichender Blutmengen auch die zeitliche Nachweisbarkeitsgrenze bekannt wäre.

Wir möchten letztere, unter nicht extremen äußereren Bedingungen auf 32 Std begrenzen, sofern mindestens 20 mg Trockenblut in die Testung eingeführt werden (Tabelle 3). — Damit beschränkt sich der Einsatz erheblich. Wird eine Tat aber so rasch entdeckt, daß Spuren nicht nur rechtzeitig gesichert, sondern in einem Labor sofort, ohne Verzug, speziellen Untersuchungen zugeführt werden können?

Tabelle 3. Bestimmbarkeit der SEP-Typen in auf Glasplatten bei Zimmertemperatur getrockneten Blutspuren

Angetrocknete Blutmenge	Reaktionsstärke (in Klammern Zahl der Untersuchungen)					Anzahl der Versuche
20 mg	++ (4)	++ (2)	+(4)	+(4)	± (4)	$\left\{ \begin{array}{l} (+2) - (1) \\ (\pm 2) \end{array} \right.$ 19
15 mg	++ (2)	++ (2)	+(2)	$\left\{ \begin{array}{l} + (1) \\ \pm (1) \end{array} \right\}$		- (1) - (1) 10
9 mg	++ (9)	+ (3)	$\left\{ \begin{array}{l} + (3) \\ \pm (5) \end{array} \right\}$		- (1) - (1)	22
6 mg	+ (2)	± (2)	- (1)	- (1)		6
3 mg	± (2)	- (1)	- (1)	1 (1)		5
Spurenalter	8 Std	16 Std	24 Std	32 Std	40 Std	48 Std
Anzahl der Versuche	(19)	(10)	(16)	(9)	(6)	(2)

Tabelle 4. Typenbestimmbarkeit von Trockenspuren nach Einlagerung unter einer Temperatur von -40°C

Lagerung bei Zimmertemperatur	Reaktionsstärke (in Klammern: Zahl der Untersuchungen)						Anzahl der Versuche
Alter der Blutspuren	8 Std	++ (2)	+ (3)	+ (1)			34
		+ (5)	+ (10)	± (2)	± (4)	± (4)	
vor Verbringen	16 Std	+ (5)	+ (2)	± (5)	- (1)	- (1)	22
		± (3)	± (3)				
in die Kälte	24 Std	± (4)	- (1)	- (1)			6
Tagen	1	2	3	4	7	14	
Anzahl der Versuche	(16)	(16)	(9)	(10)	(6)	(5)	

Tabelle 5. Typenbestimmbarkeit der Feucht- sowie Trockenspuren bei Zimmertemperatur

	Reaktionsstärke (in Klammern Zahl der Untersuchungen)					Anzahl der Versuche
Trockenspuren	++ (12)	+ (3)	+ (4)	± (4)		47
	+ (5)		± (12)	- (7)		
Feuchtspuren	++ (4)	++ (2)	++ (3)	+ (2)	+ (1)	16
			+ (1)		± (3)	
Spurenalter	8 Std	16 Std	24 Std	32 Std	40 Std	
Anzahl der Versuche	(21)	(5)	(20)	(13)	(4)	

Unter anderen Problemstellungen bearbeiteten Dotzauer und Jarosch Tötungsdelikte und stellten fest, daß sie sich vorwiegend an Wochenenden ereignen. Nach Entdeckung der Tat müßte ein Sachverständiger sofort, im ersten Angriff, zur Spurenabsicherung zugezogen werden. Das Spektrum zu testender Blutgruppensysteme hängt davon ab, ob Material in ausreichender Menge, sauber, mit entsprechenden Kontrollen, asserviert wird. — Gezielt wurde das lange Wochenende zur Diskussion gestellt: Als Folge der Arbeitszeitverkürzung, ohne Einsatz erfahrener Kräfte, ist das technische Personal unserer Institute während des Wochenendes und an Feiertagen überhaupt nicht oder nur begrenzt für hochqualifizierte Untersuchungen einsatzfähig.

Wir versuchten abzuklären, ob es unter diesen Kautelen nicht zweckdienlich wäre, gesichertes Spurenmaterial bis zur Untersuchung in einer Tiefkühltruhe (-40°C) zu verwahren. — Durch Vorversuche hatten wir geklärt, daß bei Zimmertemperatur oder im Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$) aufbewahrtes Trockenblut nach 2 Tagen keine sicheren Befundungen mehr zuläßt (Tabelle 2). Auf der Ordinate sind Trocknungszeiten *vor* Asservierung eingetragen, auf der Abszisse Aufenthaltsdauer der Trockenspur bei -40°C . Nach Entnahme der Proben aus der Tiefkühltruhe wurde sofort untersucht. Wird Blut, das 8 Std bei Zimmertemperatur hat trocknen können, in die Tiefkühltruhe verbracht, ist eine zweifelsfreie Bewertung noch bis zu 3 Tagen möglich.

War die Spur bereits bis zu 16 Std alt, so sind *sichere* Befunde stets nach einer Kühlzeit bis zu 24 Std, gelegentlich bis zu 48 Std, zu erheben.

Es waren jeweils etwa 10 mg Trockenblut getestet; aufgetropft auf Filterpapier, Glas, aber auch Flanell. — Filterpapier und Glas sind idealere Spurenträger als saugfähiges Flanell. Zur Ermittlung von Nachweisgrenzen wurde 8 Std auf Flanell bei Raumtemperatur angetrocknetes Blut in die Kälte (-40°C) gegeben. Nach längstens 4 Tagen waren alle Versuche *ergebnislos*, bei Glas und Filterpapier aber längstens nach 7 Tagen. — Der Lichteinfluß während der Antrocknungszeit ist bedeutungslos.

Typenbestimmungen sind in einer bei Zimmertemperatur in *feuchter* Kammer asservierten Probe besser, d. h. länger durchführbar, wobei es sich lohnt, Feuchtproben nach Asservierung in die Tiefkühltruhe einzugeben, sofern nicht sofort untersucht wird.

Literatur

- Dotzauer, G., Jarosch, K.: Tötungsdelikte (im Druck).
 Heidel, G.: Die spurenkundliche Bedeutung der Typen der sauren Erythrozytenphosphatase. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **63**, 37 (1968).
 Radam, G., Strauch, H.: Elektrophoretische Darstellung der sauren Erythrozytenphosphatase. *Z. klin. Chem.* **4**, 234 (1966).
 Smerling, M.: Bestimmung der sauren Erythrozytenphosphatase an alten Blutalkoholproben und in Blutspuren. *Arch. Kriminol.* **144**, 161 (1969).
 Schwerd, W., Spies, G.: Der Einfluß des Spurenalters bei der Eiweißdifferenzierung nach Uhlenhuth-Ouchterlony. *Arch. Kriminol.* **143**, 170 (1969).

Professor Dr. G. Dotzauer
 D-5000 Köln-Bayenthal
 Von-Groote-Str. 46

Dr. T. Nagata
 Assistant-Professor
 Department of Legal Medicine
 School of Medicine
 Kyusyu University
 Fukuoka, Japan