

Originalarbeiten — Original Papers

Spurenkundliche Identifizierung von Neugeborenen- bzw. Fetalblut mittels alpha₁-Fetoprotein-Präcipitation

D. Patzelt, G. Geserick und E. Lignitz

mit technischer Assistenz von H. Schröder und G. Pommeranz

Institut für Gerichtliche Medizin des Bereiches Medizin (Charité)
der Humboldt-Universität Berlin

Eingegangen am 20. November 1973

**Identification of Blood Stains from Newborns or Fetuses
by Means of Alpha₁-fetoprotein-precipitation**

Summary. Determination of alpha₁ fetoprotein (AFP) was carried out by means of immuno-electroosmophoresis in agar gel and the use of a specific (anti-AFP) rabbit immune serum. The detection of AFP in experimentally produced blood stains from newborns was still possible after 3 months storage at room temperature. A positive result in the examination of blood stains is an important clue that the stain may originate from a fetus, a newborn or a very young infant (rare exceptions are possible in adults with neoplastic diseases, especially with primary liver carcinoma).

Zusammenfassung. Zur spurenkundlichen Identifikation von Blutspuren kann der Nachweis des alpha₁-Fetoproteins (AFP) in der Überwanderungselektrophorese mittels Heteroimmunserums herangezogen werden. Eine AFP-positive Spur lässt auf Herkunft von einem Feten oder Neugeborenen (bzw. sehr jungen Säugling) schließen, wobei differentialdiagnostisch lediglich eine Verursachung durch Patienten mit seltenen Krebserkrankungen (insbesondere mit primärem Lebercarcinom) in Betracht gezogen werden muß. Die Untersuchung künstlich erzeugter Spuren von Neugeborenenblut erbrachte nach Lagerung bei Zimmertemperatur eine Nachweisbarkeit des AFP für bisher 12 Wochen Lagerungszeit.

Key words: Alpha-Fetoprotein — Präcipitation — Fetalblut, Spurenkunde — Neugeborenenblut, Spurenkunde — Spurenkunde, Nachweis von Neugeborenen- und Fetalblut.

Gegenwärtig existieren mehrere Methoden, Neugeborenen- bzw. Fetalblut von Erwachsenenblut zu unterscheiden, was kriminalistisch bedeutsam sein kann.

Geeignet dafür sind sowohl Merkmale der Erythrocyten als auch des Serums. Das Hb F des Fetal- und Neugeborenenblutes kann durch seine Alkaliresistenz und seine unterschiedliche elektrophoretische und chromatographische Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber Hb A diagnostiziert werden, aber auch durch spezifisch präcipitierende Anti-Hb-F-Seren. Die letztgenannte Methode ist in der Spurenkunde erfolgreich einsetzbar, während sich die anderen Merkmale hierfür weniger eignen (Übersicht bei Prokop, 1966; Schleyer, 1966).

Neugeborenenmerkmale des Serums sind die von Forster u. Joachim beschriebenen Besonderheiten im Gc-System [5] und die von Prokop beobachtete neu geborenen- und kleinkinderspezifische Ausbildung des alpha₂-Makroglobulin-präcipitates in der Immunelektrophorese [16]. Beide Merkmale sind wegen der geringen immunelektrophoretischen Positionsunterschiede im Vergleich zu Seren Erwachsener in der Spurenkunde kaum verwertbar. Gleichfalls als ungeeignet für

die Spurenkunde erwies sich die von Geserick *et al.* [7] gefundene Doppelung der Albuminbande bei stärkegelektrophoretischer Untersuchung von Neugeborenenseren. Da sich aus Blutspuren von Erwachsenen nahezu identische Auftrennungsbilder darstellen lassen, ist sie nur zur Differenzierung nativer Blutproben verwertbar [13].

Ein weiteres Serummerkmal des Feten bzw. Neugeborenen ist das 1956 von Bergstrand u. Czar beschriebene alpha₁-Fetoprotein (AFP) [3], das in fetalen und neonatalen Blutproben stets nachweisbar ist, aber auch bei Erwachsenen mit bestimmten malignen Tumoren vorkommt.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Verwertbarkeit des AFP in der Spurenkunde an Hand experimentell erzeugter und bei verschiedenen Bedingungen gelagerter Blutspuren.

Material

Blutproben: Durch Citratusatz ungerinnbar gemachte Nabelvenen- und ebenso präparierte Erwachsenenblute wurden auf verschiedene Trägermaterialien (Holz, Glas, Stoff und Papier) aufgebracht, angetrocknet und bis zu 12 Wochen bei Zimmertemperatur gelagert. Aus einer älteren Spurensammlung stammten Nabelvenen- und Erwachsenenblutspuren, die 2 Jahre bei Zimmertemperatur gelagert worden waren, und ebensolche, die sich 2 Jahre im Kühlraum bei ca. 8°C befanden.

Antiserum: Das zu allen Testungen verwendete Antiserum wurde durch Kaninchenimmunisierung mit einem Nabelvenenserumpool und nachfolgender Absorption mit Erwachsenenserum (vgl. Müller u. Geserick, 1972) erzeugt.

Untersuchungsmethoden

Spurenaufbereitung: Aus der getrockneten Blutspur wurde eine etwa 3 cm² große Fläche abgekratzt oder im Falle von Stoff oder Papier als Spurenträger ausgeschnitten. In einem Zentrifugenglas konnte durch tropfenweises Hinzufügen von Aqua dest. die Spur so auf- bzw.

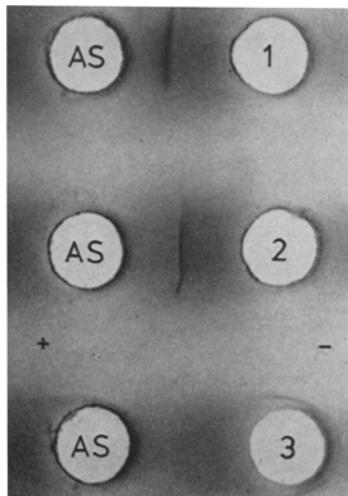


Abb. 1. Darstellung des AFP in der Überwanderungselektrophorese aus Neugeborenenserum (Proben 1 und 2), Probe 3 negative Kontrolle (Erwachsenenserum). Antiserum (AS) Anti-AFP vom Kaninchen

herausgelöst werden, bis die Füllmenge für einen Tüpfel in der Überwanderungselektrophorese gewonnen werden konnte.

Überwanderungselektrophorese: Als Trägermedium wurde ein 1%iges Agargel verwendet, das mit einem Veronal-Na/Na-Aacetat/HCl-Puffer (pH 8,1) nach Pesendorfer *et al.* [14] versetzt war. Mit dieser Methode sind bereits 2—4 Std nach Elektrophoresebeginn gute Ergebnisse zu erzielen. Bei Verwendung von Agargel wandert das Hämoglobin der Blutspur im Gegensatz zur Agarose kathodisch und stört die Präcipitation nicht (Abb. 1).

Ergebnisse

Sowohl die 12 Wochen bei Zimmertemperatur als auch die bis zu 2 Jahren bei 8°C gelagerten Blutspuren von Neugeborenen zeigten mit dem vorliegenden Antiserum eindeutige Präcipitate. Einige in Vorversuchen negative Ausfälle konnten nach Verwendung einer größeren Spurensubstanzmenge korrigiert werden. Bei den Spuren, die aus unausgelesenen Erwachsenenblut hergestellt worden waren, fehlte das Präcipitat stets. Die 2 Jahre bei Zimmertemperatur gelagerten Spuren von Erwachsenen- und Neugeborenenblut erbrachten mit dem verwendeten Antiserum keine Präcipitate, reagierten jedoch stets mit einem Anti-Mensch-Serum vom Kaninchen und z. T. mit einem solchen vom Pferd.

Diskussion

Nach dem bisherigen Wissensstand über das AFP kann davon ausgegangen werden, daß dieses Merkmal bei Neugeborenen stets nachweisbar ist, was auch in der eigenen Arbeitsgruppe unter Verwendung der Überwanderungselektrophorese gezeigt werden konnte (Müller u. Geserick, 1972). Zum Zeitpunkt der Geburt soll die Serumkonzentration nur noch 1% des Konzentrationsgipfels der frühen Fetalperiode betragen [2]. In den ersten Lebenswochen kommt es zu einem weiteren Konzentrationsabfall, so daß das AFP mit dem Immunodiffusionstest bei gesunden Kindern nach dem 1. Lebensmonat nicht mehr auffindbar ist [9]. Im Serum gesunder Erwachsener (auch Schwangerer) ist das Protein mit Immunopräcipitationstechniken nicht nachweisbar [2, 4, 11, 12, 22]. Allerdings zeigen es Erwachsene mit primärem Lebercarcinom — einer sehr seltenen Erkrankung — in einer Häufigkeit von maximal 50—90% (abhängig von der Nachweismethode, der untersuchten Population und der Krankheitsphase) (Übersicht bei Uriel, 1971; Elgort *et al.*, 1972; Lehmann u. Lehmann, 1973), wobei die Serumkonzentration geringer ist als bei Feten oder Neugeborenen. Ein Vorkommen bei anderen malignen Geschwülsten (insbesondere mit Lebermetastasen) ist möglich, jedoch ist der Prozentsatz (bzw. die Konzentration) gering (nach Lehmann u. Lehmann (1973) sind positive Befunde bei diesem Patientengut in höchstens 2% der Fälle zu erwarten, wenn Immunopräcipitationstechniken verwendet werden). Das im Schrifttum erwähnte Auftreten von AFP bei gesunden Erwachsenen, bei Schwangeren und Hepatitispatienten [1, 4, 6, 19, 21] bezieht sich auf hochempfindliche Nachweismethoden und braucht deshalb für unsere Untersuchungen nicht berücksichtigt zu werden (vgl. hierzu Lehmann u. Lehmann, 1973).

Für die spurenkundliche Analyse ist der Einsatz der Überwanderungselektrophorese als zweckmäßig anzusehen, da diese Methode hochspezifisch ist und eine größere Empfindlichkeit als der Immunodiffusionstest besitzt, aber wiederum

nicht so empfindlich ist, daß „falsch-positive“ Befunde (z. B. bei Schwangeren oder Hepatitispatienten) erhoben werden könnten. Über den Einfluß der gewählten Nachweismethode auf das Ausmaß „falsch-positiver“ Ergebnisse haben Elgort *et al.* (1972) und besonders umfassend Lehmann u. Lehmann (1973) berichtet. Die Möglichkeit eventueller unspezifischer Kreuzreaktionen mit Fetoproteinen von Hund oder Katze beim AFP-Nachweis [10, 20] braucht den spurenkundlichen Untersucher nicht zu schrecken, da die Sicherung der Artspezifität „Mensch“ am Anfang der spurenkundlichen Analyse zu stehen hat.

Bei Vorliegen einer AFP-positiven Blutspur kann also der Untersucher mit großer Wahrscheinlichkeit auf Herkunft von einem Feten oder Neugeborenen (bzw. sehr jungen Säugling) schließen, wobei lediglich noch die Verursachung durch Patienten mit bestimmten seltenen Krebserkrankungen in Betracht gezogen werden muß.

Nachtrag bei der Korrektur:

Weitergeführte Untersuchungen künstlich erzeugter Spuren von Neugeborenenblut erbrachten nach Lagerung bei Zimmertemperatur eine Nachweisbarkeit des AFP für bisher 6 Monate Lagerungszeit.

Literatur

1. Abelev, G. I.: Alpha-fetoprotein production by normal liver and liver tumors. Protides of the Biological Fluids, Vol. 18. Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig: Pergamon Press 1971
2. Alpert, E., Zuckerman, J.: Absence of alpha₁-fetoprotein antigen or antibody in maternal serum. Lancet 1970 II, 465
3. Bergstrand, C., Czar, B.: Demonstration of a new fraction in serum from the human fetus. Scand. J. clin. Lab. Invest. 8, 174 (1956)
4. Elgort, D. A., Abelev, G. I., O'Conor, G. T.: Dependence of the specificity of the serologic test for primary liver cancer in different areas of the world on sensitivity of the method used for detecting alpha-fetoprotein. Int. J. Cancer 10, 331 (1972)
5. Forster, B., Joachim, H.: Besonderheiten der Ge-Präzipitate im Kindesalter. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 63, 6 (1968)
6. Geserick, G.: Das Australia-Antigen (Au/SH/HAA). Dissertation (Prom. B), Humboldt-Universität Berlin 1973
7. Geserick, G., Marth, H., Hackbarth, I.: Eine neue stärkegelektrophoretisch nachweisbare Albuminvariante im Serum von Neugeborenen. Kriminal. forens. Wiss. 6, 25 (1971)
8. Lehmann, F.-G., Lehmann, D.: Vergleich verschiedener Methoden zum serologischen Nachweis von alpha₁-Fetoprotein im Serum. Z. klin. Chem. 11, 339 (1973)
9. Masopust, J., Tomasova, H., Kotal, L.: Some physicochemical characteristics of human alpha-fetoprotein. Protides of the Biological Fluids, Vol. 18. Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig: Pergamon Press 1971
10. Masopust, J., Zizkowsky, V., Kithier, K.: Fetoproteins in different species of mammals. Protides of the Biological Fluids, Vol. 18. Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig: Pergamon Press 1971
11. Masseyeff, R., Basteris, B., Leblanc, L.: Use of the alpha-fetoprotein test for diagnosis of primary liver cancer. Protides of the Biological Fluids, Vol. 18. Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig: Pergamon Press 1971
12. Müller, G. M., Geserick, G.: Die Anwendung des alpha-Fetoproteins bei der Diagnose des primären Leberzellkarzinoms. Z. inn. Med. 27, 1084 (1972)
13. Patzelt, D., Lignitz, E., Geserick, G., Müller, G. M.: Serologische Charakteristika fetaler und perinataler Blutproben. Vortrag auf der 4. Tagung der Gesellschaft für Gerichtliche Medizin der DDR, Magdeburg 1973
14. Pesendorfer, F., Krassnitzky, O., Wewalka, F.: Immunoelectrophoretischer Nachweis von hepatitis-associated-antigen (Au/SH-Antigen). Klin. Wschr. 48, 58 (1970)

15. Prokop, O.: Forensische Medizin. Berlin: VEB Volk und Gesundheit 1966
16. Prokop, O., Patzelt, D., Rackwitz, A.: Kriminalistische Hinweise durch die Immun-elektrophorese menschlicher Seren. Immuninformation 1, 29 (1971)
17. Ruoslahti, E., Seppälä, M.: Alpha-fetoprotein in normal human serum. Nature (Lond.) 235, 161 (1972)
18. Schleyer, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung. Lübeck: Schmidt-Römhild 1966
19. Smith, J. B.: Occurrence of alpha-fetoprotein in acute viral hepatitis. Int. J. Cancer 8, 421 (1971)
20. Tatarinov, Y. S.: Neue Daten über embryospezifische Antigen-Komponenten im Blutserum des Menschen (russ.). Vop. med. Khim. X, 584 (1964)
21. Tsvetkov, S., Abelev, G. I., Birjulina, T. I., Olovnikov, A. M., Elgort, D. A., Goussev, A. I., Perova, S. D., Jazova, A. K., Rubtsov, I. V., Shebalina, S. V., Kantorovitsch, R. A., Tur, V. M., Levina, D. M.: The application of highly sensitive tests for detecting alpha-fetoprotein in patients' sera. Antigen-antibody reactions. Jena: VEB Fischer 1971
22. Uriel, J.: Transitory liver antigens and primary hepatoma. Protides of the Biological Fluids, Vol. 18. Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig: Pergamon Press 1971

Dr. D. Patzelt
Institut für Gerichtliche Medizin
der Humboldt-Universität
DDR-104 Berlin, Hannoversche Straße 6
Deutsche Demokratische Republik