

Ein photometrischer Schwangerschaftsnachweis an Blutspuren durch Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) Modifikation der Technik nach Oya, Asano und Fuwa

I. Oepen und W. Köhler

Institut für Rechtsmedizin der Universität
Bahnhofstraße 7, D-3550 Marburg/Lahn

A Photometric Method for the Diagnosis of Pregnancy in Blood Stains by Determination of Heat-Stable Alkaline Phosphatase (EC 3.1.3.1). A Modification of Oya, Asano and Fuwa's Technique

Summary. A quantitative method, described by Oya and coworkers was modified. In this way, venous blood from pregnant and nonpregnant women in blood stains can be reliably differentiated up to at least 19 months storage although as a qualitative test only. 1–3 cm² of cloth stained with blood is needed and even less from placental blood stains.

Zusammenfassung. Die von Oya u. Mitarb. beschriebene quantitative Methode wurde modifiziert und erlaubt nun eine sichere, wenn auch nur qualitative Aussage zur Unterscheidung von venösem Schwangeren- und Nichtschwangerenblut an Blutspuren bis zu einem Alter von mindestens 19 Monaten bei einer Ausgangsmenge von 1–3 cm² Fleckenstoff. Für Plazentablut genügt eine noch geringere Spurenmenge.

Key words. Alkalische Phosphatase, Schwangerschaftsnachweis an Blutspuren – Blutspuren, Schwangerschaftsnachweis – Schwangerschaftsnachweis an Blutspuren – Spurenkunde, Schwangerschaftsnachweis

Oya u. Mitarb. haben 1973 in dieser Zeitschrift eine photometrische Methode zum Schwangerschaftsnachweis an Blutflecken mit Hilfe der hitzestabilen Fraktion der alkalischen Phosphatase angegeben. Entsprechend dem Anstieg des Enzyms in der zweiten Hälfte der Gravidität bis zur Geburt war die Aktivität zwischen der 30. und 40. Schwangerschaftswoche am höchsten. An Spuren von Schwangerenblut wurde nach vier Wochen Lagerung keine Aktivitätsminderung festgestellt. Die Methode wurde wegen der einfachen Technik für die Routine empfohlen.

Die Nachprüfung der von Oya u. Mitarb. beschriebenen Technik (Angaben s. Oya u. Mitarb.) ergab nur an hämolysefreiem Serum brauchbare Resultate. Hämolytische Seren und vor allem Blutspuren zeigten erhöhte Werte durch Produkte, die sich nach Ausfällen mit 10%iger Trichloressigsäure (die der Reaktionslösung zur Unterbrechung der Enzymreaktion zugegeben wird) nicht vollständig sedimentieren ließen. Nach dem Zentrifugieren schwammen sie noch auf dem Überstand. Obwohl es sich nur um geringe Mengen handelte, verfälschten diese Substanzen die Extinktionswerte im Sinne

einer Meßwerterhöhung, da sie nach Zufügen von 0.2N NaOH in dem nun alkalischen Milieu in Lösung gingen. Oya gestand auf Anfrage eine durch Hämolyse bedingte Fehlerquelle zu, die noch ausgeschaltet werden müsse. Die große Schwankungsbreite der von Oya u. Mitarb. angegebenen Werte ist vermutlich durch diesen Störfaktor bedingt und wirft die Frage auf, ob eine quantitative Bewertung für die Diagnose „Schwangerenblut“ angebracht und überhaupt notwendig ist.

Material

14 Seren von Müttern z.Zt. der Geburt

3 Seren von nichtschwangeren Personen

Untersuchungen vor und nach künstlich durch Schütteln verursachter Hämolyse und nach unterschiedlich langer Alterung bis zu 20 Tagen bei etwa 20°C

25 Schwangerenblutflecken

Untersuchungen nach unterschiedlich langer Lagerung bis zu 19 Monaten bei etwa 20°C

3 Plazentablutflecken nach Lagerung von 19 Monaten bei etwa 20°C

2 Blutflecken von nichtschwangeren Personen

Untersuchungen im Verlaufe der Lagerung bis zu 5 Monaten bei etwa 20°C

1 Blutfleck von einer nichtschwangeren Person nach Lagerung von 6 Jahren bei etwa 20°C, z.T. mit Schimmel bewachsen.

Alle Blutflecken waren auf Leinen getropft und getrocknet worden.

Modifizierung der Technik und Ergebnisse

1. Die störenden Hämolyseprodukte konnten durch Filtrieren des Überstandes (statt Zentrifugieren) eliminiert werden.
2. Die Empfindlichkeit der Enzymreaktion wurde dadurch gesteigert, daß der von Oya u. Mitarb. verwendete Glycinpuffer durch einen Natriumkarbonat-Bikarbonat-Puffer ersetzt wurde, auf dessen bessere Eignung zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase Delory und King schon 1945 hingewiesen hatten.
3. Die Dauer der Enzymreaktion mit dem Substrat wurde von 1 h auf 24 h verlängert. Auf diese Weise konnten auch geringe Mengen älterer Spuren sicher beurteilt werden. Dieses Vorgehen war möglich, weil der forensische Schwangerschaftsnachweis – im Gegensatz zur klinischen Diagnostik – nur qualitativ geführt zu werden braucht. Denn nur die Alternativaussage „Schwangerenblut oder Nichtschwangerenblut“ ist von Bedeutung.
4. Da auf eine quantitative Aussage verzichtet wurde, erübrigte sich das Umrechnen in Enzymeinheiten, so daß die Auswertung vereinfacht wurde.

Mit dieser neuen Technik war der Nachweis der hitzestabilen alkalischen Phosphatase und damit die Diagnose „Schwangerenblut“ noch nach 19 Monaten an 1-3 cm² großen Schwangerenblutflecken mit Sicherheit möglich, während der Nachweis an Plazentablutflecken (wegen der höheren Aktivität des Enzyms im Plazentablut) bei noch geringerer Ausgangsmenge gelang. Falsch negative oder falsch positive Befunde wurden nicht beobachtet.

Eine Fehlerquelle stellen wahrscheinlich Schimmelkolonien dar, da eine gealterte, von Schimmel bedeckte Serumprobe eines männlichen Spenders einen gegenüber früheren Untersuchungen erhöhten Extinktionswert aufwies. Andere von Schimmel befallene Serumproben sowie die leicht verschimmelte 6 Jahre alte Spur vom Blut einer männlichen Person zeigten ebenfalls – wenn auch nicht so deutlich – erhöhte Werte.

Als mehr theoretische Fehlerquelle kommt das bisher nur in vereinzelt Fällen beschriebene Regan-Enzym in Betracht, das unabhängig von einer Schwangerschaft bei

Patienten mit Bronchial- und Lungenkarzinom festgestellt wurde und dieselben Eigenschaften wie die hitzestabile alkalische Plazenta-Phosphatase aufweist (Fishman, s. dort weitere Literatur).

Daten der modifizierten Technik

A. Lösungen

1. *Puffer* nach Delory und King, pH 10.05:
0.1 M (10.599 g/l) Na_2CO_3
0.1 M (8.4 g/l) NaHCO_3
2. *Substratlösung*
0.443 g Dinatrium-p-Nitrophenylphosphat (Merck Nr. 6850)
100 ml 0.001 N HCl
3. *Leerwert*
0.1 ml Serum oder 3 cm² große Vergleichsblutflecken + 0.5 ml Puffer
Erhitzen für 40 min. bei 60°C zur Eliminierung der hitzelabilen alkalischen Phosphatase
+ 1 ml 10%ige Trichloressigsäure
+ 0.5 ml Substratlösung
Filtern (Faltenfilter Schleicher & Schüll, Artikel Selecta Nr. 595 1/2)
0.5 ml Filtrat + 2 ml 0.2 N NaOH

B. Arbeitsgang

1. 3mal 1 cm² Blutfleckenstoff ausschneiden
2. 0.5 ml Puffer zugeben, der den Fleckenstoff bedecken soll
3. Eliminieren der hitzelabilen alkalischen Phosphatase durch Inkubieren des Ansatzes für 40 min bei 60°C
4. 0.5 ml Substratlösung zugeben
5. 24 h bei 37°C zur Enzymreaktion inkubieren
6. Unterbrechung der Enzymreaktion durch 1 ml 10%ige Trichloressigsäure
7. Filtern des Ansatzes (Filterpapier s. Leerwert)
8. 0.5 ml Filtrat + 2 ml 0.2 N NaOH
9. Extinktionsmessung im Eppendorf-Photometer bei 405 nm gegen den Leerwert
10. Bewertung: Bei Extinktionswerten über 0.1 liegt hitzestabile alkalische Phosphatase vor.

Detaillierte Angaben wie die Ermittlung des Extinktions-Grenzwertes von 0.1, der zugleich die – reichlich bemessene – Fehlerbreite berücksichtigt, bei Köhler.

Literatur

Delory, G., King, E.: A sodium carbonate-bicarbonate buffer for alkaline phosphatase. Biochem. J. 39, 245 (1945)

- Fishman, W.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Amer. J. Med.* **56**, 617-650 (1974)
- Köhler, W.: Über einen photometrischen Schwangerschaftsnachweis aus hämolysefreiem und hämolytischem Serum sowie aus getrockneten Blutflecken mit Hilfe der hitzestabilen alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1). Diss. Marburg 1976
- Oya, M.: Pers. Mitteilung
- Oya, M., Asano, M., Fuwa, I.: Quantitative estimation of heatstable alkaline phosphatase activity in dried blood stains and its application to the forensic diagnosis of pregnancy. *Z. Rechtsmedizin* **73**, 7-10 (1973)

Eingegangen am 22. März 1976