

Differenzierung getrockneter Spuren vom Blut Schwangerer, von fetalem Blut und Fruchtwasser durch die Bestimmung des Alpha-Feto-Proteins

K. Schumann

Frauenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover, D-3000 Hannover 51,
Podbielskistrasse 360, Bundesrepublik Deutschland

Dried Bloodstains from the Pregnant Mother, Fetal Blood, and Amniotic Fluid, Determination by Alpha-Feto-Protein

Summary. Alpha-feto-protein can be detected in the dried bloodstains of fetal blood, blood from pregnant women, and in the amniotic fluid by radioimmunoassay. Alpha-feto-protein alone is not sufficient from exact differentiation. In addition, quantitative analysis of the total protein or electrophoresis is required.

Key words: Bloodstains, pregnancy – Fetal blood – Alpha-feto-protein, bloodstain

Zusammenfassung. Alpha-Fetoprotein läßt sich durch radioimmunologische Bestimmung in den getrockneten Spuren von fetalem Blut, Schwangerenblut und Fruchtwasser nachweisen. Eine eindeutige Zuordnung durch den bestimmten Wert ist nicht möglich. Eine zusätzliche Bestimmung des Gesamteiweißes oder eine elektrophoretische Trennung ist erforderlich.

Schlüsselwörter: Blutspuren, Schwangerschaft – Fetales Blut – Alpha-Feto-protein, Blutspuren

Einleitung

Die Unterscheidung zwischen fetalem oder Neugeborenenblut und dem Blut Erwachsener kann bei Verdacht auf eine Kindstötung oder einem nicht legalen

Schwangerschaftsabbruch von Bedeutung sein. Durch den Nachweis des fetalen Blutfarbstoffs in elektrophoretischer Trennung ist eine Differenzierung zwischen dem Blut Erwachsener und fetalem Blut möglich (Wilkins und Oepen 1977).

Bei erhaltener Struktur der roten Blutkörperchen ist auch eine differenzierte Färbung und damit der Nachweis des fetalen Blutfarbstoffs eine relativ einfache Methode (Kleihauer et al. 1957).

Das Alpha-Feto-Protein-AFP, ein Protein rein fetalen Ursprungs, das sonst nur in geringen Mengen bei Lebererkrankungen und bösartigen Tumoren nachgewiesen werden kann, könnte zur Differenzierung zwischen Erwachsenenblut und Neugeborenenblut sowie dem Blut vom Feten herangezogen werden (Stufunski und Oepen 1977). Das Alpha-Feto-Protein ist ein saures Glyko-Protein mit einem Molekulargewicht von 64.000 und einem Kohlehydratanteil von 3,4%. Es wird in der menschlichen Fruchtanlage vorwiegend in der Leber und im Dottersack gebildet (Gitlin et al. 1972).

Im fetalen Blut beträgt die Konzentration in der 8. Schwangerschaftswoche etwa 5 mg/ml, um dann auf etwa 1 mg/ml in der 25. Schwangerschaftswoche und auf 0,1 mg/ml am Geburtstermin abzufallen (Schumann 1979).

Über den Urin des Feten gelangt Alpha-Feto-Protein in das Fruchtwasser und ist in der 16. Schwangerschaftswoche in der höchsten Konzentration mit 25 µg/ml nachzuweisen. Die Alpha-Feto-Protein-Konzentration wird zur Aufdeckung von Fehlbildungen im Bereich des Schädels und der Wirbelsäule in der pränatalen Diagnostik verwendet (Brock und Sutcliffe 1972; Weitzel und Schneider 1979). Im mütterlichen Blut liegen die Konzentrationen mit der Dauer der Schwangerschaft ansteigend am Geburtstermin am höchsten zwischen 100 und 500 ng/ml. Es scheint deshalb gerechtfertigt zu überprüfen, ob nicht nur in den Blutspuren vom Neugeborenen oder Feten, sondern auch in den Blutspuren Schwangerer und in Spuren von Fruchtwasser Alpha-Feto-Protein nachzuweisen ist.

Material und Methode

Mit dem Blut von Schwangeren zwischen der 32. und 41. Schwangerschaftswoche wurde vor Einsetzen des Gerinnungsvorgangs ein Filterpapier getränkt. Je 500 µl des gleichen Blutes wurden auf einen Objektträger aufgetropft und eingetrocknet. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur eine Woche gelagert und dann aus den Filterpapierproben eine 12 mm² große Fläche mit einem im Büro üblichen Locher ausgestanzt.

Von den Objektträgern wurden die Spuren abgekratzt. Zur Bestimmung der Konzentration des Alpha-Feto-Proteins wurde das handelsübliche Besteck RIAGNOST AFP (Behringwerke Marburg) mit einfachem Antikörper verwendet. Die maximale Genauigkeit liegt zwischen 40 und 150 ng/ml. Der niedrigste Vergleichsstandard enthält 6,5 ng/ml. Unter diesem Standard sind quantitative Angaben mit einem hohen Unsicherheitsfaktor behaftet. Bei Serienuntersuchungen wurde eine Varianz in der Serie (intra assay) von 6,9% gefunden, die Varianz von Tag zu Tag (inter assay) betrug 9,7%.

Zur Bestimmung der AFP-Konzentrationen im Fruchtwasser, die in der 16. Schwangerschaftswoche etwa 25.000 ng/ml beträgt, ist ein „Verdünnungsserum“ beigegeben. Die beiden Proben, die Stanze aus dem Filterpapier und die abgekratzten Blutspuren wurden in 200 µl dieses Serums für 24 Stunden geschüttelt, 100 µl kamen für eine Doppelwertanalyse zum Ansatz.

Achtzehn Fruchtwasserproben wurden auf Filterpapier aufgetragen und wie oben getrocknet und gelagert. Von diesen Proben waren 16 wegen genetischer Fragen in der 16. Schwangerschaftswoche durch Punktion gewonnen worden, 2 Proben wurden bei der Geburt entnommen.

Ergebnisse

Auf dem Filterpapier, das mit Schwangerenblut getränkt wurde, ließen sich nur geringe Mengen Alpha-Feto-Protein nachweisen, maximal 12 ng/ml. Die Konzentration in den vom Glas abgekratzten Blutspuren war höher und erreichte maximal 108 ng/ml (siehe Tabelle 1). In den getrockneten Fruchtwasserproben ließen sich naturgemäß die höchsten Konzentrationen in der 16. Schwanger-

Tabelle 1. AFP-Werte bestimmt aus getrockneten Blutproben Schwangerer auf Filterpapier und Glas

AFP ng/ml Filterpapier	AFP ng/ml Objektträger
10	32
8	31
12	32
15	52
26	87
31	108
16	46
7	31
6	25
6	22

Tabelle 2. AFP-Bestimmung aus mit Fruchtwasser getränktem Filterpapier. Hohe Konzentrationen in der 16. Schwangerschaftswoche, niedrige Konzentrationen am Entbindungstermin

SSW	AFP ng/ml	SSW	AFP ng/ml
16	230	16	165
16	221	16	148
16	151	16	130
16	184	16	109
16	125	16	74
16	59	16	56
16	66	16	37
16	42	40	6
16	35	41	8

schaftswoche mit maximal 460 ng/ml nachweisen. Am Termin enthielten die getrockneten Fruchtwasserproben maximal 8 ng/ml, und dieser Wert nähert sich damit der Nachweisgrenze (siehe Tabelle 2).

Diskussion

Im Blut Schwangerer steigt die AFP-Konzentration von durchschnittlich 30 ng/ml in der 14. Schwangerschaftswoche auf 100 bis 500 ng/ml am Termin an. Im Fruchtwasser liegt das Maximum bei durchschnittlich 25000 ng/ml in der 16. Schwangerschaftswoche, um auf 1000 ng/ml am Termin abzufallen.

In allen getrockneten Spuren von Blut und Fruchtwasser konnte AFP nachgewiesen werden. Eine Zuordnung zu einer Schwangerschaft ist also durch die in vielen klinischen Laboratorien übliche AFP-Bestimmung möglich. Eine Verwechslung könnte nur bei Blutspuren eines an einem Hepatom Erkranktem auftreten. Der unterschiedliche Grad der *Wiederfindung* in den über eine Woche gelagerten Spuren erklärt sich besonders dadurch, daß in den Proben auf Filterpapier eine undefinierte Menge Blut oder Fruchtwasser angesetzt wurde. Damit wurde die Voraussetzung in der Praxis simuliert, bei der auch die primäre Blutmenge unbekannt ist. Bei der hier verwendeten Methode sind die Ansätze nur durch die einheitliche Größe der Stanze aus dem Papier definiert. Im Gegensatz dazu waren die Proben auf den Objektträgern durch das einheitliche Volumen von 50 µl definiert. Unter Berücksichtigung des Haematokritwertes einer Schwangeren wurden also etwa 35 µl Serum angesetzt. Diese Proben wurden in 200 µl Verdünnungsserum gelöst, von dem 50 µl je Einzelbestimmung zum Ansatz kamen. Konzentrationen zwischen 18 ng/ml und 90 ng/ml wären also bei primär durchschnittlichen Serumkonzentrationen von 100 bis 500 ng/ml zu erwarten gewesen. Die tatsächlich gefundenen Werte lagen zwischen 20 und 108 ng/ml in diesem Bereich. Ein Verlust durch die Lagerung trat somit nicht auf.

Aus einer Blutspur undefinierten Volumens, das dürfte die Praxis sein, kann jedoch durch die Bestimmung der AFP-Konzentration nicht entschieden werden, ob es sich um das Blut einer Schwangeren, eines Neugeborenen oder eines Feten handelt oder aber um eine beliebige Blutspur, die mit Fruchtwasser verunreinigt wurde. Die letzte Möglichkeit hat aber wohl nur sehr theoretische Bedeutung. Eine eindeutige Zuordnung ist durch die Relation zu den übrigen Blutproteinen oder durch eine primäre elektrophoretische Darstellung möglich.

Literatur

- Brock DJH, Sutcliffe RG (1972) Alpha-Fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet* II: 197-199
- Gitlin D, Pericelli A, Gitlin GM (1972) Synthesis of alpha-fetoprotein by liver yolk sac and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res* 32:979-982

- Kleihauer E, Braun H, Betke K (1957) Demonstration von fetalem Haemoglobin in den Erythrozyten eines Blutausriches. *Klin Wochenschr* 35:637–638
- Schumann K (1979) Die Bedeutung des schwangerschaftsspezifischen beta-1-Glykoproteins (SP1) und des Alpha-Feto-Proteins (AFP) in der peri- und pränatalen Diagnostik. Habilitationsschrift, Hannover
- Stufunski M, Oepen I (1977) Nachweis von alpha-Fetoprotein an Blutspuren mit Hilfe der Celluloseacetatfolien-(CAF)-Elektrophorese. *Z Rechtsmed* 79:81–82
- Weitzel HK, Schneider J (eds) (1979) Alpha-Fetoprotein in clinical medicine. Thieme, Stuttgart, New York
- Wilkens R, Oepen I (1977) Nachweis von fetalem Hämoglobin in Blutspuren mit der Hilfe der Celluloseacetatfolien-(CAF)-Elektrophorese. *Z Rechtsmed* 79:79–80

Eingegangen am 16. Oktober 1987