

Zum Beweiswert des Schwangerschaftsnachweises an Blutspuren
mittels fotometrischer Aktivitätsbestimmung der hitzestabilen
alkalischen Phosphatase (hAP)

Reliability of the forensic diagnosis of pregnancy
from bloodstains by photometric determination of the heat-
stable alkaline phosphatase activity

M.-L. Glowatzki-Mullis

Gerichtlich-medizinisches Institut der Universität Bern, Bühl-
strasse 20, CH - 3012 Bern (Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Zink)

ZUSAMMENFASSUNG: *Der Nachweis von hitzestabiler alkalischer Phosphatase in einer Blutspur ist für das Vorliegen von Schwangerenblut und/oder Geburtsblut nicht beweisend. Es lässt sich im Einzelfall nicht ausschliessen, dass es sich dabei auch um Menstruationsblut oder um mit vaginalen Ausscheidungen vermengtes Verletzungsblut handeln kann.*

SUMMARY: *The presence of heat-stable alkaline phosphatase activity in blood stains cannot be considered to be indicative of venous blood of a woman in pregnancy and/or of blood from parturition. It cannot be excluded that such a blood stain could also originate from menstrual discharge or from blood that became mixed with vaginal secretions.*

EINLEITUNG

Auf einem öffentlichen Parkplatz eines Schweizer Ferienortes waren eine grosse Blutlache festgestellt und in der Umgebung ein blutiges Stoffstück sowie im Mülleimer einer Toilette ein durchbluteter Damenslip sichergestellt worden. Wir erhielten die Asservate von der Polizei um abzuklären, ob das Blut eventuell von einer Schwangeren bzw. von einer Geburt stammen konnte.

Im Rahmen der Untersuchungen führten wir an den Blutasservaten u.a. einen fotometrischen Nachweis zur Aktivität von hitzestabiler alkalischer Phosphatase durch, hatten doch Oepen und Köhler (1977) darauf hingewiesen, dass die von ihnen modifizierte Methode von Oya, Asano und Fuwa (1973) eine sichere Unterscheidung von venösem Schwangeren- und Nichtschwangerenblut erlaube, und dass dies auch für Plazentablut gelte.

Zur Kontrolle wurden von uns noch Menstruationsblutspuren zur Enzymreaktion angesetzt. Da sowohl in den polizeilichen Blutasservaten als auch in den Menstruationsblutspuren eine Enzymaktivität festgestellt werden konnte, führten wir zur Ueberprüfung dieses Befundes nunmehr an zahlreichen eingetrockneten Menstruationsblutproben eine fotometrische Bestimmung von durch hitzestabile alkalische Phosphatase freigesetztem p-Nitrophenol durch.

Eine im Menstruationsblut im Vergleich zu Blut aus dem Kreislauf erhöhte Enzymaktivität hatten bereits Smith, Hunter und Spadoni (1970) beschrieben, wobei allerdings nicht unterschieden wurde zwischen hitzestabiler und -labiler Fraktion des Enzyms. Dieselben Autoren wiesen - wie andere auch - ausserdem darauf hin, dass der Anteil an alkalischer Phosphatase in Geweben/Sekreten des weiblichen Genitaltraktes zyklusabhängig sei; sie stellten darüber hinaus in eigenen Untersuchungen fest, dass es bei der Behandlung von Patientinnen mit Gonadotropin zu einer starken Erhöhung der Enzymaktivität in der Cervixschleimhaut kommt,

und dass dies auch bei der Verabreichung von Progesteron-haltigen Präparaten der Fall sei.

Ohne näher darauf einzugehen, inwieweit die Untersuchungen von *Smith et al. (1970)* im einzelnen von anderen Autoren bestätigt wurden, erschien es uns angebracht, neben Menstruationsblutproben und Blutspuren von Frauen, die geboren hatten, zur Kontrolle auch einige unblutige Vaginalabstriche sowie Spermaspuren aus Notzuchtdelikten mitzuführen.

METHODEN

Material

- 91 Menstruationsblutproben (Tampons, Binden, Wäsche) von 28 Frauen
- Auf Baumwollstoff aufgetropftes Blut aus einer Fingerbeere von 23 der 28 Frauen
- 32 mit Blut befleckte Binden von 19 Frauen, die eben erst oder am Tag zuvor geboren hatten
- 8 Vaginalabstriche und 4 (mit Vaginalsekret vermengte) Spermaspuren (aus Notzuchtsachen; Schwangerschaftstest soweit bekannt negativ)
- Auf Baumwollstoff aufgetropftes Kapillarblut von männlichen Probanden (Leerwerte).

Fotometrischer Aktivitätsnachweis der hAP

Der Aktivitätsnachweis erfolgte mittels der von *Oepen und Köhler (1977)* modifizierten Technik nach *Oya, Asano und Fuwa (1973)*:

1. $3 \times 1 \text{ cm}^2$ (oder weniger) Spuren-/Kontrollmaterial ausschneiden und zerstückelt mit Carbonat-Puffer pH 10.05 nach *DeLory und King (1945)* bedecken.
Puffer: $0.1 \text{ M Na}_2\text{CO}_3 - 0.1 \text{ M NaHCO}_3 - 1:1$
2. Eliminieren der hitzelabilen AP; Inkubieren der Ansätze: 40 Min. bei 60°C .
Anmerkung: In der Vorschrift von *Oepen und Köhler (1977)* wird den ausgeschnittenen Probenstückchen $0,5 \text{ ml}$ Puffer zugegeben. Wegen der starken Saugfähigkeit der Tampons/Binden erhöhten wir die Menge zugegebenen Puffers in der Weise, dass nach dem Eliminieren der hitzelabilen AP $0,5 \text{ ml}$ Lösung herauspipettiert und in ein neues Röhrchen übertragen werden konnten.
3. $0,5 \text{ ml}$ Substratlösung zugeben und die Ansätze während 24 Std. bei 37°C zur Enzymreaktion inkubieren. Substratlösung: $0,443 \text{ g}$ 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz - MERCK Nr. 6850) in 100 ml 0.001 N HCl .
4. Unterbrechen der Enzymreaktion mit 1 ml 10%-iger Trichloressigsäure.
5. Ansätze durch Faltenfilter (S&S 595 1/2) filtrieren.
6. $0,5 \text{ ml}$ Filtrat (klar, farblos) mit 2 ml 0.2 N NaOH alkalisieren [Gelbfärbung bei positiver Enzymreaktion (Substratspaltprodukt: p-Nitrophenol)].
7. Absorptionsmessung gegen Leerwert (Absorptionsmaximum für p-Nitrophenol: $395\text{-}405 \text{ nm}$)
Leerwertansätze (Reihenfolge des Vorgehens): $1./2./4./0,5 \text{ ml}$ Substratlösung/
 $5./6./7.$ Leerwertersatz: männliches Probandenblut (Ansatz wie Spuren, 1.-7.)

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse sind in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellt.

Wesentlicher Befund unserer Untersuchungen ist, dass selbst ein hohes Absorptionsmaximum beim fotometrischen Aktivitätsnachweis von hAP im Einzelfall das Vorliegen von Blut einer Schwangeren oder von Blut, das die Geburtswege passiert hat, *nicht beweist*, sondern allenfalls als Hinweis hierfür interpretiert werden darf. Auch *Menstruationsblute* können einen sehr hohen Gehalt an aktivem Enzym aufweisen, und dies kann durchaus auch für *blutige Vaginalabstriche* einer Frau zutreffen, die z.B. bei einem Geschlechtsverkehr *verletzt* wurde. Um-

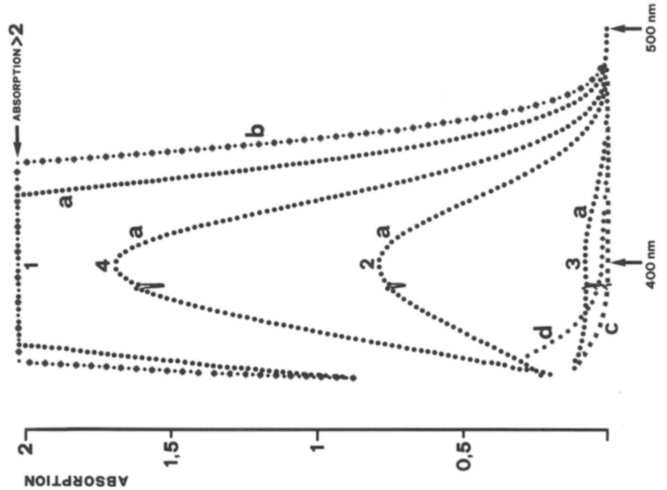


Abbildung 1
 Original nachgezeichnete spektralfotometrische Darstellung von in verschiedenen Spurensorten freigesetztem p-Nitrophenol.
a Menstruationsblute vom 1., 2., 3. und 4. Tag
b Geburtsblut
c Blut aus der Fingerbeere der menstruierenden Frau (= unterste Kurve)
d Tampon (Leerproube)
 Kurvenmaxima, die über 2 liegen, stellen sich spektralfotometrisch nicht mehr dar (A > 2)

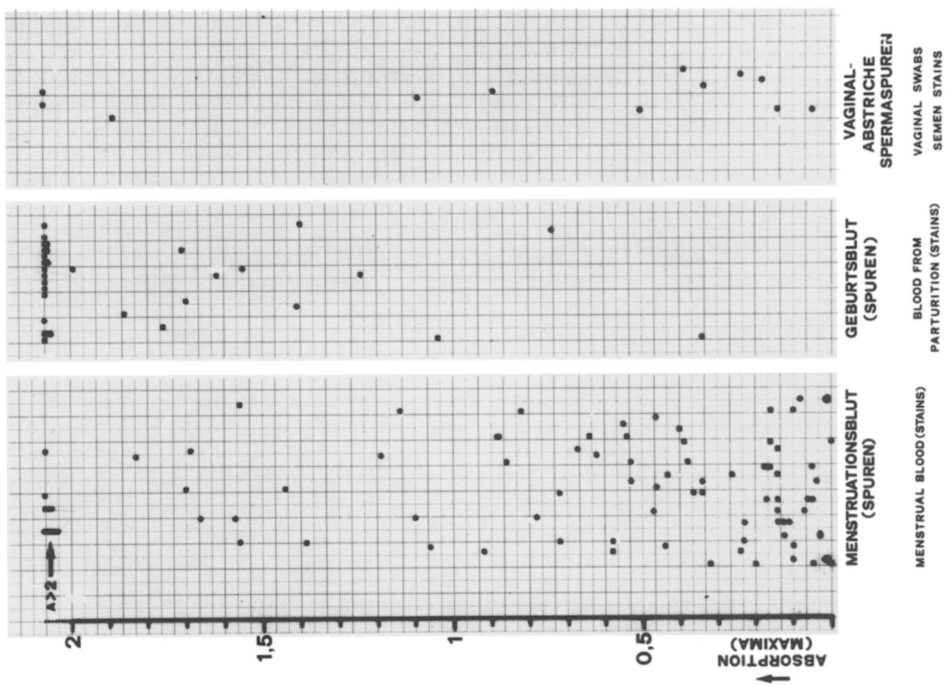


Abbildung 2
 Die spektralfotometrische Bestimmung des bei der Enzymreaktion freigesetzten p-Nitrophenols erfolgte im Wellenlängenbereich 350-500nm (Absorptionsmaximum für p-Nitrophenol: 395-405 nm); Leerwert: männliches Probandenblut
 Die Punkte in Abbildung 2 stellen das jeweilige Absorptionsmaximum der einzelnen Spektren dar. Bei den genau übereinander liegenden Punkten handelt es sich um Spurstichproben von zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Asservaten derselben Frau (z.B. Tampons vom 1., 2., 3. und 4. Tag der Menstruation). Kurvenmaxima mit einem höheren Absorptionswert als 2 sind am oberen Bildrand mit dem Vermerk A > 2 dargestellt.

gekehrt kann es vorkommen, dass Blutflecken von einer Geburt relativ wenig absorbieren; bei Berücksichtigung, dass Blute von Schwangeren eine rund 3-5 mal geringere Enzymaktivität aufweisen als Geburtsblutspuren (Oya et al. 1973, Oya 1985), fallen diese in einen Absorptionsbereich, in welchem immer mit dem Vorliegen von Menstruationsblut gerechnet werden muss, und in welchem auch Mischspuren aus Vaginal(-Sperma)sekret und Blut absorbieren. Der Aktivitätsnachweis von hitzestabiler alkalischer Phosphatase in Blutspuren lässt somit verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu. Aus einem positiven Aktivitätsnachweis darf jedenfalls nicht (wie bei Oya et al. 1973, Oya 1985, Oepen und Köhler 1977) vorbehaltlos (Ausnahme Regan-Enzym) auf Schwangeren-/Geburtsblut geschlossen werden. Welche der oben angeführten Interpretationsmöglichkeiten im Einzelfall die richtige ist, kann nur über weiterführende Untersuchungen zu klären versucht werden.

So haben wir zur Beurteilung des Absorptionsergebnisses des eingangs beschriebenen Falles sowie an Spurstichproben von Menstruationsbluten von 23 Frauen einen Schwangerschaftstest durchgeführt (ORTHO BETA-20 EIA MONOKLONAL). In keinem Ansatz liess sich beta-HCG (Human Chorionic Gonadotropin) nachweisen; im Gegensatz dazu war in allen Stichproben der Geburtsblute beta-HCG Schwangerschafts-indizierend vorhanden. Für späte Schwangerschaftsstadien dürfte sich auch der Nachweis von HPL (Human Placental Lactogen) eignen.

Da keine der untersuchten Blutspuren aus der Fingerbeere der Frauen, von welchen wir Menstruationsblut erhalten hatten, sich durch eine relevant stärkere Absorption vom männlichen Probandenblut unterschied, kann eine fotometrische Bestimmung der hAP im Venenblut als weiteres Kriterium herangezogen werden, ob eine Blutspur nun tatsächlich von einer menstruierenden Frau verursacht worden sein kann bzw. allenfalls von einer Frau stammen könnte, die beim Geschlechtsverkehr verletzt wurde; basierend auf den Befunden von Oya sowie Köhler müsste nämlich Blut von Schwangeren im Gegensatz dazu eine Enzymreaktion aufweisen.

Im eingangs geschilderten Fall bestätigten unsere Befunde (hAP, Schwangerschaftstest sowie weitere Untersuchungen) die Aussage der ermittelten Spurenverursacherin: überraschend starkes Einsetzen der Menstruation nach einem Geschlechtsverkehr.

LITERATUR

- Köhler W (1976) Ueber einen photometrischen Schwangerschaftsnachweis aus hämolysefreiem und hämolytischem Serum sowie aus getrockneten Blutflecken mit Hilfe der hitzestabilen alkalischen Phosphatase. Diss Marburg
- Oepen I, Köhler W (1977) Ein photometrischer Schwangerschaftsnachweis an Blutspuren durch Bestimmung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1). Modifikation der Technik nach Oya, Asano und Fuwa. Z Rechtsmed 79: 83-86
- Oya M, Asano M, Fuwa I (1973) Quantitative Estimation of Heat-stable Alkaline Phosphatase Activity in Dried Blood Stains and its Application to the Forensic Diagnosis of Pregnancy. Z Rechtsmed 73: 7-10
- Oya M (1985) Rechtsmedizinischer Nutzen der alkalischen Placenta-Phosphatase bei Kindstötung. Z Rechtsmed 94: 251-256
- Smith DC, Hunter WB, Spadoni LR (1970) Alkaline Phosphatase concentration in Cervical mucus. Fertil and Steril Vol 21 No 7: 549-554

Für die Mithilfe bei der Beschaffung von Menstruationsblutproben danken wir Frau B. Furrer, für die Asservierung von Geburtsblutspuren Herrn OA Dr. U. Herrmann, Universitäts-Frauenklinik Bern.