

Staatliche Bakteriologische Untersuchungsanstalt Würzburg
(Leiter: Dr. R. H. LAUN)

Beitrag zur Klärung des Blutalkoholschwundes bei länger gelagerten Seren

Von

E. GEHM und W. SCHMID

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Oktober 1961)

Der Blutalkoholkonzentration (BAK) wird in der Rechtsprechung eine erhebliche, in einzelnen Ländern und bei einzelnen Gerichten abweichende Beurteilung eingeräumt. Es darf aber nicht übersehen werden, daß die Zugrundelegung bestimmter BAK für bestimmte Alkoholkonzentrationen nur als allgemeine Richtlinie zulässig erscheint, nicht aber in jedem Einzelfall als Beweis für den tatsächlichen Grad der Alkoholkonzentration ohne Vorbehalt verwertbar ist. In erhöhtem Maß gilt diese Einschränkung bei der Verwertung von Nachuntersuchungsbefunden.

Als Voraussetzung zur Erhaltung gleichbleibender BAK auch bei längerer Lagerung wird hermetischer Verschluß der Venüle gefordert.

Allerdings dürfte ein analytisch merklicher Schwund der Äthylalkoholkonzentration durch Verdampfung aus dem Serum in den darüber befindlichen Gasraum, wie folgende physikalisch-chemischen Überlegungen zeigen, höchstens bei häufigerem Öffnen des Blut- bzw. Serum-Aufbewahrungsgefäßes zu erwarten sein.

Die an der Anstalt zum Aufbewahren der Seren benutzten Glasgefäße besitzen ein Fassungsvermögen von 2,5—3,0 ml. Die Gefäße werden mit Gummistopfen dicht verschlossen und enthalten normalerweise 1—1,5 ml Serum. Bei Kühlschranktemperatur (4° C) ist der Dampfdruck des reinen Äthylalkohols etwa 20 mm Hg. Nach dem Raoult'schen Gesetz ist der Gleichgewichtsdampfdruck eines Stoffes über der idealen Mischung im Verhältnis des Molenbruchs kleiner als über der reinen Phase. Man kann also für die Promillekonzentration des Alkohols annäherungsweise einen um den Faktor 10^3 niedrigeren Dampfdruck annehmen. Die Zustandsgleichung für verdünnte Lösungen lautet:

$$p v = n R T = \frac{a}{M} R T$$

Die Exponenten dieser Gleichung stellen dar:

- p = Dampfdruck des Alkohols in Atmosphären,
- v = Volumen des Gasraumes über dem Serum in Liter,
- a = Gewicht des verdampften Alkohols in Gramm,

M = Molekulargewicht des Alkohols,
 R = Gaskonstante des Alkohols,
 T = absolute Temperatur.

Man erhält für die Gewichtsmenge des verdampften Alkohols:

$$a = \frac{p v M}{R T}.$$

Tabelle 1 orientiert über den durch Verdampfung zu erwartenden Schwund. Die eingesetzten Verdampfungsvolumina stellen Höchstwerte dar.

Tabelle 1

Alkohol- konzentra- tion ‰	mg Alko- hol in 0,5 ml Serum	Verdamp- fungsvolu- men ml	Schwund 10 ⁻³ mg	Promille- schwund
1	0,5	3	0,2	2/1000
2	1	3	0,4	4/1000
3	1,5	3	0,6	6/1000
1	0,5	10	0,6	6/1000
2	1	10	1,2	12/1000
3	1,5	10	1,8	18/1000

Nach diesen Berechnungen kann selbst im ungünstigsten Fall, z. B. mehrmaliges Öffnen der Aufbewahrungsgefäße, der Alkoholschwund durch Verdampfung höchstens einige hundertstel Promille betragen. Werte dieser Größenordnung sind durch die derzeitigen klinisch-chemischen Untersuchungsmethoden nicht nachweisbar und können daher vernachlässigt werden.

KRAULAND, VIDIC, FREUDENBERG, SCHMIDT und LENK fanden bei ihren Untersuchungen fluoridfreier Proben eine Abnahme des Blutalkoholgehaltes um 0,03—0,04 Promille in 100 Tagen. Sie fanden keinen Einfluß bei bakterieller Verunreinigung (Kokken und Stäbchen) auf die Stärke der Veränderung der BAK.

Hingegen dürften durch Myceten bedingte Abbau- bzw. Umsetzungsprozesse eine Fehlerquelle bei Blutuntersuchungen darstellen.

Werden einwandfrei sterilisierte Venülen (Behringwerke) verwendet, so spielt unseres Erachtens die bakterielle Verunreinigungsmöglichkeit bei der Entnahme für die in der Regel innerhalb 48 Std erfolgende Blutalkoholbestimmung praktisch keine Rolle. Wird die Venüle technisch einwandfrei gehandhabt, also erst nach Eindringen der Nadelspitze in das Gefäßlumen abgeknickt, so kann sich selbst fehlerhafte Hautdesinfektion nicht auswirken, weil die Ventile erst in dieser Lage anzusaugen beginnt. Nach ELBEL, LÜTH, PAULUS, SAAR dürfte unter diesen Umständen auch Hautdesinfektion mit Substanzen von erheblicher reduzierender Wirkung (Äther, Alkohol usw.) nicht zur Vortäuschung von Blutalkohol führen.

Primäre luftbakterielle Verunreinigung des Blutes ist bei der Entnahme mit steriler Venüle unwahrscheinlich. Die Gefahr sekundärer Verunreinigung durch Mikroben setzt ein, sobald die Venüle in dem jeweiligen Untersuchungslabor eröffnet wird, z. B. beim Ersatz des hermetisch abschließenden Originalstopfens vor der Verarbeitung durch einen leichter abnehmbaren, sterilisierten Gummistopfen oder beim Überführen des Blutserums nach dem Zentrifugieren aus der Venüle in sterilisierte Glaskurzröhrchen = SKG (2,5 cm lang, 1,3 cm \varnothing) mit Hohlgummistopfenverschluß und bei der Weiterverarbeitung.

Trotz vorsichtigster Behandlung des zur BAK-Bestimmung eingesandten Untersuchungsgutes (Blut, Serum, Harn) kann demnach bei den zur Untersuchung notwendigen Manipulationen sekundäre Verunreinigung nicht ausgeschlossen werden.

Bei Nachuntersuchungen in der Anstalt wochen- bzw. monatelang bei +4...6° C aufbewahrter Blut- und Serumproben fand das die Nachuntersuchung durchführende Institut wiederholt Alkoholkonzentrationschwund, welcher nicht mehr durch Lagerung und mehrmalige Öffnung der Behältnisse erklärbar schien. Diese Tatsache konnte zunächst den Eindruck „ungenauer“ bzw. „falscher“ Untersuchungsmethodik erwecken. Eingehende Überprüfung der technischen Durchführung des Widmark- und ADH-Verfahrens ergab, daß die Untersuchungen an der Anstalt entsprechend den Bestimmungen sachgemäß durchgeführt werden. Deshalb kann auf Wiedergabe der angewandten Technik an dieser Stelle verzichtet werden.

Untersuchungsergebnisse über den Mycetenstoffwechsel lassen erkennen, daß verschiedene Arten von Schimmel- und Hefepilzen nicht nur fähig sind, durch Zuckervergärung Alkohol zu synthetisieren, sondern auch Alkohol als Nährmedium zu verbrauchen und zu zersetzen (COUPIEN, DUCLAUX, LAURENT u. a.).

Wiederholte Öffnung der Gefäße hat insofern Bedeutung, als bei diesen Vorgängen die Belüftung des Keimträgers eine erhebliche Rolle spielt. So gären z. B. Hefepilze in gegen Zutritt von Frischluft abgeschlossenen Behältnissen und spalten Hexosen, Kohlendioxyd und Äthylalkohol nach der bekannten Bilanzformel $C_6H_{12}O_6 = 2 C_2H_5OH$ (+ Energie). Unter entsprechender Dauerbelüftung jedoch assimilieren sie Zucker, verlieren die Fähigkeit Alkohol zu bilden, ja verbrauchen vorhandenen Alkohol, insbesondere Äthylalkohol.

Erst Alkoholkonzentrationen von 10—12% sind in der Lage, Pilzwachstum zu hemmen ohne jedoch die Zellen abzutöten. Der Schimmelpilz *Aspergillus niger* z. B. kann den von ihm gebildeten Äthylalkohol unter aeroben Verhältnissen wieder völlig verbrauchen, während Hefepilze den Äthylalkohol besonders stark bei Anwesenheit von Peptonen assimilieren.

Aus bei einer Kühlschranktemperatur von 4—6° C gelagerten Seren mit makroskopisch wahrnehmbarer Trübung bzw. Kahmhautbildung konnten wir durch Ausstrich auf Bierwürz-Agar kulturell *Penicillium*- und *Monilia*-Pilzarten züchten.

Als Beispiel dürfen zwei Untersuchungsreihen aufgeführt werden, deren Ergebnisse bei Nachuntersuchung an verschiedenen Instituten zunächst unerklärliche Diskrepanzen zeigten.

Tabelle 2

	Unter- suchungs- datum	WID- MARK	ADH
Probe-Nr. 2061/60: Entnahme-Datum 20. 11. 60			
a) Erstuntersuchung an der Anstalt	23. 11. 60	1,48	1,51
b) Nachuntersuchung an anderem Institut	7. 2. 61	1,23	1,20
c) Wiederholungsuntersuchung an der Anstalt	10. 3. 61	1,08	1,06
Probe-Nr. 1662/60: Entnahme-Datum 23. 9. 60			
a) Erstuntersuchung an der Anstalt	26. 9. 60	1,48	1,46
b) Nachuntersuchung an anderem Institut	7. 2. 61	0,66	0,63
c) Wiederholungsuntersuchung an der Anstalt	10. 3. 61	0,03	0,00

Kulturelle Überprüfung der beiden Sera ergab Verunreinigung mit *Penicillium*. Der stetige Blutalkoholschwund dürfte somit in diesem Schimmelpilzwachstum seine Erklärung finden.

Die Blutprobe Nr. 345/61, welche im ADH-Verfahren am 23. 3. 61 eine BAK von 1,13 Promille aufwies, zeigte am 12. 5. 61 einen ADH-Wert von 1,10 Promille in der Probe aus der Venüle und von 0,96 Promille in der Probe aus dem SKG-Röhrchen. Der Unterschied von 0,03 Promille in der Venüle liegt innerhalb der normalen Fehlerbreite, während der Unterschied von 0,17 Promille weit darüber hinausgeht. Beide Proben waren im Kühlschrank bei +4° C aufbewahrt. Die Probe in der Venüle war steril geblieben, das SKG-Röhrchen hingegen zeigte schon makroskopisch Trübung (kulturell *Penicillium*). Der stärkere Abfall im verunreinigten SKG-Röhrchen spricht demnach für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Eumyceten-Verunreinigung und Alkoholschwund.

Zur Klärung der Frage, wieweit die z. T. erhebliche Diskrepanz zwischen Erstuntersuchungsergebnis unmittelbar nach Entnahme und Nachuntersuchungsergebnis nach mehr oder weniger langer Lagerung tatsächlich auf Pilzverunreinigung beruhte, führten wir folgende Versuche durch:

Eine mit negativem Wassermannserum hergestellte etwa 1,5‰ige, Alkoholverdünnung wurde mit zwei verschiedenen *Penicillium*stämmen beimpft und bei der üblichen Kühlschranktemperatur von +4° C aufbewahrt.

Innerhalb von 23 Tagen wurde in beiden Proben ein Alkoholschwund nach dem Widmark-Verfahren von 0,65 bzw. 1,01 Promille, nach dem ADH-Verfahren von 0,68 bzw. 1,04 Promille festgestellt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden mit steril entnommenen Seren gesunder

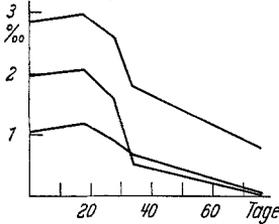


Abb. 1. Alkoholschwund bei Beimpfung mit Penicillium

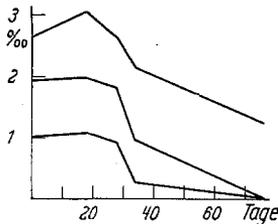


Abb. 2. Alkoholschwund bei Beimpfung mit *Candida albicans*

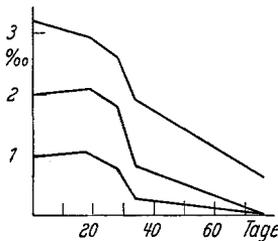


Abb. 3. Alkoholschwund bei Beimpfung mit *Aspergillus niger*

nüchterner Versuchspersonen je drei Alkoholkonzentrationen (etwa 1,0, 2,0 und 3,0 Promille) mit einem *Penicillium*-Stamm, einem *Candida albicans*-Stamm sowie einem *Aspergillus niger*-Stamm beimpft. Sämtliche neun Serum-Alkoholverdünnungen zeigten — bei +4° C aufbewahrt — in den ersten 3 Wochen (Gesamtbeobachtungszeit 11 Wochen) nach Beimpfung mit der Widmark- und ADH-Methode zunächst einen leichten Anstieg der Ausgangsalkoholkonzentration, um dann stark abzufallen (s. graphische Darstellung). Da mit einer Erfassung von alkoholähnlichen Abbauprodukten des Pilzstoffwechsels bei der Untersuchung nach WIDMARK zu rechnen ist, wurden zur Auswertung nur die Ergebnisse des ADH-Verfahrens herangezogen.

Die mit *Penicillium* beimpften Alkoholserumproben wiesen bei der Ausgangskonzentration (AK) von etwa 1,0 Promille (I) einen Abfall um 1,01 Promille, bei der AK von etwa 2,0 Promille (II) um 1,97 Promille und bei der AK von 3,0 (III) um 2,07 Promille auf.

Die *Candida albicans*-Versuchsreihe ergab im Testversuch I (etwa 1,0 Promille) einen Schwund von 1,03 Promille, im Testversuch II (etwa 2,0 Promille) von 1,93 Promille und in der Testreihe III (etwa 3,0 Promille) von 1,39 Promille.

In den mit *Aspergillus niger* inoculierten Serum-Alkoholverdünnungen wurden Alkoholabbauwerte von 0,96 Promille in der Testreihe I, von 1,99 Promille in der Testreihe II und von 2,56 Promille in der Testreihe III ermittelt.

Um Aufschluß zu gewinnen über die Fähigkeit dieser Pilze, Alkohol auch in serumfreien Verdünnungen abzubauen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe Aqua destillata an Stelle des Serums zur Herstellung der gewünschten Alkoholkonzentration verwendet.

Innerhalb einer Beobachtungszeit von 36 Tagen konnte eine geringe Abnahme des Alkoholgehaltes mit zwischen 0,11 und 0,20 Promille

liegenden Werten nachgewiesen werden. Das Pilzwachstum in diesen vor Beimpfung völlig klaren Proben zeigte sich durch makroskopisch deutlich sichtbare feine Trübung an; es konnte, ebenso wie bei sämtlichen Serumproben, durch Ausstriche auf Bierwürz-Agar nachgewiesen werden. Nach 76 Tagen war das Wachstum in den Aqua dest.-Alkoholverdünnung zum Stillstand gekommen.

Die an die Anstalt eingesandten Blut- und Harnproben werden grundsätzlich ein Jahr lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Wie eingangs erwähnt, ist selbst bei raschem und vorsichtigem Öffnen der Venülen, anschließendem Zentrifugieren und Abfüllen des Serums in sterilisierte Gläschen unter Verwendung sterilisierter Pipetten die Möglichkeit einer Verunreinigung des Untersuchungsgutes durch ubiquitär vorkommende Schimmel- und Hefepilze praktisch kaum zu vermeiden.

Durchsicht und kulturelle Kontrolluntersuchungen lediglich einmal geöffneter Blut- und Serumgefäße ergaben, daß nach Ablauf eines Jahres die aufbewahrten Proben nicht selten sekundär mit Myceten verunreinigt sind. Dabei spielen in erster Linie die schwerer sterilisierbaren Hohlgummistopfen eine nicht unwesentliche Rolle.

Unsere Versuche — Beimpfung verschiedener Serum- und Aqua dest.-Alkoholverdünnungen mit drei häufig vorkommenden Pilzarten — zeigen, daß nicht mehr durch Lagerung erklärbare Diskrepanzen zwischen Erstuntersuchung und Nachuntersuchung in primärer oder sekundärer Verunreinigung durch Myceten beim Öffnen der Versandgefäße und Weiterverarbeiten der Serumproben ihre Erklärung finden. Sie beruhen auf biologischen Umsetzungsprozessen.

Infolge dieser Fehlermöglichkeit dürfte die Beweiskraft von Nachuntersuchungsergebnissen selbst bei geringer, makroskopisch noch nicht in Erscheinung tretender Verunreinigung des Untersuchungsgutes (Blut-, Serum- und Harnproben) durch Myceten schon nach Ablauf einer Aufbewahrungszeit von über 3 Wochen sehr fraglich sein.

Bei Verunreinigung durch Myceten spricht auch ein stärkerer Abfall der BAK bei der Nachuntersuchung nicht gegen die Richtigkeit des Ergebnisses der Erstuntersuchung.

Zusammenfassung

Mit *Penicillium*, *Candida albicans* und *Aspergillus niger* beimpfte Alkoholverdünnungen mit Serum bzw. Aqua dest. zeigten nach Aufbewahrung bei Kühlschranktemperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ im Verlaufe von 11 Wochen in der Serum-Alkoholreihe einen starken, zwischen 0,96 und 2,56 Promille liegenden Abfall der Ausgangspromillewerte, in den Aqua dest.-Alkoholverdünnungen einen geringeren Abfall mit Werten zwischen 0,11 und 0,20 Promille.

Die Fragwürdigkeit von Nachuntersuchungsergebnissen mit ubiquitär vorkommenden Pilzen verunreinigter Blut- und Serumproben wird erörtert.

Literatur

- COUPIN, H., E. DUCLAUX u. E. LAURENT: Zit. in W. KRUSE, Allgemeine Mikrobiologie (Verbrennung der Alkohole). Leipzig: F. C. W. Vogel 1910.
- ELBEL, H.: Blutalkohol. Stuttgart: Georg Thieme 1956.
- KRAULAND, W., E. VIDIC, K. FREUDENBERGER, B. SCHMIDT u. V. LENK: Über den Beweiswert einer zweiten Blutalkoholbestimmung. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 50, 34 (1960).
- LÜTH, A. F., W. PAULUS u. H. SAAR: Zit. in H. ELBEL, Blutalkohol. Stuttgart: Georg Thieme 1956.

Frau Dr. E. GEHM und Herr Dr. W. SCHMID,
Staatl. Bakteriologische Untersuchungsanstalt Würzburg