

## Identifizierung gelagerter Alkoholblutproben durch Bestimmung der Typen der sauren Erythrocytenphosphatase (sEPH)

W. REIMANN und G. WILLNER

Gerichtsmedizinisches Institut der Medizinischen Akademie „Carl Gustav Carus“  
Dresden (Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. REIMANN)

Eingegangen am 7. März 1968

Wie die Erfahrung in unserem Bereich lehrt, ist es immer wieder erforderlich, neben Wiederholungsuntersuchungen zur Bestätigung der Blutalkoholkonzentration in Verkehrsstrafsachen die Identität der vorschriftsmäßig gelagerten Blutproben zu beweisen. In solchen Fällen geben die Beschuldigten ihren ja strafbaren Alkoholgenuß nicht oder nur unzureichend zu und stellen die Schutzbehauptung auf, die Blutprobe müsse verwechselt worden sein.

Die Klärung über die Blutgruppenbestimmung erweist sich in solchen Fällen als unzulänglich, da länger gelagerte Blute trotz des NaF-Zusatzes hämolysisch sind und die Gruppenbestimmung an den Erythrocyten und noch viel weniger die Serumkontrolle zulassen.

Da bei der Bestimmung der Typen der sEPH von Hämolysaten ausgegangen wird (HOPKINSON u. Mitarb.) lag es nahe, die Gruppenbestimmung durch „phosphatase typing“ zu ersetzen. Dem steht die Hemmung der Phosphataseaktivität durch Fluoride gegenüber (ROCHE, 1950; WALKER, LEMON, DAVIDSON und SCHWARTZ, 1954).

Die vorliegende Studie sollte klären, ob und wann der Fluoridhemmeffekt die Typenbestimmung stört, ob die Aktivierung der sEPH durch Mangan (WALKER u. Mitarb.) bei nicht bestimmbareren Typen eingesetzt werden kann und wie lange hinsichtlich Lagerungsalters die Bestimmung möglich ist. Die Häufigkeitsraten der Typen konnten an den errechneten Erwartungswerten, die Stabilitätsdauer an wiederholender Untersuchung nach entsprechenden zeitlichen Abständen kontrolliert werden.

### Material und Methode

Untersuchungsmaterial: Bis zu 4 Monate alte, gelagerte Blutproben zur Alkoholbestimmung mit NaF-Zusatz. Hämolysat: Hämolysatherstellung wie üblich. Bei stark hämolysierten Blutproben wurde statt Wasser 0,1%ige Manganlösung zur Enzymaktivierung zugesetzt ( $\frac{1}{3}$  Vol.). Völlig hämolysierte Blutproben, ohne etwa in Gerinnseln erhaltene intakte Erythrocyten wurden direkt ohne weitere Vorbehandlung verimpft.

Elektrophorese: Stärkegel-Elektrophorese nach RADAM und STRAUCH in der Modifikation von REIMANN und HEIDEL mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat.

### Ergebnisse

Die 409 untersuchten Proben verschiedenen Erhaltungszustandes von leicht hämolysiert bis zur völligen Hämolyse waren mit unserer Methode sämtlich einwandfrei bestimmbar. Schwache Muster konnten durch Zugabe von 0,1%iger Manganlösung verstärkt und einwandfrei ablesbar gemacht werden. Bei total hämolysierten Blutproben hatte der Manganzusatz keinen aktivierenden Effekt. Diese Proben waren bei direkter Verimpfung sicher bestimmbar.

Die nachstehende Tabelle gibt Aufschluß über die Typenverteilung in unserer Stichprobe.

Tabelle 1

A	AB	B	AC	BC	C
61	160	141	16	31	—

Aus den Phänotypenfrequenzen errechnen sich folgende Gen-Frequenzen:

$$p = 0,36430 \quad q = 0,57825 \quad r = 0,05745.$$

Vergleich mit einigen für deutsche Populationen errechneten Werten zeigt gute Übereinstimmung:

Tabelle 2

1	2	3	4	5	6
Berlin (RADAM und STRAUCH)	Hamburg (BRINKMANN und REICH)	Leipzig (DÜRWARD und HUNGER)	Wien (SPEISER und PAUSCH)	Marburg (RICHTER)	Dresden (REIMANN und SCHULZE)
$n = 1188$	558	432	410	343	681
$p = 0,362$	0,351	0,391	0,365	0,357	0,365
$q = 0,577$	0,586	0,544	0,573	0,600	0,581
$r = 0,061$	0,063	0,065	0,062	0,042	0,052

In der folgenden Tabelle sind die Erwartungswerte den gefundenen Typenraten in der Stichprobe gegenübergestellt.

Aus der Tabelle ergibt sich gute Übereinstimmung von gefundenen und Erwartungswerten, so daß an der Richtigkeit der bestimmten Typen nicht gezweifelt werden kann.

Tabelle 3

$n = 409$	Häufigkeit			
	erwartete		beobachtete	
$A = p^2$	0,1327	54,3	0,14915	61
$AB = 2pq$	0,4213	172,3	0,39120	160
$B = q^2$	0,3344	136,8	0,34475	141
$AC = 2pr$	0,0418	17,1	0,03910	16
$BC = 2qr$	0,0664	27,2	0,07580	31
$C = r^2$	0,0033	1,3	—	—
	0,9999	409,0	1,00000	409

Eine weitere Kontrolle stellt die unausgelesene Wiederholungsuntersuchung eines Teiles des Untersuchungsgutes nach mehreren Monaten dar. Die Wiederholungsuntersuchung bezog sich gerade auch auf schwach darstellbare Typen.

Nachstehende Tabelle 4 stellt 50 solche Wiederholungsuntersuchungen gegenüber.

### Diskussion und Schlußfolgerung

Die häufig geforderte Wiederholungsuntersuchung zur Feststellung von Widmark-Werten wegen Widerspruchs des ermittelten Wertes zu den Angaben zum Alkoholgenuß seitens des Beschuldigten steht gleichzeitig vor der Aufgabe der Identifizierung der Blutprobe im Vergleich mit einer Frischblutprobe des Probanden. Die Blutgruppenbestimmung ist infolge der inzwischen eingetretenen Hämolyse in der gelagerten Blutprobe in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle nicht sicher oder gar nicht mehr möglich, während die Bestimmung der Typen der sEPH in der von uns praktizierten Methode immer möglich ist. Bei völliger Hämolyse wird die Blutprobe ohne weitere Vorbehandlung direkt verimpft. Schwach darzustellende Typenmuster können durch Zugabe von 0,1%iger Manganlösung anstatt Wasser infolge Enzymaktivierung verstärkt werden. Der NaF-Zusatz stört die Bestimmung allgemein trotz der Hemmwirkung der Fluoride auf die Phosphatase nicht, da die Blutproben zur Herstellung des verimpfbaren Hämolysates ausgewaschen werden. Bei weitgehender Hämolyse mit Austritt des Enzyms aus den Erythrocyten reicht die Aktivität nach Auswaschen dann nicht mehr aus, Aktivitätszonen darzustellen. Bei Erhaltenbleiben weniger intakter Erythrocyten verstärkt 0,1%ige Manganlösung die Aktivität bis zur ausreichenden Darstellbarkeit der Zonen. Orientierende Versuche ergaben ebenfalls Verbesserung der Typenmuster in entsprechenden Fällen bei Verimpfen doppelter Filterpapierblättchen.

Tabelle 4

1. Untersuchung				2. Untersuchung (Blute hämolytisch)				
Datum	Typ	Methode			Datum	Typ	Methode	
		1	2	3			2	3
28 9. 67	AB h		+	+	2. 2. 68	AB		+
	AB	+				AB		+
	BC	+				BC		+
	AB	+				AB		+
	A	+			A		+	
	B h		+	+	15. 1. 68	B	+	+
	B	+				B		+
	AB	+			2. 2. 68	AB		+
	A	+				A		+
	B	+				B		+
	B	+				B		+
AB	+			AB			+	
AB	+			AB			+	
2. 10. 67	B	+			5. 2. 68	B		+
	B	+				B		+
	BC	+				BC		+
	AB h		+		15. 1. 68	AB	+	+
	B	+				5. 2. 68	B	
	A	+			A		+	
	AB	+			AB		+	
	B	+			B		+	
	AB	+			AB		+	
BC	+			BC		+		
4. 10. 67	AB	+			6. 2. 68	AB	+	+
	AC	+				AC	+	(+)
	AB	+				AB		+
	AB h		+	+	15. 1. 68	AB	+	+
	A	+				6. 2. 68	A	
	AB	+			AB		+	
	A	+			A	+		
	B	+			B		+	
	AB	+			AB		+	
	A	+			A		+	
5. 10. 67	AB h		+	+	18. 1. 68	AB		+
	A h		+	+	7. 2. 68	A		+
	B h		+	+	B		+	
	AB h		+	+	18. 1. 68	AB		+
	B	+			7. 2. 68	B		+

Tabelle 4 (Fortsetzung)

1. Untersuchung				2. Untersuchung (Blute hämolytisch)				
Datum	Typ	Methode			Datum	Typ	Methode	
		1	2	3			2	3
15. 10. 67	B	+			8. 2. 68	B	+	
	B	+				B	+	
23. 10. 67	AB	+			13. 2. 68	AB	+	
	AB	+				AB	+	
	AB h			+	18. 1. 68	AB	+	
	AB	+			13. 2. 68	AB	+	
26. 10. 67	B	+				B	+	+
	B	+				B		+
1. 11. 67	B	+				B		+
2. 11. 67	BC	+				BC		+
	AC h			+	18. 1. 68	AC		+
6. 11. 67	AB h			+	13. 2. 68	AB		+
16. 11. 67	B h			+	17. 1. 68	B	+	+

1 = Waschen + H<sub>2</sub>O; 2 = Zusatz 0,1% ige Mn-Lsg; 3 = Ohne Waschen hämolyt. Blutprobe direkt, h = hämolytisch.

In unserem Material verblieben keine Proben unbestimmbar. Die älteste Probe war reichlich 4 Monate alt. Das Verfahren kann somit zur Identifizierung von Alkoholblutproben empfohlen werden und ist der Blutgruppenbestimmung auch hinsichtlich der Anzahl von 5 (unter Einbeziehung des seltenen C sogar 6) bestimmbar Typen überlegen.

### Zusammenfassung

Bei 409 vorschriftsmäßig zur Kontrollmöglichkeit gelagerten Alkoholblutproben konnten trotz Alterung und NaF-Zusatz die sEPH-Typen nach Aktivierung mit Mangan (0,1% ige Lösung) und direkter Verimpfung der Hämolysate bei totaler Hämolyse der Blutproben bis über 4 Monate einwandfrei bestimmt werden.

Die Bestimmung der sEPH ist der in hämolytischen Blutproben nicht mehr gelingenden Blutgruppenbestimmung weit überlegen und kann zur Identifizierung von Blutproben empfohlen werden.

### Summary

409 blood samples, stored to control the alcohol concentration if needed, was typed on the red cell acid phosphatase. Total hemolysed samples was brought directly into the gel and intact red cells available activating Mn solution (0,1%) added. The typing was successful in all cases and can be recommended for purpose of identification better than blood grouping.

### Literatur

- BRINKMANN, B., u. K. REICH: Saure Erythrozytenphosphatase. *Ärztl. Lab.* **13**, 346 (1967).
- DÜRWARD, W., u. H. HUNGER: Populationsgenetische und formalgenetische Untersuchungen zum Polymorphismus der sauren Erythrozytenphosphatase. *Dtsch. Gesundheitswes.* **22**, 2368 (1967).
- HOPKINSON, D. A., N. SPENCER u. M. HARRIS: Red cell acid phosphatase variants: A new human polymorphism. *Nature (Lond.)* **199**, 969 (1963).
- RADAM, G., u. H. STRAUCH: Elektrophoretische Darstellung der sauren Erythrozytenphosphatase. *Z. klin. Chem.* **4**, 234 (1966).
- — Populationsgenetik der sauren Erythrozytenphosphatase. *Humangenetik* **2**, 378 (1966).
- REIMANN, W., u. G. HEIDEL: Forensich-medizinische Anwendungsbereiche der Typen der sauren Erythrozytenphosphatase. 1. Tagg. der Ges. f. Ger. Med. d. DDR, Halle (Saale) 12. 10. 1967.
- — Zur Methode der Bestimmung der sauren Phosphatase der Erythrozyten. *Z. ärztl. Fortbild.* **61**, 1164 (1967).
- , u. M. SCHULZE: Untersuchungen zur Populationsgenetik der sauren Erythrozytenphosphatase im Dresdner Einzugsgebiet. (Im Druck.)
- RICHTER, O.: Untersuchungen zur Typendifferenzierung der sauren Erythrozytenphosphatase. *Z. Immun.-Forsch.* **134**, 287 (1967).
- ROCHE, J.: Phosphatase. In: SUMNER-MYRBÄCK, *The enzymes*, Bd. I. New York: Academic Press 1950.
- SPEISER, P., and V. PAUSCH: The distribution of the red cell acid phosphatase variants in Vienna. *Vox Sang. (Basel)* **13**, 12 (1967).
- WALKER, B. S., H. M. LEMON, M. M. DAVIDSON, and M. K. SCHWARTZ: Acid phosphatases. A review. *Amer. J. clin. Path.* **24**, 807 (1954).

Prof. Dr. med. habil. W. REIMANN  
Institut für Gerichtliche Medizin  
X 8019 Dresden, Fetscherstr. 74