

## Originalarbeiten — Original-Papers

# Vergleichende Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Haptoglobintypenbestimmung in verschiedenen Medien unter besonderer Berücksichtigung gealterter Blutproben und von Blutspuren

REINHARD HILGERMANN

Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg (BRD)

Eingegangen am 10. Mai 1972

### *Investigations of Haptoglobin Typing Sensitivity by Comparison of Starch, Agar, and Polyacrylamide Gel Electrophoresis with Special Regard to Longer Stored Blood Samples and to Blood Traces*

*Summary.* In view of the well-known difficulties of determining the haptoglobin types in stored blood samples and blood traces by the usual starch gel technique, agar and PAA gel were tested for their sensitivity and usefulness. PAA gel electrophoresis turned out to be unequivocally superior when dilutions of sera were typed. Experimental destruction of proteins by various proteases, especially by neuraminidase, caused alterations of electrophoretic mobility of proteins which affected diagnosis by agar gel much more than by starch or PAA gel electrophoresis. 95% of 436 blood samples stored up to 2 years permitted undisputable Hp typing by PAA gel electrophoresis, while in agar gel typing became impossible after 1 year of storage, and a few months were sufficient to cause diagnostic difficulties in starch gel. Blood traces could be typed up to 4 weeks in PAA gel, to a maximum of 8—14 days in agar gel, and no longer than 2—3 days in starch gel. Here too, PAA gel offered the greatest sensitivity and lucidity in relation to quantity of blood stains.

*Zusammenfassung.* Die bekannten Schwierigkeiten der sehr begrenzten Hp-Typen-Diagnostik an gealterten Blutproben und an Blutspuren in der Stärkegel-Elektrophorese boten Anlaß, Agar- und PAA-Gel als weitere Trägermedien auf ihre Empfindlichkeit und Brauchbarkeit vergleichend zu untersuchen. Verdünnungsreihen mit Probandenseren haben eine außerordentlich hohe, den anderen Verfahren überlegene Nachweisempfindlichkeit der Hp-Typen in der PAA-Gel-Elektrophorese ergeben. Experimentelle Proteinschädigungen mit verschiedenen Proteasen, vor allem mit Neuraminidase, führten zu einer Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Proteine, die sich diagnostisch besonders ungünstig in der Agargel-Elektrophorese, kaum aber in den Pherogrammen der Stärke- oder PAA-Gel-Elektrophorese auswirkten. Von 436 bis zu 2 Jahren bei Zimmertemperatur gelagerten Bluten war ferner in 95% der Fälle der Hp-Typ in der PAA-Gel-Elektrophorese noch sicher bestimmbar. Im Agargel lag die Nachweisgrenze etwa bei 1 Jahr Lagerungszeit, im Stärkegel traten bereits nach wenigen Monaten diagnostische Schwierigkeiten auf. Blutspuren ließen sich im PAA-Gel einwandfrei bis zu 4 Wochen, im Agargel noch nach maximal 8—14 Tagen und im Stärkegel höchstens 2—3 Tage differenzieren. Auch hier zeigte das PAA-Gel, bezogen auf die Blutspurenmenge, bei weitem die höchste Empfindlichkeit und das größte Auflösungsvermögen.

*Key words:* Haptoglobintypen, in Blutspuren — Polyacrylamidgel-Elektrophorese — Haptoglobindifferenzierung in gealterten Blutproben.

Die spurenkundlichen Nachweismethoden scheitern zum Teil an der unterschiedlichen geringen Stabilität einzelner Blutmerkmale (Fy, Gc, Pt), zum Teil auch am Nachweisprinzip, das häufig eine Modifizierung der ursprünglich für Untersuchungen am Frischblut vor-

gesehenen Originalmethoden verlangt. Dies gilt besonders für den Hp-Typen-Nachweis in der Stärkegel-Elektrophorese an Blutspuren, Leichenbluten und an gealterten, mehr oder weniger stark hämolysierten Bluten. Zur Überwindung der diagnostischen Schwierigkeiten sind zahlreiche Vorschläge unterbreitet worden, die von Absorptionsversuchen hämolytischer Blute [15, 41], verschiedenen Modifikationen zur Auflösung, Einengung und Verimpfung von Trockenblutspuren [8, 10, 11, 16, 33, 42] bis zur Verwendung diskontinuierlicher Puffersysteme reichen [5, 6, 33].

Diese Verfahrensänderungen haben zwar einige Verbesserungen erbracht, die Ergebnisse waren aber vor allem an Vollblutspuren wegen der störenden Hämoglobinverschmierung der Pherogramme unbefriedigend, hinsichtlich der Zeitspanne der Nachweisbarkeit der Haptoglobintypen auch sehr unterschiedlich. Dies gilt ebenso für die Hp-Bestimmung im Leichenblut [15, 33, 40, 41]. Letzten Endes scheiterte das Nachweisprinzip an den für diese Fragestellung unzureichenden Trägermedien; denn eine Schlierenbildung blieb stets unvermeidlich.

Bessere Ergebnisse an Blutspuren lieferte dagegen der immunoelektrophoretische Haptoglobintypennachweis im Agargel, der die Stärkegelmethoden sowohl durch höhere Empfindlichkeit als auch durch die längere Nachweisbarkeit der Hp-Typen übertreffen soll [2, 3, 6, 43].

Neuerdings hat sich die Haptoglobintypenbestimmung im Polyacrylamid-(PAA)-Gel, das den bisher bekannten Trägermedien in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften überlegen ist, hervorragend bewährt, zumal bei stark hämolytischen Bluten (Hilgermann [20], dort auch ausführliche Literaturübersicht). Versuche, die PAA-Gel-Elektrophorese auch der Hp-Diagnostik in *Blutspuren* nutzbar zu machen, drängten sich daher geradezu auf; sie sind — jedoch ohne systematische Prüfung — beschrieben worden [12—14, 26]. In der vorliegenden Arbeit sollen nunmehr die drei genannten Verfahren der Elektrophorese in Stärke-, Agar- und PAA-Gel hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit und der zeitlichen Grenze des Hp-Typen-Nachweises an Blutspuren und gealterten Bluten vergleichend gegenübergestellt werden.

## Material und Methoden

### I. Stärkegel-Elektrophorese

Die Seren wurden in der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese (hydrolysierte Stärke der Connaught Laboratories, Toronto, Canada) in einer Trennkammer (Biotest) bei einer Stromstärke von 0,1 mA je Milliliter Stärkegel nach der Prokopschen Faustregel aufgetrennt. Zur besseren Abgrenzung des freien Hämoglobins gegenüber dem Hb-Hp-Komplex und zur Erzielung besserer Trennergebnisse wurden der von Laurell [25] angegebene Phosphatpuffer (pH 7,0) und ein diskontinuierliches Tris-Citronensäure-Puffer-System (pH 8,5) nach Poulik [32] verwendet. Laufzeit: 2,5 Std, Färbung: übliche Benzidintechnik.

### II. Agargel-Immunoelktrophorese

Immunoelktrophorese im Agargel (Difco-Agar Noble) unter Verwendung des Barbitol-Calcium-Lactat-Puffers nach Hirschfeld [21, 22] entsprechend einer früher mitgeteilten Modifikation [18] der von Baitsch u. Mitarb. [1] angegebenen Variante der immunoelektrophoretischen Mikromethode auf 115 × 300 mm messenden Spiegelglasplatten. Feldstärke: 8 Volt/cm, Laufzeit: 2,5 Std, Antiserum: monospezifisches Anti-Hp-Serum vom Kaninchen, das zur Markierung eines Bezugsbogens mit einem Anti- $\alpha_2$ -Makroglobulinserum vom Kaninchen im Verhältnis 2:1 gemischt werden kann [3]. Färbung: Azocarmin.

### III. Diskontinuierliche PAA-Gel-Elektrophorese

Diskelektrophorese in Anlehnung an das von Davis [7] und Ornstein [31] entwickelte Verfahren in 14 cm langen und 0,5 cm breiten Gelsäulen mit einem Tris-Glycine-Puffer-System

(pH 8,5). Trennzeit bei einem stabilisierten Stromdurchgang von 3 mA je Röhrchen etwa 4,5 Std bei Blutfleckenextrakten und 5,5 bis 6 Std bei hämolytischen Bluten. Die Benzidinfärbung mußte, soweit es sich um Spurenmaterial handelte, gegenüber den Serumproben verlängert werden. Einzelheiten zur Methodik sind einer früheren Mitteilung [20] zu entnehmen.

#### IV. Versuchsansätze

##### 1. Nativseren

a) Je 5 frische Seren der drei Hp-Typen wurden stufenweise mit destilliertem Wasser verdünnt, jede Verdünnungsstufe wurde vor der Elektrophorese im Verhältnis 5:1 und 10:1 mit einer Hämoglobinstammmlösung versetzt.

b) In einer weiteren Verdünnungsreihe mit einer 0,04%igen  $\text{NH}_3$ -Lösung bis 1:16 wurde dieses zur beschleunigten Blutspurenextraktion vorgesehene „Lösungsmittel“ [34] auf seine elektrophoretische Unbedenklichkeit geprüft.

c) Frischen Serumproben der 3 Hp-Typen wurde ein gereinigtes, aus *Vibrio cholerae* hergestelltes Neuraminidase-Präparat (Behring-Werke) zugesetzt, und zwar zu jeweils 0,1 ml Serum 0,01, 0,05 und 0,1 ml Neuraminidase. Inkubationszeit: 24 Std bei 37°C. Außerdem wurde erprobt, wie weit verschiedene, auch zelleigene Proteasen der Blutzellen zu Veränderungen der Hp-Muster führen. Zu diesem Zwecke wurden Serumproben mit abgestuften Mengen frisch zubereiteter Leukocyten- und Thrombocyten-Suspensionen sowie kristalliner Bakterienprotease und kristallinen Trypsins (Novo-Industrie) versetzt und vor der Elektrophorese zwischen 45 min und 4 Std bei 37°C inkubiert (vgl. auch 2a).

##### 2. Hämolytische Blute

a) Je Hp-Typ wurden 2 frische Vollblutproben durch mehrfaches Tieffrieren hämolyziert, anschließend bei 37°C inkubiert und sodann nach einer Inkubationszeit von 4 und 24 Std untersucht.

b) 113 bei Zimmertemperatur 19 Monate aufbewahrte Alkoholblutproben wurden unverdünnt sowie in einer Verdünnung 2:3 und 1:5 elektrophoretisch aufgetrennt.

c) 200 weitere bei Zimmertemperatur gelagerte Alkoholblutproben wurden nach einer Liegezeit von 26 bis 28 Monaten elektrophoretisch aufgetrennt. Verimpfung der Proben wie unter b) angegeben. Von diesen 200 Blutproben wurden 10 bis 12 Monate später, also nach einer Gesamt liegezeit von 36 bis 38 Monaten, 110 hinsichtlich der Typenverteilung unausgewählte Blute erneut untersucht.

d) 123 Blute aus Vaterschaftsgutachten mit bekannten Hp-Typen, denen der Serumbestandteil weitgehend entzogen worden war, wurden zwischen 7 und 11 Monaten bei Zimmertemperatur aufbewahrt und die zähflüssigen Blutkuchen jeweils nach einer Verdünnung 1:5 elektrophoretisch aufgetrennt.

##### 3. Blutspuren

8 frische Voll- und Citratblutproben je Hp-Typ wurden in Mengen von 0,1 bis 0,001 ml auf Glas und Halbleinen aufgetropft. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, tägliche Elution der Blutflecken und -schüppchen in 0,04%iger  $\text{NH}_3$ -Lösung mit der 4—8fachen Menge des Ausgangsvolumens. Elektrophoretische Auftrennung des Eluates spätestens nach 2stündiger Elution mit und ohne Zusatz einer frischen Hb-Stammmlösung.

#### Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen haben die eigenen Erwartungen und die Ergebnisse anderer Autoren jedenfalls für den Bereich der Stärke- und Agargel-Elektrophorese im großen und ganzen bestätigt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die *Titerendstufen* der Hp-Typen, die noch einwandfrei erkennbar waren. Es handelt sich nur um Durchschnittswerte, da bekanntlich die Hp-Spiegel bei den einzelnen Typen quantitativ schwanken können und die Hämoglobinbindungskapazität der einzelnen Seren nicht bestimmt worden ist.

Tabelle 1. Verteilung der durchschnittlich nachweisbaren Titerstufen der Hp-Typen in der Agar-, Stärke- und PAA-Gel-Elektrophorese

Hp-Typ	Agar-Immuno- Elektrophorese	Stärkegel- Elektrophorese	PAA-Gel- Elektrophorese
1—1	1:16	1:32	1:192
2—1	1:16	1:48	1:192
2—2	1:16	1:32	1:128

Es ist einzuräumen, daß die Proteinfärbung der immunologischen Methode nicht ohne weiteres mit der Empfindlichkeit einer Peroxidasereaktion der hämoglobinbindenden Proteinfraktionen bei der Stärke- und PAA-Gel-Elektrophorese vergleichbar ist. Aus optischen Gründen wurden die Titer der Immunoelktrophorese dennoch in die Tabelle aufgenommen. Hervorzuheben ist aber die außerordentliche Empfindlichkeit der PAA- gegenüber der Stärkegel-Elektrophorese, ein Befund, der jene geradezu für den spurenkundlichen Nachweis prädestiniert. Der Zusatz einer ammoniakalischen Lösung zu den Seren störte bei keiner der Methoden.

Im Gegensatz zu den Gc-Globulinen, die durch den Einfluß bakterieller und aus desintegrierten Blutzellen freigesetzter Proteasen außerordentlich rasch und tiefgreifend transformierbar sind [17, 19, 27—30], haben sich die Haptoglobine als relativ *stabil* erwiesen.

Die experimentelle Schädigung der Haptoglobine war so „unterschwellig“, daß sie *nur* im Reaktionsbild der Immunoelktrophorese diagnostizierbar war. Während die Bakterienprotease ohne Einfluß blieb, die Trypsinbehandlung eine Verlängerung und anodische Ausziehung der Präcipitatbögen bewirkte, zeigte sich unter dem Einfluß zelleigener Fermente eine beginnende Transformierung im Sinne einer Verkürzung und Verschiebung der Präcipitatlinien zur Kathode hin (Abb. 1, vgl. auch Abb. 3).

Gegenüber der *Neuraminidase* (Receptor Destroying Enzyme) waren die Haptoglobine wie alle Glykoproteine, die Sialin- bzw. N-Acetyl-Neuraminsäure besitzen [35], außerordentlich empfindlich. Alle 3 Hp-Typen zeigten erwartungsgemäß in der Immunoelktrophorese infolge enzymatischer Abspaltung der an die  $\beta$ -Polypeptidkette des Haptoglobins fixierten Neuraminsäure [38] eine ganz erhebliche, offenbar dosisabhängige verringerte Wanderungsgeschwindigkeit (Abb. 2). Die Lage der Hp-Linien zueinander blieb offenbar konstant. Hier läßt sich also ebenfalls ein schnellwandernder, ein langsamwandernder und ein intermediärer Typ unterscheiden. Die elektro-phoretisch darstellbare Typenvarianz der Haptoglobine beruht somit auf Unterschieden in der Primärstruktur der Polypeptidketten und nicht, wie früher vermutet wurde, auf einem unterschiedlichen Kohlenhydrat- und Neuraminsäuregehalt [9, 37]. Eine eindeutige Diagnose an einem derart veränderten Blut ist jedoch auch dann nicht möglich, wenn man ein polyvalentes Antiserum oder ein Antiserum, das ein Anti- $\alpha_2$ -Makroglobulin als Bezugsbogen enthält, verwendet. Hervorzuheben und als Beweis für die Wirksamkeit der Neuraminidase anzusehen ist die ebenfalls herabgesetzte Laufgeschwindigkeit des  $\alpha_1$ -Glykoproteins (Abb. 2). Auch in der Stärke- und PAA-Gel-Elektrophorese erkennt man eine Verringerung der elektro-phoretischen Beweglichkeit der Hapto-

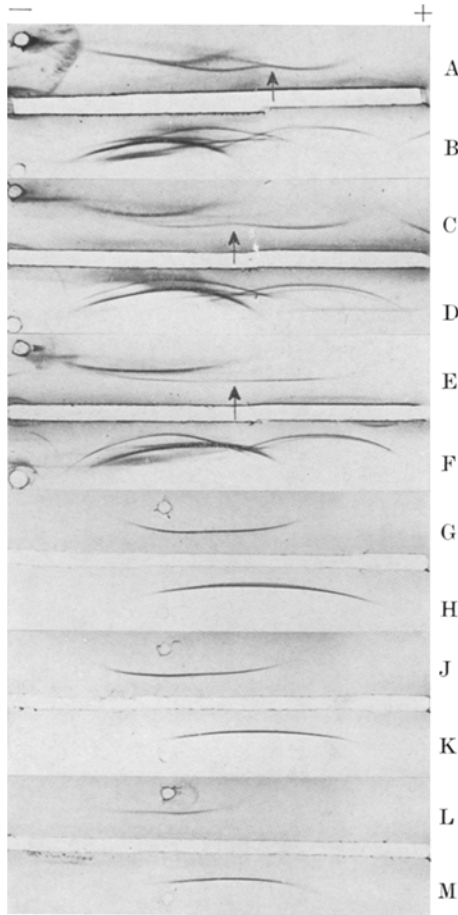


Abb. 1. Immunoelektrophoretischer Vergleich der Proteinschädigung durch zelleigene Proteasen. Vollständige Transformation der 3 Typen Ge 1—1 (A), Ge 2—1 (C) und Ge 2—2 (E) in ein sich absplattendes  $\alpha_1$ -Globulin (Pfeil). Kontrollseren bei B, D und F. Anti-Ge-Serum vom Pferd. Bei den Haptoglobintypen 1—1 (G), 2—1 (J) und 2—2 (L) Verkürzung und Verschiebung der Bögen kathodenwärts. Referenzseren bei H, K und M. Monospezifisches Anti-Hp-Serum vom Kaninchen (Blutspendedienst des Roten Kreuzes, Amsterdam). Azocarminfärbung

globine, deren ursprüngliche Heterogenität aber im Falle der Hp-Typen 2—2 und 2—1 erhalten und allenfalls unter geringer Abschwächung einiger kathodennahe gelegener Komponenten stets diagnostizierbar bleibt (Abb. 3).

Die Ge-Globuline, die in hämolytischem Blut und in Blutspuren frühzeitiger Proteolysedefekten ausgesetzt sind als die Haptoglobine, enthalten keine Neuraminidase. Sie lassen daher nach Inkubation mit verschiedenen Neuraminidasekonzentrationen keine Alteration der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit erkennen [4, 19, 36].

Die *hämolysierten* frischen Blutproben zeigten nach mehrstündiger Inkubation bei 37°C in allen 3 Elektrophoresen ähnlich geringe Veränderungen der Haptoglobinmuster wie nach Einwirkung der Leukocytenproteasen, während wiederum

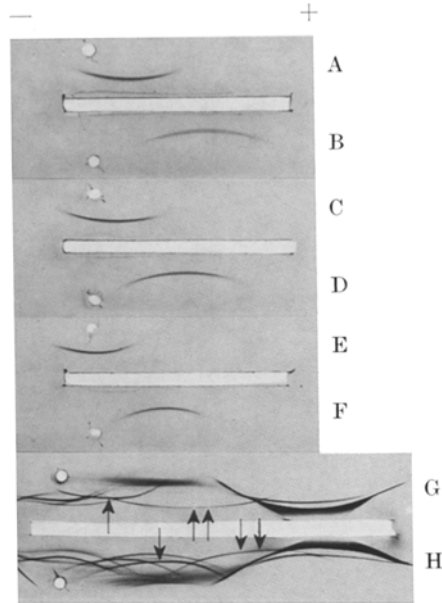


Abb. 2. Deutlich herabgesetzte Wanderungsgeschwindigkeit der Haptoglobine 1—1 (*A* und *G*, Pfeil), 2—1 (*C*) und 2—2 (*E*) sowie des  $\alpha_1$ -Glykoproteins (*G*, Doppelpfeil) nach Einwirkung der Neuraminidase. Kontrollen bei *B*, *D*, *F* und *H*. Monospezifisches Anti-Hp-Serum und Anti-Human-Serum vom Pferd (Behring-Werke)

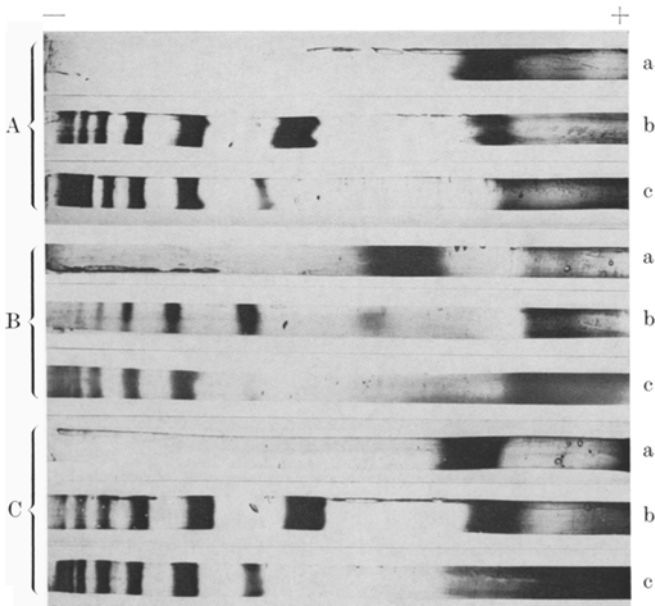


Abb. 3. Auftrennung der Haptoglobintypen in der diskontinuierlichen PAA-Gel-Elektrophorese an gefrierhämolyisiertem und 4 Std bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiertem Vollblut (*A*), an neuraminidasebehandeltem Blut (*B*) und an Kontrollseren (*C*). Geringe Abschwächung der kathodennahen Banden nach Neuraminidase-Einwirkung (*B*). *a* Hp 1—1; *b* Hp 2—1; *c* Hp 2—2. Benzidin färbung

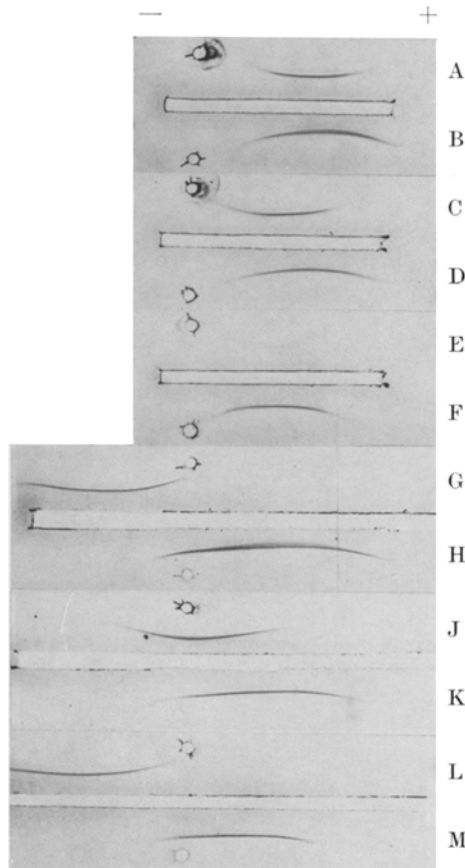


Abb. 4. Lageveränderungen und Abschwächung der Hp-Bögen bei 19 Monate (*A, C, E*) und bei 2,5 Jahre (*G, J, L*) bei Zimmertemperatur gelagerten Blutproben. Hp 1—1-Kontrollen bei *B* und *H*, 2—1 bei *D* und *K*, 2—2 bei *F* und *M*

bei der gruppenspezifischen Komponente bereits nach 4stündiger Inkubation eine fermentativ induzierte Transformation in ein  $\alpha_1$ -Globulin erkennbar war (vgl. Abb. 1).

Noch deutlicher wird die weitaus größere Stabilität der Haptoglobine, die u. a. möglicherweise auf deren Inhibitor-Kapazität gegenüber Kathepsin B-Aktivitäten zurückzuführen ist [39], bei den Proteinmustern *länger gelagerter Blutproben*. Bei rund 1 Jahr alten hämolytischen Alkoholblutproben sah man im Agargel noch brauchbare Ergebnisse, wenngleich schon erste Veränderungen im Sinne einer Abflachung und herabgesetzter Mobilität der Hp-Linien erkennbar waren. Die Stärkegel-Elektrophorese hat hier und bei allen weiteren Versuchen aus den bekannten Gründen völlig versagt. Bei 19 Monate alten Bluten traten im Agargel deutliche Proteindefekte auf. Während der Typ 1—1 sich noch nahezu unverändert verifizieren ließ, imponierte der Typ 2—1 wie ein Hp 2—2, und der Typ 2—2 war nicht mehr ablesbar. Ein 2½ Jahre altes Alkoholblut zeigte noch stärkere Veränderungen der elektrophoretischen Beweglichkeit der Präcipitate (Abb. 4).

In der PAA-Gel-Elektrophorese ließen sich hingegen ganz erstaunliche Ergebnisse erzielen, die in Tabelle 2 wiedergegeben sind (vgl. auch Abb. 6). Von 113 dieser 19 Monate gelagerten Blute waren 107 (95%) noch bestimmbar, bei 200 etwa 26 bis 28 Monate gelagerten Bluten konnte 189mal (95%) der Hp-Typ bestimmt werden. In der Nachuntersuchung von 110 unausgewählten dieser 200 Alkoholblute mit nunmehr bekannten Hp-Typen etwa 1 Jahr später, nach einer Gesamtlagerungszeit von 36 bis 38 Monaten also, waren dagegen nur noch 53 Typen — das sind weniger als 50% — nachweisbar. 5 oder 33% dieser 53 Blute entfielen auf den Typ 1—1 (statt 15 Blute dieses Typs 1 Jahr früher), 24 Blute oder 52% auf Hp 2—1 (46) und 24 Blute oder 49% auf Hp 2—2 (49). Schließlich konnten an 123 bis zu 11 Monate gelagerten Blutkuchen aus Paternitätsgutachten mit bekannten Hp-Typen 118 Blute (96%) einwandfrei zugeordnet werden. Nicht

Tabelle 2. *Prozentuale Verteilung der diagnostizierbaren Hp-Typen in der PAA-Gel-Elektrophorese nach verschiedenen Lagerungszeiten*

Hp-Typ	n	%	Untersuchungsmaterial
1—1	13	11,5	Alkoholblutproben
2—1	60	53,1	nach 19 Monaten Lagerung
2—2	34	30,1	bei Zimmertemperatur
Unbestimmbar oder fraglich	6	5,3	
Summe	113	100,0	
1—1	31	15,5	Alkoholblutproben
2—1	77	38,5	nach 26—28 Monaten Lagerung
2—2	81	40,5	bei Zimmertemperatur
Unbestimmbar oder fraglich	11	5,5	
Summe	200	100,0	
1—1	25	20,3	Blutproben aus Vaterschaftsgutachten
2—1	55	44,7	nach 7—11 Monaten Lagerung
2—2	38	30,9	bei Zimmertemperatur
Unbestimmbar oder fraglich	5	4,1	
Summe	123	100,0	

Tabelle 3. *Prozentuale Verteilung der nachweisbaren Hp-Typen, bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Blute*

Hp-Typ	n	%
1—1	69	15,82
2—1	192	44,04
2—2	153	35,09
Unbestimmbar	22	5,05
Summe	436	100,00



mehr ablesbar oder fraglich waren 4mal der Typ 2—2 und 1mal der Typ 2—1. In diesen Fällen ließ sich jedoch nicht genau abgrenzen, ob die Defekttypen ausschließlich auf Denaturierungseffekte oder auf den äußerst geringen Serumgehalt der Blutkuchen zurückzuführen waren.

Faßt man die Zahl aller untersuchten Blute ohne Rücksicht auf die Lagerungszeit in einer weiteren Tabelle zusammen und setzt sie in Beziehung zur deutschen Normalverteilung, so ergibt sich folgendes Bild (Tabelle 3).

Die Häufigkeit der bestimmten Phänotypen steht in recht guter Übereinstimmung mit der bekannten Normalverteilung. Daher ließen sich keine Schlüsse ziehen, welcher Typ weniger häufig als der Erwartung entsprechend bestimmt worden war. Außerdem ließ sich nicht die von anderen Autoren [23, 24] getroffene Beobachtung einer überwiegenden Instabilität des Hp 2—1 bestätigen.

Die Bestimmung der Hp-Typen aus *Blutspuren* ergab folgende Resultate:

In der Stärkegel-Elektrophorese konnte unabhängig vom Trägermaterial mit dem diskontinuierlichen Puffersystem bis zu 2—3 Tagen eine sichere Typendiagnose erzielt werden, wobei die von Culliford beschriebene, nicht sehr befriedigende Darstellung der Hp-Typen reproduzierbar war. Kleinste bestimmbar Fleckengröße auf Stoff: 0,5 ml Ausgangsvolumen, Blutschüppchen auf Glas: 0,1 ml Ausgangsvolumen. Letztere waren vereinzelt bis zu 14 Tagen bestimmbar. Auf eine photographische Wiedergabe sämtlicher Befunde der Stärkegel-Elektrophorese wurde wegen zu starker Hämoglobinverschmierung der Pherogramme verzichtet.

Die Immunoelktrophorese im Agargel ließ bei maximal 8 bis 14 Tagen alten Flecken von mindestens 0,5 ml Ausgangsvolumen auf Stoff und 0,05 ml auf Glas noch eine sichere Diagnose zu. Die nach diesem Intervall auftretenden diagnostischen Schwierigkeiten waren weniger auf Änderungen der elektrophoretischen Beweglichkeit als vielmehr auf einen fortschreitenden Schwund der Präcipitatlinien zurückzuführen (Abb. 5).

Wesentlich bessere Ergebnisse erbrachte auch hier die PAA-Gel-Elektrophorese (Abb. 6). Blutschüppchen auf Glas ergaben bei einer Mindestfleckengröße von 0,001 ml Ausgangsvolumen bis zu 28 Tagen eine einwandfreie Typendiagnose. Bei größeren Spuren waren einige Haptoglobine noch bis zum 40. Tag erkennbar. Flecken auf Stoff waren bis zu 16 Tagen und bis zu einer Fleckengröße von 0,05—0,1 ml Ausgangsvolumen exakt bestimmbar. Die Diagnostik noch kleinerer Flecken war zwecklos, da das zunehmende Mißverhältnis zwischen erforderlicher Lösungsmittelmenge und Blutfleckengröße zwangsläufig zu immer größeren, auch im PAA-Gel nicht mehr darstellbaren Titerverlusten führte. Fleckenextrakte wurden im PAA-Gel schneller aufgetrennt als Normalseren, stark hämolytische Seren dagegen langsamer. Mit fortschreitendem Spurenalter nahm die sonst hervorragende Transparenz der Pherogramme ab. Lediglich bei den 1—1-Typen war manchmal — ähnlich wie bei den stark hämolytierten Bluten — die 1—1-Bande von der Hämoglobinschleppe überlagert oder von ihr nicht scharf getrennt. Die Diagnose eines Hp 1—1 war in diesem Falle „per exclusionem“ zu stellen. Die Gefahr einer falsch positiven Diagnose ist gering, denn die Verwechslung mit einem Methämalbumin scheidet bei dieser Elektrophorese aus. Eine Verwechslung mit einem proteolytisch veränderten Hp-Typ 2—1 oder 2—2 ist ebenfalls auszuschließen, da selbst die stärkste, bei dem verwendeten Untersuchungsgut jedoch

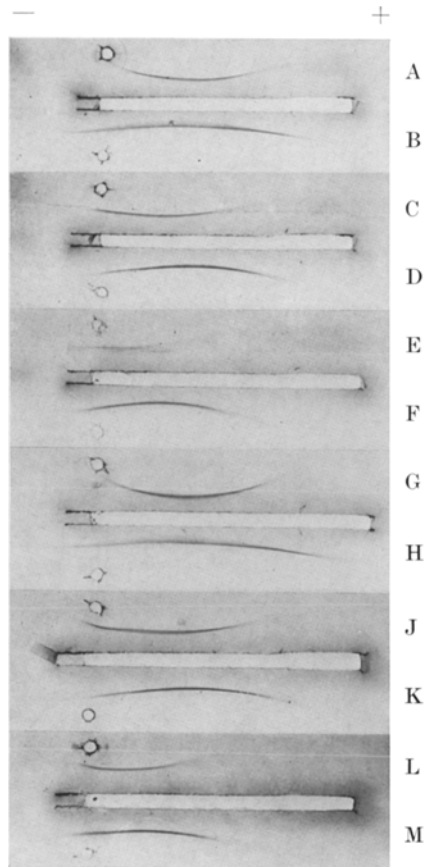


Abb. 5. Darstellung der Hp-Typen an 8 Tage alten Blutspuren auf Stoff (A, C, E) und auf Glas (G, J, L). Kontrollen wie bei Abb. 4

selten aufgetretene Transformation dieser Typen stets mehr als eine allenfalls mit einem 1—1-Typ zu verwechselnde Bande im kathodennahen Drittel der Gelsäule erkennen ließ. Zum Ausschluß einer fraglichen Ahaptoglobulinämie schließlich bietet sich eine Haptoglobin-Konzentrationsbestimmung, ein Ouchterlony-Test oder die Immunelektrophorese an.

Der Zusatz einer frischen Hämoglobinlösung zum Eluat verbesserte die Typisierung wesentlich, sofern es sich um Flecken nichthämolytischen Blutes handelte. Die Beobachtung Dürwalds [8], daß ein *nach* dem Auflösen der Flecken nichthämolyzierter Blute frei werdendes Hämoglobin nicht oder jedenfalls in geringerem Ausmaß als in Hämolysebluten in der Lage ist, sich an Haptoglobine zu binden, schien sich somit zu bestätigen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, daß die Blutspur möglichst bald nach der vollständigen Elution zu untersuchen ist.

Nach diesen Ergebnissen bedeutet die im Agargel sich abzeichnende und die Diagnostik bereits beeinträchtigende Proteinschädigung also keineswegs, daß eine Typendifferenzierung völlig aufgehoben ist. Offenbar gilt für die Hp-Typen in

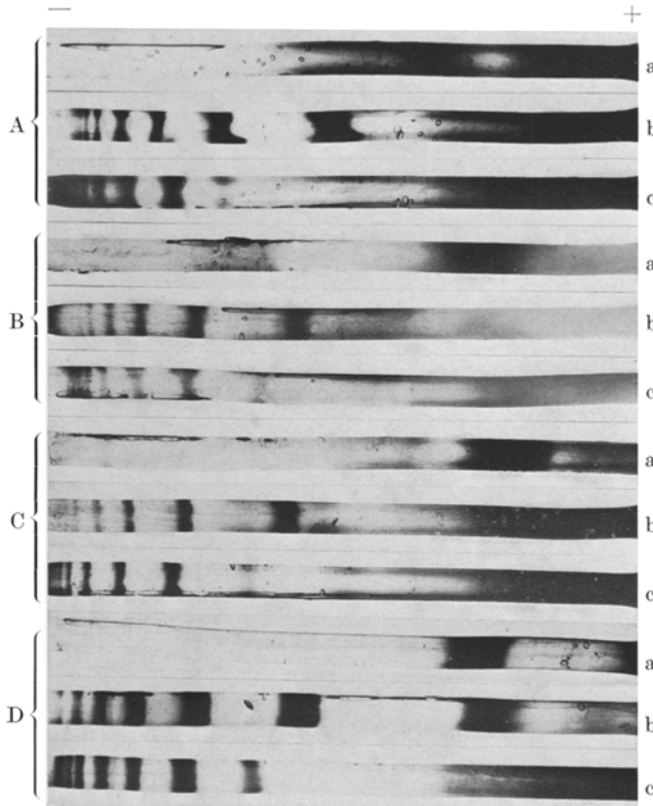


Abb. 6. Diskelektrophoretische Auftrennung der Hp-Typen an 2,5 Jahre gelagerten Alkoholbluten (A), an 14 Tage alten Blutspuren auf Stoff (B) und auf Glas (C) sowie an Kontrollseren (D). In allen Fällen zweifelsfreie Hp-Typen-Klassifizierung bei hervorragender Geltransparenz.  
*a* Hp 1—1; *b* Hp 2—1; *c* Hp 2—2

gelagerten Blutproben und in Blutspuren ähnliches wie bei den mit Neuramidase behandelten Haptoglobinen: die im Agargel erkennbare Transformation der Hp-Muster hat auf den heterogenen Haptoglobinkomplex im PAA-Gel-Test einen weitaus geringeren Einfluß, jedenfalls läßt sie über einen wesentlich längeren Zeitraum noch eine sichere Typendifferenzierung zu. Man kann annehmen, daß bei durchschnittlicher bakterieller Verunreinigung der Blutproben mit einer befriedigenden Hp-Diagnostik im PAA-Gel mindestens bis zu einer Lagerungszeit von 2 Jahren zu rechnen ist. Die geschilderten Vorteile der PAA-Gel-Elektrophorese gegenüber den herkömmlichen Verfahren bedeuten daher zweifellos eine Bereicherung der Untersuchungsaussichten sowohl bei Blutgruppenvergleichsbestimmungen nach langen Zeitintervallen als auch in der Blutspurendiagnostik.

#### Literatur

1. Baitsch, H., Klose, J., Omoto, K., Ritter, H.: Zur Technik der Immunelektrophorese — eine für große Reihenuntersuchungen geeignete Variante der Mikromethode. *Ärztl. Lab.* **10**, 42—47 (1964).

2. Bargagna, M., Bondi, G. C.: La determinazione del tipo aptoglobinico su macchie di sangue mediante immunoelettroforesi. *Min. medicoleg.* **88**, 183—186 (1968).
3. Brinkmann, B., Stallbaum, V.: Immunelektrophoretische Bestimmung der Haptoglobintypen aus Seren, alten Blutproben und Blutspuren. Festschrift zum 70. Geburtstag von Prof. Erich Fritz. Trittau: Scherbarth 1967.
4. Cleve, H.: Die gruppenspezifischen Komponenten des menschlichen Serums. Heidelberg: Hütbig 1965.
5. Culliford, B. J.: Haptoglobins and transferrins in forensic blood stains. *Nature (Lond.)* **198**, 796—797 (1963).
6. Culliford, B. J., Wraxall, B. G.: Haptoglobin types in dried blood-stains. *Nature (Lond.)* **211**, 872—873 (1966).
7. Davis, B. J.: Disc electrophoresis — II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci. (Wash.)* **121**, 404—427 (1964).
8. Dürwald, W.: Haptoglobinnachweis in Blutflecken. *Acta Med. leg. soc. (Liège)* **16**, 67—71 (1963).
9. Eichmann, K., Deicher, H., Cleve, H.: Immunologische Analyse der Beziehungen zwischen den drei verschiedenen Typen von Antigen determinanten normaler menschlicher Haptoglobine. *Humangenetik* **2**, 271—286 (1966).
10. Falk, H., Bundschuh, G.: Haptoglobine in Blutspuren. *Acta Med. leg. soc. (Liège)* **16**, 63—65 (1963).
11. Fiori, A., Marigo, M.: The reliability of Gc and Hp grouping of bloodstains. 3. Kongr. Poln. gerichtl. Med., Breslau 1965.
12. Gervais, P., Viescou, Cl.: Les possibilités de l'électrophorèse en gel d'acrylamide pour l'identification des taches de sang par les groupes d'haptoglobines. *Ann. Méd. lég.* **45**, 244—247 (1965).
13. Gervais, P., Viescou, Cl., Fournier, E., Gaultier, M., Dérobert, L.: Gel d'acrylamide et médecine légale. *Ann. Méd. lég.* **47**, 362—371 (1967).
14. Gonzalo, J. C., Cañadas, E. V., Calabuig, J. A.: Aplicación de los grupos plasmáticos Hp a la resolución de dos casos de individualización médico-legal de manchas de sangre mediante electroforesis en gel de poliacrilamida "en disco". *Zacchia* **46**, 502—515 (1971).
15. Hallermann, W., Sachs, V., Stürmer, K. H.: Haptoglobingruppenbestimmung in hämolytischem und Leichenblut. *Beitr. gerichtl. Med.* **22**, 111—116 (1962).
16. Heifer, U.: Untersuchungen über das Haptoglobin und Methämalbumin in Blut, Blutspuren und Sperma mittels Stärkegel-Elektrophorese. *Blut* **10**, 113—119 (1964).
17. Heifer, U., Bolkenius, M.: Gc-Diagnostik und Proteolyse in gelagerten Bluten, Leichenbluten und Blutspuren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **58**, 76—90 (1966).
18. Hilgermann, R.: Erfahrungen über die optimale Darstellung und Diagnostik der Gc-Typen. *Z. klin. Chem.* **5**, 317—321 (1967).
19. Hilgermann, R.: Veränderungen der Gc-Varianten durch enzymatische Einwirkungen. *Z. klin. Chem.* **7**, 617—623 (1969).
20. Hilgermann, R.: Haptoglobintypenbestimmung mittels vertikaler Säulenelektrophorese in Polyacrylamidgel. *Z. Rechtsmedizin* **70**, 16—24 (1972).
21. Hirschfeld, J.: Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta path. microbiol. scand.* **47**, 160—168 (1959).
22. Hirschfeld, J.: Immunoelectrophoresis — Procedure and application to the study of group-specific variations in sera. *Science Tools* **7**, 18—25 (1960).
23. Jörgensen, G., Gallasch, E.: Instability of heterozygous haptoglobin type 2—1 in starch-gel electrophoresis. *Lancet* **1962 I**, 1301.
24. Jörgensen, G.: Über die Instabilität des heterozygoten Haptoglobintyps 2—1 in der Stärkegelelektrophorese. *Z. menschl. Vererb.- u. Konstit.-Lehre* **37**, 122—127 (1963).
25. Laurell, C. B.: Determination of the haptoglobin group. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **11**, 18 (1959); zit. nach Prokop u. Bundschuh.
26. Migauchi, C.: *Rep. Nat. Res. Inst. Police Sci. (Tokyo)* **17**, 3 (1964); zit. nach Culliford u. Wraxall.
27. Nerström, B.: Experimental transformation of the group-specific components (Gc) of serum into a single alpha-1 globulin immunologically identical with the Gc. *Acta path. microbiol. scand.* **57**, 495—496 (1963).

28. Nerström, B.: On the transformation of Gc into an alpha-1 globulin by disintegrated blood cells and proteolytic enzymes. *Acta path. microbiol. scand.* **60**, 540—548 (1964).
29. Nerström, B., Skafte Jensen, J.: Immunoelectrophoretic analysis of blood stains with special reference to Gc grouping. *Acta path. microbiol. scand.* **58**, 257—263 (1963).
30. Nerström, B., Mansa, B., Frederiksen, W.: Alteration of the Gc patterns in human sera incubated with bacteria. *Acta path. microbiol. scand.* **61**, 474—482 (1964).
31. Ornstein, L.: Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci. (Wash.)* **121**, 321—349 (1964).
32. Poulik, M. D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature (Lond.)* **180**, 1477—1479 (1957).
33. Prokop, O., Bundschuh, G.: Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobine und Gm-Gruppen in Klinik und Gerichtsmedizin. Berlin: de Gruyter 1963.
34. Schleyer, F.: Photometrische Mengenbestimmung angetrockneter Blutspuren aus ihrem Hämoglobingehalt, bestimmt als Cyanhämglobin. *Blut* **17**, 20—24 (1968).
35. Schultze, H. E., Schwick, G.: Immunchemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- u. Lipoproteine. *Immunoelektrophoretische Studien. Behringwerk-Mitt.* **33**, 11—38 (1957).
36. Schultze, H. E., Biel, H., Haupt, H., Heide, K.: Über die Gc-Komponenten von Hirschfeld. II: Darstellung und Eigenschaften. *Naturwissenschaften* **49**, 108 (1962).
37. Schultze, H. E., Haupt, H., Heide, K., Heimburger, N.: Über die Chemie des Haptoglobin-Polymorphismus. *Clin. chim. Acta* **8**, 207—214 (1963).
38. Shim, B.-S., Bearn, A. G.: Immunological and biochemical studies on serum haptoglobin. *J. exp. Med.* **120**, 611—628 (1964).
39. Snellman, O., Sylvén, B.: Haptoglobin acting as a natural inhibitor of cathepsin B activity. *Nature (Lond.)* **216**, 1033 (1967).
40. Speiser, P., Neuhold, R.: Experimentelle Untersuchungen über die Zeitspanne der Nachweisbarkeit der Haptoglobintypen im Leichenblut. *Acta Med. leg. soc. (Liège)* **16**, 35—49 (1963).
41. Stürner, K. H., Bernheim, J.: Die Haptoglobinbestimmung in Leichenbluten. *Blut* **8**, 334—338 (1962).
42. Vogel, G.: Untersuchung von Blutspurenmaterial. *Kriminalistik* **16**, 439—442 (1962).
43. Whitehead, P. H., Morris, P. A.: Improved technique for the typing of haptoglobins in bloodstains. *J. forens. Sci. Soc.* **9**, 129—130 (1969).

Dr. med. Reinhard Hilgermann  
Institut für Rechtsmedizin der Universität  
D-3550 Marburg, Emil Mannkopf-Straße 2  
Bundesrepublik Deutschland