

# Zajištění stop v laboratoři

---



# Stopy x srovnávací vzorek

## Stopa

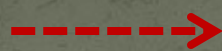
- biologický materiál (co vyprodukovala příroda) na místě činu, který má souvislost s TČ – stane se součástí zkoumání
- v podstatě cokoliv (KSSMTK x směs)
- pro genetiku – nutnost obsahu DNA

## Srovnávací vzorek

- biologický materiál odebraný osobě známé totožnosti x mrtvola neznámé totožnosti je stopa
- poškozený
- podezřelý
- domácí osoba
- eliminační vzorek



## BIOLOGICKÝ MATERIÁL



vše, co bylo či je součástí nebo produktem živého organismu



krev



sperma



sliznice



Lidské / zvířecí chlupy

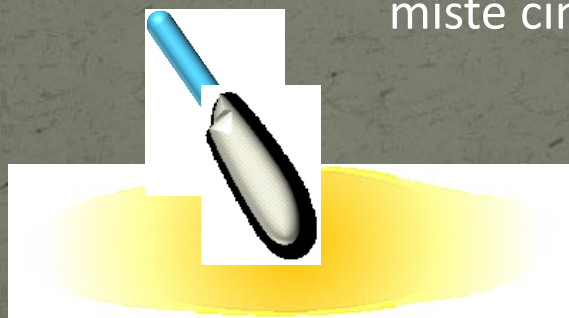
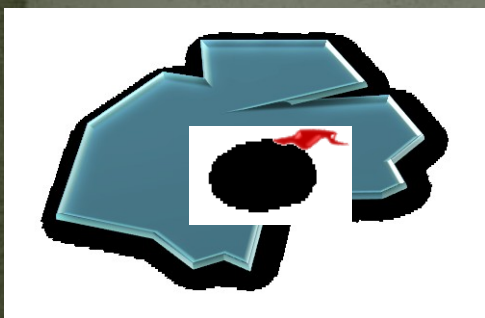


části rostlin

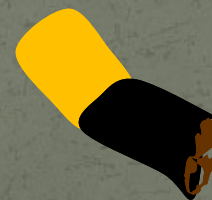
## BIOLOGICKÁ STOPA



biologický materiál zajištěný v souvislosti s kriminalisticky relevantní událostí – například na místě činu



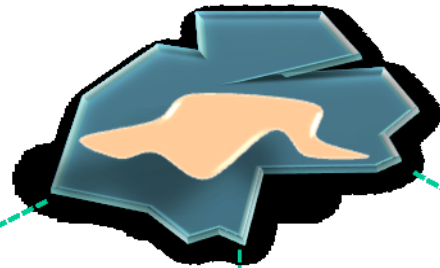
stěr moči



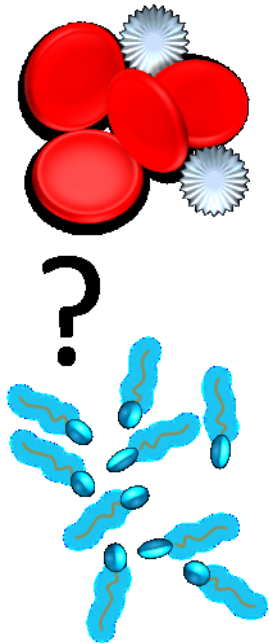
sliny na nedopalku



# biologická stopa



tkáňový původ



druhový původ



původce



# Stopa - neznámý vzorek

- nutno zjistit původ materiálu
- orientační testy a specifické testy

## ORIENTAČNÍ:

Orientační zkouška, která vyšla pozitivně, udává, že se může jednat o daný materiál, ale taky nemusí. Tyto zkoušky jsou velmi rychlé a levné. Jsou založeny na detekci přítomnosti určitých chemických látek nebo to jsou zkoušky s fyzikální podstatou, jako je užití světla. U orientačních zkoušek se vyskytují falešně negativní výsledky s nízkou frekvencí ovšem s vyšší frekvencí falešně pozitivní výsledky.

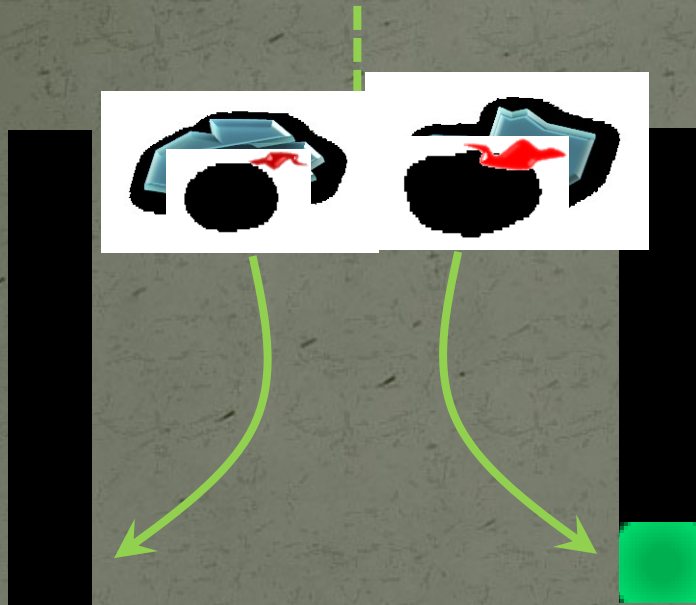
## SPECIFICKÉ:

Pozitivní výsledek specifické zkoušky indikuje, že se téměř určitě jedná o daný materiál. Specifické zkoušky poskytují vysokou pravděpodobnost, že se jedná o daný materiál. Existují i výjimky, kdy se může jednat o falešně pozitivní výsledek, ovšem tato pravděpodobnost je často zanedbatelná. Tyto zkoušky jsou založeny na detekci přítomnosti specifických bílkovin, hormonů atd. Určení druhu biologického materiálu se provádí u stop, kdy je tohoto materiálu dostatek a neohrozí se případné stanovení genetického profilu osoby, které by po odebrání určitého množství materiálu už nebylo možné stanovit v potřebné kvalitě.



## ORIENTAČNÍ ZKOUŠKA

pozitivní výsledek indikuje, že by se mohlo jednat o daný biologický materiál

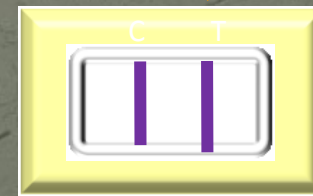
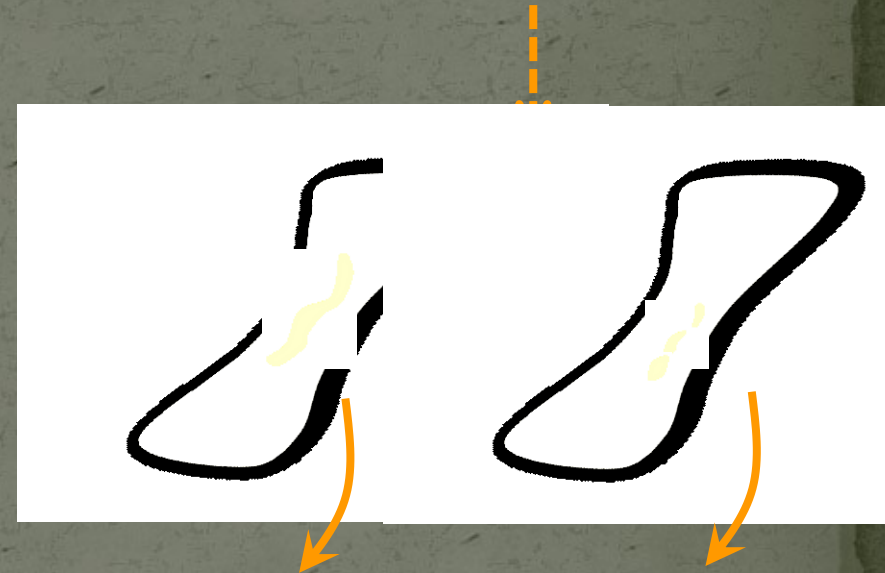


- výsledek = „nejspíš se nejedná o krev“

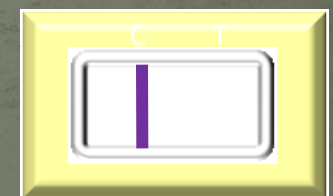
+ výsledek = „pravděpodobně se jedná o krev“

## SPECIFICKÁ ZKOUŠKA

pozitivní výsledek indikuje, že se prakticky s jistotou jedná o daný biologický materiál



+ výsledek = „s jistotou se jedná o sperma“



- výsledek = „s jistotou se nejedná o sperma“



# Krev

- neprůhledná tekutina červené až červenohnědé barvy
- další typy lidské krve, které lze odlišit:
  - pupečnicková krev — krev nenarozeného dítěte, která obsahuje velké množství krvetvorných kmenových buněk, obdobně jako kostní dřeň
  - menstruační krev — krev obsahující tkáň a výměšky děložní sliznice



# Orientační průkaz krve

- **Luminol** – orientační test



$C_8H_7N_3O_2$  (IUPAC: 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; o-Aminophthaloyl hydrazide, o-Aminophthalyl hydrazide, 3-Aminophthalhydrazide 3-Aminophthalic hydrazide)

všestranná chemikálie známá svojí chemoluminiscencí při smíchání s vhodným oxidačním činidlem v podobě modrého záření v tmavé místnosti

bílá až světle žlutá krystalická látka rozpustná ve většině organických rozpouštědlech, ale nerozpustná ve vodě

složení reakční směsi: 3-amino-ftalhydrazid (luminol),  $Na_2CO_3$ , destil.  $H_2O$ , perborát sodný (podle Grodského z roku 1951) nebo 3-amino-ftalhydrazid (luminol),  $NaOH$  (nebo  $KOH$ ),  $H_2O_2$  (podle Webera z roku 1966)

v buněčné biologii využíván pro detekci mědi, železa a kyanidů

pomocí reakce luminolu s hemoglobinovým železem je možné detekovat i stopové množství krve (ředění až  $10^7$ )   modré záření trvající cca 30 s

může ovlivnit množství a kvalitu DNA ve stopě





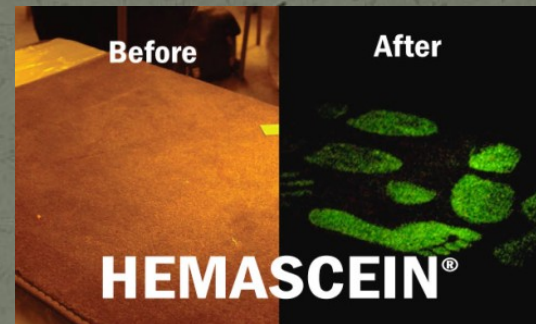
# Orientační průkaz krve

- BlueStar® Forensic (BlueStar) – orientační test
- test na bázi luminolu
- detekce krevních stop pouhým okem neviditelné (vyprané, vyčištěné skvrny apod.)
- schopnost detekce při ředění až 1:10000
- intenzivnější a delší luminiscence
- pro detekci není třeba úplná tma
- možná opakovaná aplikace
- falešně pozitivní reakce: brambory, rajčata, červená cibule, fazole, křen, kyselina askorbová, 5% bělidlo,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , sloučeniny chlóru a niklu



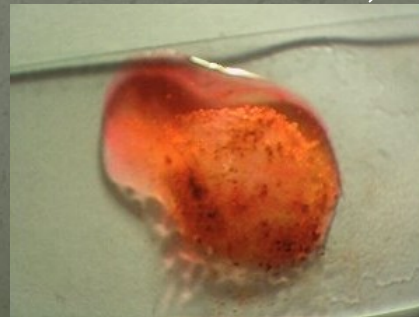
# Orientační průkaz krve

- Hemascein<sup>®</sup> (Abacus Diagnostics) – orientační test
- slouží k odhalení latentních krevních stop na bázi redoxní reakce
- neobsahuje luminol
- zkouška na bázi fluoresceinu
- nevyžaduje úplnou tmou
- fluorescence až 10 minut
- bez interakce s DNA
- zdraví nezávadný
- falešně pozitivní reakce: brambory, krev jiného živočišného druhu, některé oleje



# Orientační průkaz krve

- většina orientačních zkoušek se zaměřuje na detekci přítomnosti hemoglobinu.
- Kastle – Meyerův test – orientační test
  - poprvé popsán roku 1930
  - detekce hemoglobinu fenolftaleinem
  - zkouška založená na peroxidázové aktivitě hemoglobinu katalyzovat oxidaci fenolftaleinu ■■■ětle růžové zbarvení
  - reakce hemoglobinu a peroxidu vodíku, při kterém se spotřebovávají elektrony; fenolftalein se v této reakci chová jako dárce elektronů, dochází k redukci, mění tak svoji klasickou formu na fenolftalin a mění své prostředí na alkalické.



# Orientační průkaz krve

- Zkouška peroxidem vodíků ( $H_2O_2$ ) – orientační test
  - explozivní reakce - krev slouží jako katalyzátor při štěpení  $H_2O_2$  na vodu a kyslík ■■■■■ pické „zašumění“ vzorku
  - ničí DNA !!!
- Adlerův test - orientační test
  - krevní test založený na reakci benzidinu,  $Na_2O_2$  a ledové kyseliny octové ■■■■■ odro zelené zbarvení
  - vysoká citlivost (možná detekce vzorku při ředění 1:500000)



# Specifický průkaz krve

## Bertrandova zkouška – specifický test

Hb za přítomnosti  $MgCl_2$  tvoří s kys. octovou při teplotě  $120\text{ }^\circ\text{C}$  červenohnědé krystaly acetchlorheminu kosodélníkového či kosočtverečného tvaru

## Teichmannova zkouška – specifický test

důkaz krve pomocí heminových krystalů

objev roku 1853 – L. Teichmann

zahřátí směsi vzorku krve, chloridu sodného a kyseliny octové ■■■■■ hědé  
kosodélníkové krystalky, někdy ve formaci křížů nebo hvězdic

Nemusí se podařit nalézt krystalky u vzorku vystaveného teplotě kolem  $140\text{ }^\circ\text{C}$ .

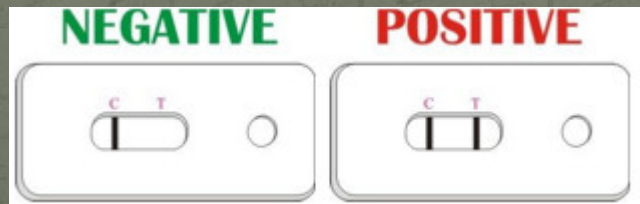
# Specifický průkaz krve

- Takayamova zkouška – specifický test
- specifická hemochromogenová zkouška pro určení krve ve skvrně
- hemochromogen = rozpadový derivát Hb s denaturovanou globinovou částí a dvojmocným železem
- vhodná k průkazu krevních skvrn starých, poškozených hnilobou, teplem, kyselinami nebo alkáliemi
- objev roku 1912 – Masao Takayama
- krevní skvrna na podložním sklíčku + reagens (glukóza, NaOH, pyridin, dest. H<sub>2</sub>O) + krycí sklíčko + zahřátí nad plamenem
- Fe z hemoglobinu reaguje s pyridinem za vzniku *oranžovo – červených krystalků*.
- vyžaduje velké množství materiálu



# Specifický průkaz krve

- SERATEC® HemDirect test (SERATEC) – specifický test
- test založený na imunochromatografii
- detekce lidského hemoglobinu na základě specifické reakce antigen – protilátka
- test původně vyvinutý pro účely detekce krve ve stolici ■■■■■ sná detekce rakoviny tlustého střeva
- falešně pozitivní reakce: krev primátů a fretky



# Specifický průkaz krve

## Hexagon OBTI

- využíván k detekci lidské krve
- detekce lidského hemoglonbinu (hHb) – monoklonální protilátka anti-human Hb
- reaguje při naředění 1 : 2,000,000 (cca 250 červených krvinek - 0.05 µg/ml hemoglobinu)
- falešně pozitivní reakce: primáti (gorilla) a fretkovití (lasička, jezevec)
- nereaguje s kráva, prase, ovce, koza, kůň, králík, kuře, kachna, husa, morče, jelen, kočka, pes



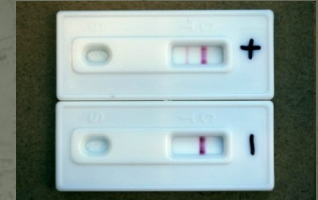


# Specifický průkaz krve

HemaTrace<sup>®</sup> (Abacus Diagnostics) – specifický test

detekční limit pro hemoglobin: 0,07 µg/ml

specifita pro lidskou krev, krev vyšších primátů a krev fretky



RSID<sup>™</sup> - Blood (Rapid Stain Identification) (Independent Forensics)

– specifický test

využití dvou monoklonálních protilátek proti specifickému proteinu

– glykoforin A – specifický membránový protein erytrocytů (místo

protilátek proti hemoglobinu) vyhnutí se křížové reakci s krví

fretky, skunka, vyšších primátů apod.

schopnost detekce < 1 µl krve



Extract (µl):	0	0.2	1	5	20	100
Blood (µl):	0	0.01	0.05	0.25	1.0	500

Rapid Stain  
IDENTIFICATION



**RSID**  
Independent  
Forensics

# Menstruační krev

## PMB test (SERATEC)

- kombinace detekce lidského hemoglobinu a D-dimeru
- D-dimer je fibrin degradující produkt přítomný v krvi, resp. krevní sraženině, a je degradován fibrinolýzou
- obsahuje dva zesíťené D fragmenty fibrinového proteinu, ze kterého je odvozen název D-dimer (menstruace je spojena s aktivací koagulačních a fibrinolytických drah)
- citlivost: hemoglobin: 20 ng/mL; D-dimer: 400 ng/mL  
– nule/jeden – tři proužky
- falešně pozitivní: primáti a fretky

# Detekce slin

Amyláza – enzym štěpící škrob na jednodušší cukry

- první enzym, který byl nalezen a izolován (1833)

-  $\alpha$ -amyláza produkovaná slinnými žlázami = ptyalin – štěpí  $\alpha$ -glykosidickou vazbu obsaženou v polysacharidech za vzniku menších jednotek – dextrinů

Lugolův roztok (Lugolovo činidlo) - roztok elementárního jodu a jodidu draselného ve vodě

- používaný pro důkaz škrobu (jod se váže do molekuly škrobu) ■■■■■ navě modré zbarvení

- v přítomnosti slin (obsahují  $\alpha$ -amylázy), dojde ke štěpení  $\alpha$ -glykosidické vazby, a tím k degradaci škrobu na menší jednotky ■■■■■ d se nemá kam vázat ■■■■■ to – hnědé zbarvení

Roztok škrobu s Lugolovým činidlem bez slin



Roztok škrobu s Lugolovým činidlem se slinami

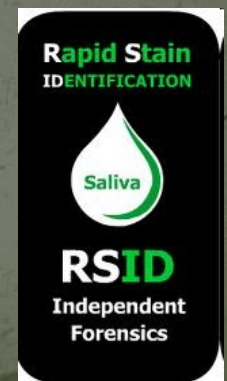


# Detekce slin

- RSID™ - Saliva (Rapid Stain Identification) (Independent Forensics) – specifický test
  - specifický test pro detekci lidské slinné  $\alpha$ -amylázy
  - metoda založená na imunochromatografii se dvěma monoklonálními protilátkami
  - test specifický pro lidský slinný (AmyA) antigen ██████ bez zkřížené reakce s krví, spermatem, močí, vaginálním sekretem, menstruační krví a zvířecími slinami
  - detekční limit:  $< 1 \mu\text{l}$



Extract ( $\mu\text{l}$ ):	0	1	5	10	20
Saliva ( $\mu\text{l}$ ):	0	0.05	0.25	0.5	1.0



# Detekce spermatu

- Phosphatesmo KM

- reaguje s kyselou fosfatázou, kterou obsahuje sperma

- zkoumané místo nejprve vizuálně prohlédněte - textilie vykazují na podezřelých místech tužší krepovitou strukturu, pod UV světlem mají stopy modravou, bílou nebo žlutavou fluorescenci

- místo navlhčit, přiložit testovací plochou po dobu cca 15 s a je-li přítomno sperma, po několika sekundách se objeví výrazné fialové skvrny



# Detekce spermatu

- Fast Blue B – sůl  $C_{14}H_{12}N_4O_2Cl_2 \cdot ZnCl_2$  - orientační test
- detekce kyselé fosfatázy – glykoprotein produkovaný mužskou prostatou ■■■ transport do seminální tekutiny – koncentrace až 400x vyšší než v jiných tělních tekutinách
- PAP (prostatic acid phosphatase) – 1. celosvětově využívaný tumorový marker
- přidání několik kapek monohydrátu  $\alpha$ -naftylfosfátu sodného a roztoku Fast Blue B ke vzorku ■■■■ purpurové zbarvení indikující přítomnost PAP

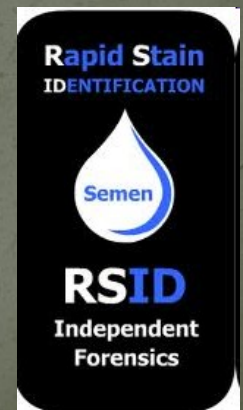


# Detekce spermatu

- RSID™ - Semen (Rapid Stain Identification) (Independent Forensics)
  - specifický test
  - využití dvou monoklonálních protilátek proti specifickému proteinu
    - semenogelin – hlavní složka lidské seminální tekutiny
    - vyhnutí se křížové reakci se spermatem kozla, berana, prasete, býka, psa, koně, myši, kocoura
  - metoda založená na imunochromatografii
  - bez zkřížené reakce s lidskou krví, slinami, močí
  - detekční limit: < 1  $\mu$ l lidského spermatu



Extract ( $\mu$ l):	0	1	5	25	100
Semen ( $\mu$ l):	0	0.05	0.25	1.25	5.0



# Detekce spermatu

ABAcard® p30 test (Abacus Diagnostics) – specifický test

využití monoklonální protilátky proti specifickému proteinu – PSA (prostatický specifický antigen) = p30 =  $\gamma$ -seminoprotein – glykoprotein produkováný prostatou a sekretovaný do ejakulátu

umožnění detekce spermatu i u jedinců s azoospermií nebo po vazektomii

metoda založená na imunochromatografii



tělní tekutina	PSA (ng/ml)
sperma	200000-5,5 mil.
amniotická tekutina	0,60-8,98
mateřské mléko	0,47-100
sliny	0
ženská moč	0,12-3,72
ženské sérum	0,01-0,53



# Detekce spermatu

- SERATEC® PSA Semiquant (SERATEC) – specifický test
- využití monoklonální protilátky proti specifickému proteinu – PSA (prostatický specifický antigen) = p30 =  $\gamma$ -seminoprotein – glykoprotein produkovaný prostatou a sekretovaný do ejakulátu
- umožnění detekce spermatu i u jedinců s azoospermií nebo po vazektomii
- metoda založená na imunochromatografii
- původně vytvořený pro detekci rakoviny prostaty



# Detekce spermatu

- SPERM HY-LITER™ (Independent Forensics) – specifický test
- využití derivované monoklonální myší protilátky proti spermatickým hlavičkám
- detekce lidských spermií z míst sexuálních útoků s využitím fluorescenčního mikroskopu
- možné detekovat jedinou spermii
- bez zkřížené reakce s epiteliálními buňkami, krvinkami a spermatem zvířat



# Detekce moči

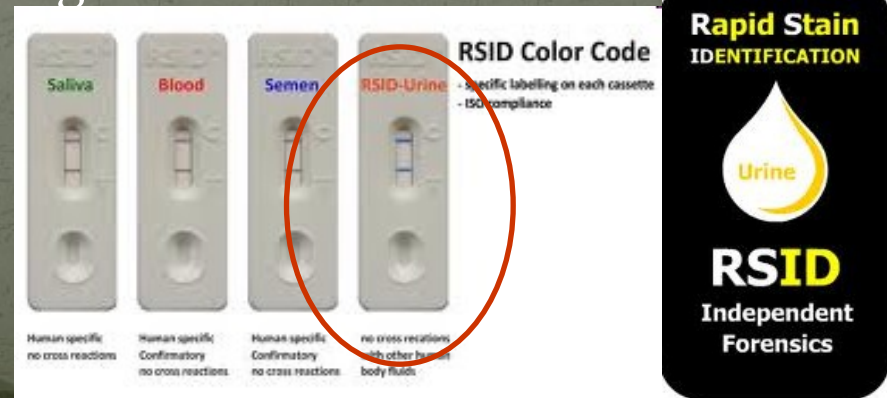
RSID™ - Urine (Rapid Stain Identification) (Independent Forensics) – specifický test

využití dvou polyklonálních králičích specifických protilátek proti THP proteinu (Tamm - Horsfall protein) – nejhojnější protein v lidské moči  
vyloučení se křížové reakci s lidskými slinami, spermatem, krví, vaginální tekutinou nebo menstruační krví; moči želvy, gorily, koně, kočky

reakce s močí psa !!!

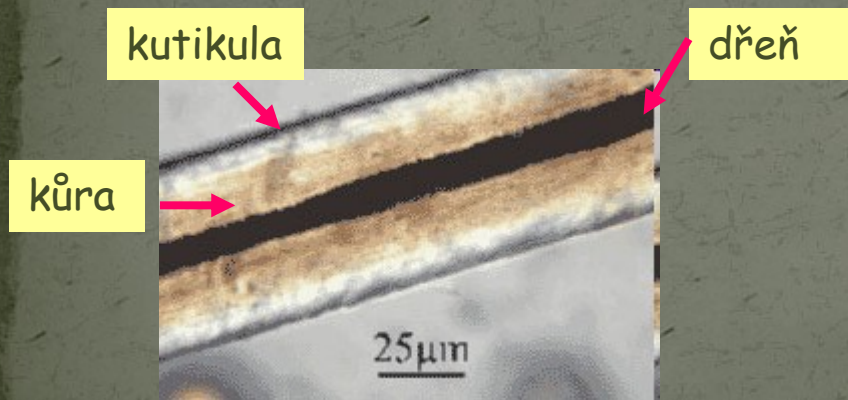
metoda založená na imunochromatografii

detekční limit: < 10 µl lidské moči

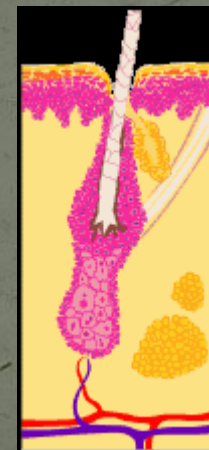


# Detekce trichologického materiálu

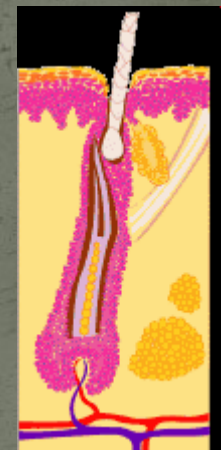
- Detekce založena především na morfologickém porovnání na dvou úrovních:
  - 1) odlišení lidského trichologického materiálu od materiálu jiného živočišného druhu
  - 2) odlišení: vlasy - kožní ochlupení - pubické ochlupení - axilární ochlupení



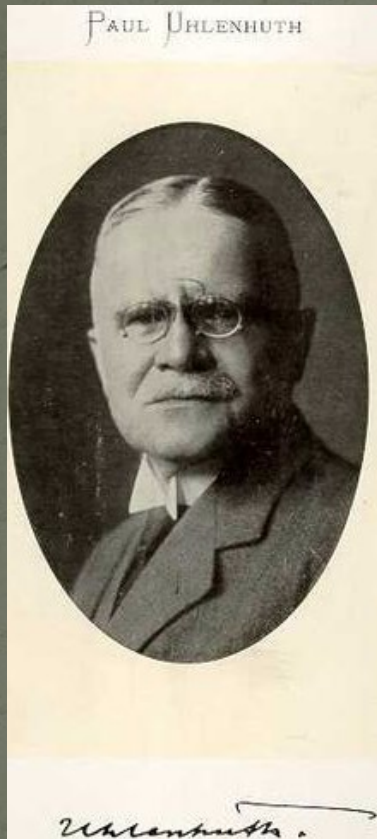
anagenní  
(růstová) fáze



katagenní  
(přechodná) fáze



telogenní  
(klidová) fáze



## Paul Uhlenhuth (1870-1957)

průkaz lidské krve na základě precipitační zkoušky umožňující odlišit lidskou krev od krve jiného živočišného druhu

předpoklad: krev různých živočišných druhů obsahuje unikátní proteiny. S použitím příslušných protilátek je možné krev jednotlivých druhů odlišit

- Průkaz lidského původu lze provést samostatně imunologickými metodami (reakcí lidské bílkoviny se specifickou protilátkou), častěji ale průkaz lidského původu vyplyne „samovolně, jako vedlejší produkt“ z výsledku genetického zkoumání.
- Většina forenzně genetických testů užívaných k analýzám lidského biologického materiálu totiž poskytuje standardní pozitivní výsledek právě jen a pouze u lidského materiálu – říkáme, že tyto testy jsou druhově specifické.
- Poskytne-li analýza stopy pozitivní výsledek, lze zpětně konstatovat, že stopa obsahovala s jistotou lidský biologický materiál. Z tohoto důvodu se od imunologického průkazu lidské bílkoviny většinou upouští, a to zejména u stop s předpokládaným malým či velmi malým množstvím využitelného biologického materiálu.

## MRTVOLY



dle stavu těla, tj.  
pokročilosti degradace:

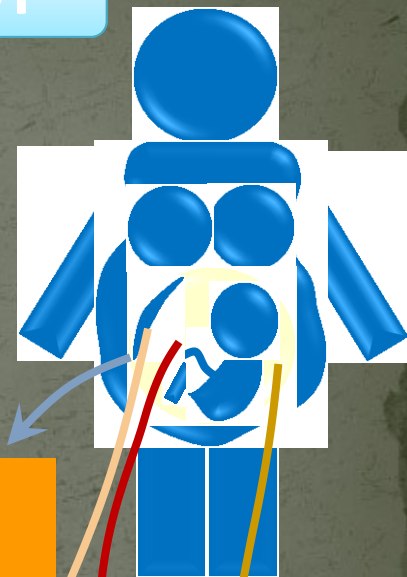
**BUKÁLNÍ STĚR**

**PERIFERNÍ KREV**

**SVALOVÁ TKÁŇ**

**KOST, ZUB**

## EMBRYA, PLODY



dle situace:

**POTRATOVÝ  
MATERIÁL**

**CHORIOVÉ KLKY**

**PLODOVÁ VODA**

**PUPEČNÍKOVÁ KREV**

# Dělení dle druhu biologických stop a jejich výskytu

- Podle vztahu jejich zůstavitele k objasňované události
  - stopy pocházející z organismu pachatele
  - stopy pocházející z organismu oběti
  - stopy pocházející z organismu jiné (nezúčastněné) osoby
  - směsné stopy – pocházející z organismů nejméně dvou osob
- Podle místa nálezu
  - na místě činu
  - na předmětech a nástrojích, kterými mohl být spáchán trestný čin
  - na oděvních součástkách a těle pachatele
  - na oděvních součástkách a těle oběti
  - na vozidlech
  - na dalších předmětech a místech (se spácháním trestného činu nemusí souviset )



- **Stopy viditelné okem** - drobné biologické stopy
  - krevní kapky, otěry
  - zaschlý nosní sekret
  - vlasy, stopy slin na skleničkách atd.
- **Stopy okem neviditelné** - odhalitelné s použitím speciálních pomůcek či postupů (orientační či specifické zkoušky, monochromatické forenzní světelné zdroje - forenzní „baterky“)
- **Stopy latentní** - nemožnost detekce ani okem, ani screeningovými testy
  - zajišťují se „naslepo“
  - odebírány v místech, kde výskyt biologického materiálu předpokládáme
  - nástroje, oblečení, předměty

# Biologie x genetika

- biologie: původ biologického materiálu
- pouze a jedině znalec totiž může určit, zda stopa má skutečně povahu biologického materiálu či nikoli
- 1) vyhledat
- 2) zajistit
- 3) otestovat
- 4) odebrat na genetiku



# Krevní stopy

- otestovat předpokládané místo pomocí Hemophanu
- zajistit část (střihem, stěrem) červenohnědou skvrnou do zkumavky
- přidat x ul pufru
- počkat cca 15 min. a pak nanést tekutinu na kazetový test

# Sliny, moč a sperma

- zajistit část (stříhem, stěrem) část materiálu s nosičem do zkumavky
- přidat x ul pufru
- počkat cca 15 min. a pak nanést tekutinu na kazetový test