



BIOMEDREG  ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ A
TRANSLAČNÍ MEDICÍNY

Biologické stopy: sérologie, odorologie

doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD.
Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny,
LF UP a Fakultní nemocnice Olomouc



Cíl lekce

- Po této lekci byste měli:
 - znát složení krve, semene a slin
 - znát orientační testy na rozlišení krve, semene a slin
 - znát princip sérologických testů
 - znát princip analýzy rozptřeni krevních skvrn
 - znát omezení odorologie.

Osnova přednášky

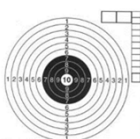
- Krev
- Rozptřeni skvrn
- Semeno, sliny, pot, moč
- Kostí
- Pach

Biologické stopy

- Lidské biologické stopy
 - spontánně oddělené (moč, lejno, pot, sliny, slzy, ejakulát, odloupaná pokožka, vlasy, chlupy, menstruační krev, plodová voda, mateřské mléko)
 - mechanicky, chemicky, fyzikálně oddělené (kosmetické úpravy, lékařský zákrok, násilí: krev, části tkání, kostí, pokožky; vytržené vlasy a chlupy; mozkomíšni mok, nitrokloubní tekutina, žaludeční obsah)
 - posmrtné (mrtvola a její část, kost a její část)
- Stejným způsobem zkoumat skvrnu i podklad.

Zkoumání

- Může to být biologický materiál?
 - je to biologický materiál?
 - je to lidský nebo zvířecí materiál?
 - kterému člověku patří?



Pravidla

- Nedotýkáme se stop holou rukou
- Pokud to je možné, zajistíme celý předmět nesoucí stopu
- Pokud nelze, stopu sterilně sejmeme do sterilního obalu
- Ke zkoumání zasíláme suché
- Zajišťujeme všechny stopy, protože vizuálně nelze odlišit různé zdroje (všechny stopy se nemusejí analyzovat).

Hledání biologických stop

- Použití chirurgických sterilních (DNAfree) rukavic
- Prohlédnutí přístupových cest
- Prohlédnutí objektů, rostlinného porostu
- Prohlédnutí těla lékařem, za přítomnosti lékaře (nebo policistou stejného pohlaví)
- Prohlédnutí oděvních součástí – znalec v laboratoři
- Dokumentace protokolem a fotografií
- Srovnávací materiál: vlasy, chlupy (kriminálněvědní technik), sliny, krev, poševní výtěr (lékař).

Vzorky při znásilnění

- Zranění a modřiny
- Od oběti
 - krev pro DNA analýzu
 - oblečení vysvléct na bílý papír
 - vyčesání pubických chlupů
 - výtěr úst
 - výtěr vagíny
 - (výtěr řitě, cervikální výtěr, chlupy, vlasy, tělesné tekutiny na těle)
- Od podezřelého
 - krev pro DNA analýzu
 - oblečení vysvléct na bílý papír
 - vyčesání pubických chlupů
 - výtěr penisu
 - (sliny, tělesné tekutiny na těle).

Nejčastější biologický materiál

- Krev
- Ejakulát (semeno)

Krev

Krev

- Tekutá tkáň
 - Tekutá část – plazma (sérum + bílkovinné faktory srážlivosti)
 - Buňky – erytrocyty, leukocyty, trombocyty.

Plazma

- 55% objemu krve
- Proteiny (protilátky, hormony, enzymy)
- Živiny (aminokyseliny, glukóza)
- Metabolity, anorganické látky (soli)
- Léky, drogy.

Buňky

- 45% objemu krve
- Červené krvinky (u savců bez jádra)
- Bílé krvinky (fagocyty, lymfocyty)
- Destičky.

Antikoagulancia

- EDTA
- Citrát
- Heparin.

Krevní stopy

- Kapky
 - Dopad krve na podložku
- Stříkance
 - Otevření cévy, opakované údery dokrvácející rány
- Stružky
 - Vytékání krve z ran
- Kaluže
 - Výrazné krvácení, v blízkosti postiženého místa
- Otisky a otěry
- Zbytky odstraňovaných stop.

Sběr krevních stop

- Mechanický
 - odloupení nebo seškrabání sterilním (DNAfree) jednorázovým skalpelem
- Fyzikální
 - převedení do roztoku, odběrový kartáček (DNAfree), nasátí do gázy, cigaretového papírku, buničiny, bavlny; vysušení; zaslání ke zkoumání.

Přeprava

- Vše označené
 - provizorně, na policejním útvaru trvale
- Rychlá, šetrná
 - pozor na teplo, slunce, smíchání, rozlití
- Na útvaru, v laboratoři
 - usušení pokojovou teplotou na čistém místě
 - zabalení (vše zvlášť; do prodyšného obalu - papíru; do zkumavek), označení, protokol, požadavky na zkoumání (vyznačení částí textilní látky obšitím, křídou, tužkou), k navlhčení chlopni obálek pro zalepení se použije čistá voda.

Orientační krevní testy

- Rozlišení krve od čokolády, rzi, červeného inkoustu, kečupu
- Orientační zkoušky mohou reagovat nespecificky s chlorofylem, inkoustem, zubní pastou
- **H₂O₂** s krví pěni
- Na **UV světle** vypadá krev jako tmavá skvrna
- Reakce s **o-tolidinem a benzidinem** (modrozelená barva)
 - Falešné pozitivivy s červenou řepou, kečupem, pomerančovým džusem
- Reakce s **luminolem** (ve spreji, luminescence ve tmě)
 - i na velké plochy (nevadí následné DNA analýze)
- Hemoglobin katalyzuje oxidaci (**peroxidázová aktivita hemu**)
 - Komerční: Hematest, Desmophan
 - fenolftalein – redukováný bezbarvý, oxidovaný růžovofialový (Kastle-Meyerův test, viz http://www.youtube.com/watch?annotation_id=annotation_803382&feature=iv&src_vid=HbG8Cps7uDA&v=sF0Z0JJGwX8), pomoci H₂O₂
 - LMG leukomalachitová zeleň 4,4-benzylidenebis(N,N-dimethylaniline), bezbarvá na modrozelenou
 - Falešná pozitivita z křenové a bramborové peroxidázy
 - Provedení: přeložíme nadvakrát kolečko filtrovacího papíru 25 mm v průměru; na špičku nasajeme testovanou látku; přidáme chemikálie.

Specifické krevní testy

- Specifická zkouška na krev
 - krystalografická
 - spektroskopická pro hemoglobin
 - komerční sety
- Rozlišení lidské krve
 - imunohistochemie: imunoprecipitace, barevné reakce: detekční krok alkalická fosfatáza, křemová peroxidáza
- Rozlišení zdroje
 - tepenná
 - žilní
 - menstruační.

Důkaz krve ve skvrně

- Krystalograficky
 - **Bertrandova** zkouška – kosodélníkové hnědavé krystalky acetchlorheminu (kyselého hematinu)
 - **Takayamova** zkouška – mikrokrytalizace hemoglobinu po zahřátí; vznikají oranžově červené pentlicovité až vločkovité krystalky hemochromogenu.

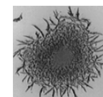


Foto: Miami Dade Forensic Police Department

HemDirect from Seratec®



Důkaz krevních skvrn z plodu

- Plod, novorozenec a kojeneček
 - fetální hemoglobin HbF je alkali-acidorezistentní (pomalejší změna barvy)
 - alfa 1 fetoprotein

Ženská krev

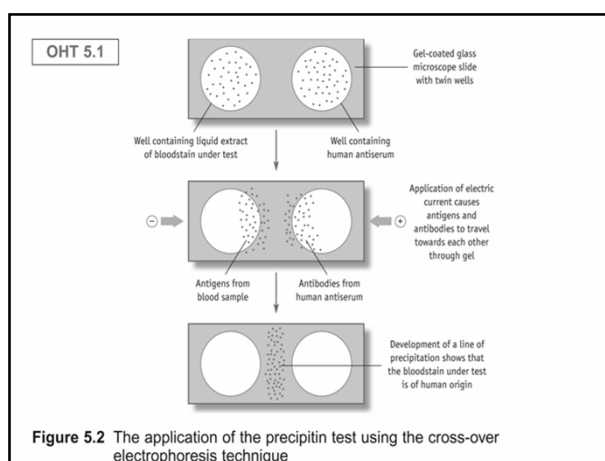
- Těhotenská
 - Choriogonadotropin (normální hodnoty 0 - 10, v těhotenství > 500)
- Menstruační
 - fibrinolytická aktivita (rozpouští sraženinu).

Transfundovaná krev

- Nekompatibilní transfúze
 - detekovatelné v glomerulech ledvin

Rozlišení zvířecí krve

- DNA
- Ramanova spektroskopie (partial least square discriminant analysis)
- Sérologický test
 - Ag-Ab
 - 1901 Paul Uhlenhuth: tekuté postředí
 - injikoval králíka bílkovinami slepičího vajíčka
 - odebral králíkoví sérum
 - přidal sérum k vaječnému bílku
 - pozoroval vznik precipitinu
 - v současné době specifické protilátky proti jednotlivým zvířatům; prostředí/formát: dvě vrstvy v kapiláře, křížová elektroforéza, dvojitá radiální imunodifúze v agaru dle Ouchterlonyho



Imunohistochemické typy

- Tkáň naložené ve formaldehydu
 - aldehydy reagují s aminoskupinou aminokyselin a zachovávají část enzymatické a antigenní aktivity
- (Částečné) zrušení nepříznivých účinků fixace
 - natrávení proteolytickými enzymy
 - revitalizace mikrovlnami

Rozlišení pohlaví

- Sex chromatin (Barrovo tělísko)
- Chromosom Y
- (Znaky na chromosomu Y)

Rozlišení krevní skupiny

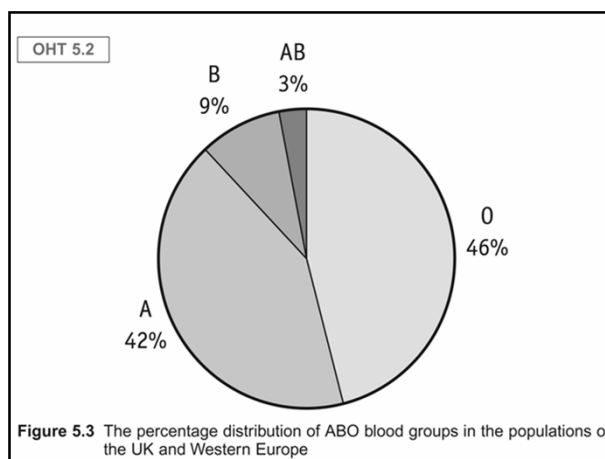
- Test smíšené aglutinace, absorpčně eluční test
- ABO systém
- Na erythrocytech, endotelu cév, epitelu, v hlenu (u vylučovatelů i jinde)
- Základní jsou tři alely: I^A , I^B a i (někdy označovaná jako I^O). I^A a I^B jsou *kodominantní*, i je vůči oběma *recesivní*

Aglutinogeny (antigeny)

- Skupina A
 - Tvoří se pouze aglutinogen A
- Skupina B
 - Tvoří se pouze aglutinogen B
- Skupina AB
 - Tvoří se oba aglutinogeny
- Skupina 0
 - Netvoří se žádný aglutinogen.

Aglutininy (imunoglobuliny)

- Skupina A
 - Tvoří se pouze aglutinin anti-B.
- Skupina B
 - Tvoří se pouze aglutinin anti-A.
- Skupina AB
 - Netvoří se žádný aglutinin.
- Skupina 0
 - Tvoří se oba aglutininy.



Sekretorství (vylučovatelství)

- 80% populace
- Přítomnost ABO antigenů i na nekrevních buňkách
- Možnost určit krevní skupiny ze slin, žaludečních šťáv, moči, potu nebo semene
- (DNA).

Další krevní systémy

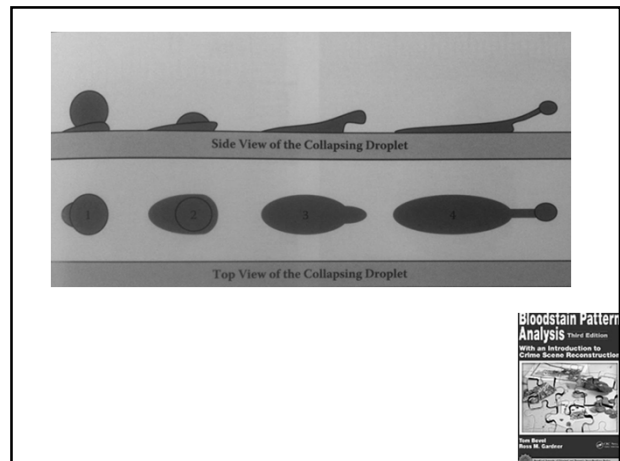
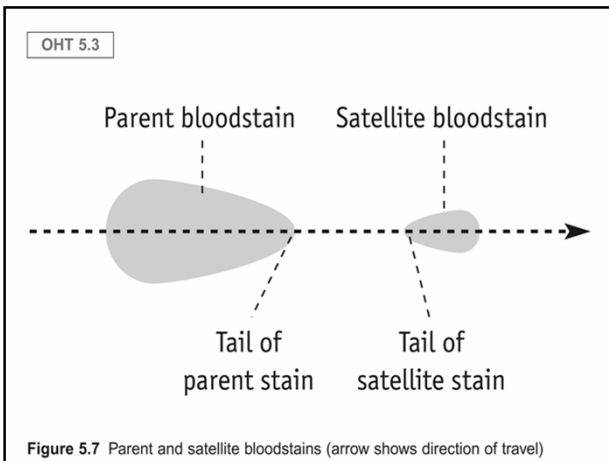
- Rh (*Macaca mullata*), Diego, MNS, Duffy, Lutheran, Kell, Kidd, Lewis, Landsteiner-Wiener,

Polymorfní enzymy séra

- PGM fosfoglukomutáza detekovatelná i po usušení skvrny
- Další enzymy dříve používané k určení otcovství (dnes DNA).

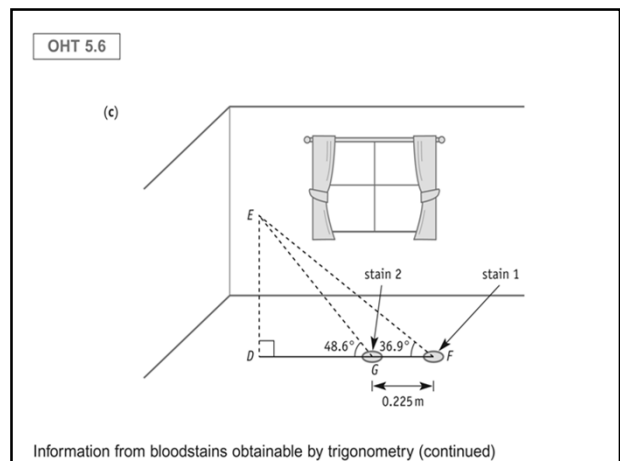
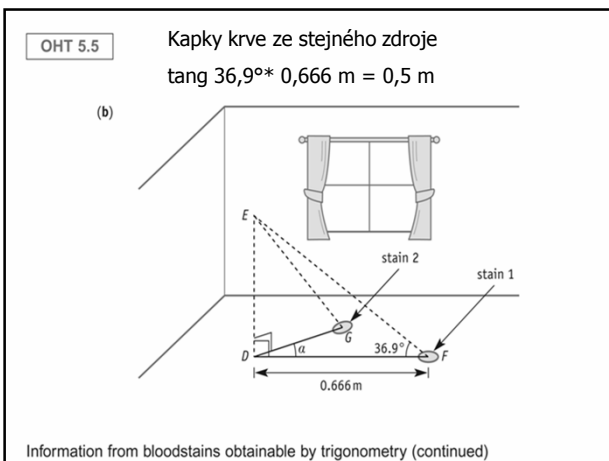
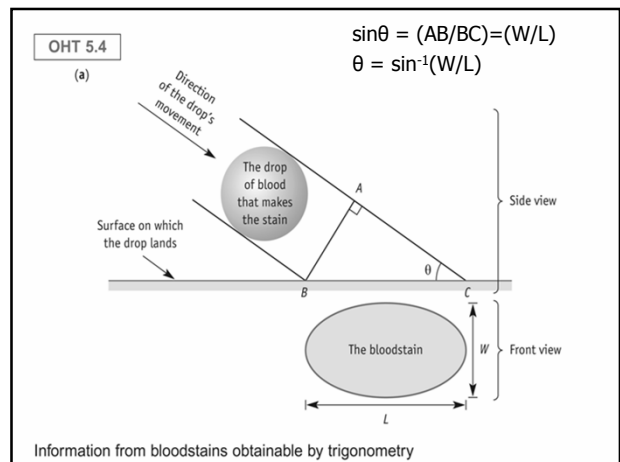
Analýza rozprostření krevních skvrn

- Rekonstrukce násilných událostí
 - co se stalo
 - časový sled
- „Aktivní“ skvrny
 - negravitační pohyb
 - natlakovaná krev z arterií
 - krev z útočného nástroje (zastavení pohybu nástroje).



Určení úhlu dopadu kapky

- Biomechanika
- Trigonometrie (goniometrie)
 - předpoklad přímočarého pohybu kapky není splněn kvůli gravitaci, takže poskytuje jen odhady



Příklad

- Jedna kapka 4 mm dlouhá a 3 mm široká dopadla pod úhlem $48,6^\circ$; druhá kapka 5 mm dlouhá a 3 mm široká dopadla pod úhlem $36,9^\circ$.
- Z jakého místa kapky vyletěly?

OHT 5.6

(c)

$$GEF = 180^\circ - (36,9^\circ + 131,4^\circ) = 11,7^\circ$$

$$GF / (\sin GEF) = EF / (\sin EGF)$$

$$EF = GF \cdot \sin EGF / (\sin GEF) = 0,832 \text{ m}$$

$$DE = EF \cdot \sin 36,9^\circ = 0,5 \text{ m}$$

$$DF = EF \cdot \cos 36,9^\circ = 0,666 \text{ m}$$

Information from bloodstains obtainable by trigonometry (continued)

Pasivní krevní skvrny

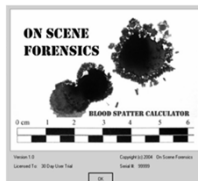
- Jen působením gravitace
- Pozice těla někdy může zabránit toku krve
- Změna polohy mrtvého těla se odrazí ve změně toku krve
- Kulatá kapka krve tvoří rychle (50 s) oschlý kroužkovitý okraj (i při utření lze vidět); možnost odhalit snahu umýt skvrny.

Přenos krevních skvrn

- Utření vražedného nástroje do hadru
- Krev může náležet více osobám – DNA analýza.

Software

- BackTrack
<http://www.physics.carleton.ca/~carter/>
- Spatter Calculator
<http://www.onsceneforensics.com/Spatter%20Calculator.htm>



Případ Graham Backhouse

- 1984 výhružné telefony a dopisy farmářů Grahamovi Backhouseovi
- Hlava ovce s cedulkou „You next“
- Po otočení klíčem vybuchlo auto manželky Margaret Backhouse
- Policejní hlídání zrušeno, místo toho napojení na alarm
- Po spuštění alarmu Graham ležel pobodaný a u něj jeho zastřelený soused Colyn Bedale-Taylor.

Verze Grahama

- Pohádal se se sousedem Colynem
- Colyn se přiznal k položení bomby do auta Grahama
- Po přiznání Colyn napadl nožem Grahama
- Graham doběhl pro pušku, Colyn neuposlechl varování a Graham ho zastřelil.

Nesrovnalosti verze

- Na místě rvačky (v kuchyni) bylo málo krve
- Na stěnách nebyly stříkance krve odpovídající rvačce
- V kuchyni byla jen pasivní Backhouseova krevní skvrna
- Převrácená křesla zakrývala krevní skvrny
- Na křesle byl otisk Backhouseovy krvavé ruky, ale na pušce nebyly žádné stopy krve
- Nebyly kapky krve směrem k místě uschování pušky
- Bedale-Taylorova ruka s nožem byla zakravená po celém povrchu
- Zranění Backhouse nožem vypadalo, jako by se nebránil.

Důvod vraždy

- Backhouse chtěl od sebe k sousedovi odvést vyšetřovatele při hledání strážce bomby
- Manželku chtěl zabít kvůli 100 000\$ pojistce (dlužil 70 000\$)
- Výhružné dopisy si posílal sám.

Semeno (ejakulát)

Semeno (ejakulát)

- pH 7,2 až 7,4
- Zásadité výměšky mužských pohlavních orgánů při orgasmu = sperma ze semenného vaku (spermatozoa, voda, sůl, bílkoviny, fruktóza, spermin, cholin) + spermatická plazma (vyměšky prostatických žláz: kyselina citrónová, alkalická fosfatáza, zinek a výměšky bulbouretrálních žláz).
- Obvykle 5 až $15 \cdot 10^7$ spermatozoí na ejakulaci
- Ejakulát 2 až 6 ml
- Oligospermie: $< 2 \cdot 10^7$ spermatozoí na ml
- Azoospermie: nepřítomnost spermií v ejakulátu (vasektomie).

Testy na semeno

- Pod UV fluoreskuje
 - moč falešně pozitivně, azoospermie falešně negativně
- Mikroskop
- Kyselá fosfatáza ACP
 - s α -naftylfosfátem za přítomnosti o-dianisidinu růžová barva do 30 sekund
- p30 (PSA prostatický specifický antigen)
 - sérologicky
- DNA testy
 - na azoospermické muže testování znaků na chromozomu Y.

Komerční kity

- ABA card p30
- RSID semen test

Sliny

- 99% voda
 - mucin
 - α amyláza rozkládá škrob na maltózu a dextriny
 - buňky bukální sliznice
- pH 6,8 až 7,0
- Tři páry slinných žláz
 - parotidy (příušní)
 - submaxilární (podčelistní)
 - sublinguální (podjazyková)
- Dospělý vytvoří 1,5 l slin za den.

Orientační test na sliny

- Detekce slinné α amylázy (ptyalinu) Lugolovým roztokem
 - provedení: ke škrobu přidáme vzorek skvrny, pak jód
 - škrob modro-černě reaguje s jódem
 - škrob zůstává žlutohnědý, pokud je rozložen amylázou.
- DNA test.

Zkoumání slin a potu

- Vylučovatelství
 - nejen do krve krevně skupinové znaky
 - 80% (85%) populace
- Srovnávací vzorek
 - získat nasliněním cigaretového papírku.

Zkoumání moči

- Pokud krev a hnis, dá se použít sérologie
- Význam toxikologický
- (DNA).

Zkoumání kostí (antropologie)

- Člověk nebo zvíře
- Jedna osoba nebo více
- Bylo s pozůstatky manipulováno
- Muž nebo žena
- Stáří jedince v době smrti
- Doba od smrti jedince
- Příčina smrti
- Jaké choroby nebo úrazy za života
- Jaké změny po smrti
- Výška jedince
- Superprojekce lebky
- Konkrétní jedinec.

Odorologie

*„So lay Argos the house, all shivering with dog-ticks.
Yet the instant Odysseus approached, the beast
knew him".*
Homer, *The Odyssey*

„A hle!

První, kdo poznal po dvaceti letech vracejícího se pána svého do domova?

Byl to věrný pes Argos!

Lísaje se k němu stěží se připlazil a radostí zcepeněl.“

Odorologie

- Organické a anorganické látky uvolňují charakteristické molekuly nebo atomy.
- Pach je podíl odpařených nebo odsublímovaných molekul nebo atomů, které se vyskytují ve vzduchu a svým chemickým složením charakterizují objekt, ze kterého pocházejí. Je překvapivě rezistentní vůči povětrnostním vlivům a vysoké teplotě.
- Pachové stopy lze obtížně odstranit z místa činu.
- Pach věcí je oproti lidským pachům jednodušší a stálější.
- Potní žlázy jsou rozmístěny po celém těle, v podpaží a u pohlavních orgánů více.
- Části odorologie
 - olfaktorika zkoumá pach subjektivně
 - olfaktorika objektivně.

Využití pachových stop v kriminalistice

- Pach etanolu v dechu při kontrole řidičů
- Pach výbušnin
- Pach drog
- Individuální pach při pátrání po osobách.

Popisná statistika pachů

- Pachová molekula o hmotnosti 300 se při teplotě 25°C pohybuje rychlostí 320 km/h. Vydrží 30 min při 500°C.
- Člověk průměrně vypustí za 24 hodin 1,5 g pachu, což odpovídá 10^{21} molekul, tj. emituje 10^{16} molekul za sekundu. Za dlaně se emituje 10^{14} molekul za sekundu, takže odběr srovnávací pachu z dlaně po umytí rukou bude možná budoucí standard.
- Jiný pes vyčichává jinou frakci pachu

Vyhledání a zajištění pachových stop

- Neviditelné.
- Člověk cítí jen silné pachy těkavých tekutin a plynů.
- Postup
 - pravděpodobná místa dotyku osoby
 - odhozené nebo ponechané věci
 - časové omezení
 - nepřidat vlastní stopu
 - nepřenést stopu (nepravý, spojovací pach).

Vyhledávání stop

- Sterilní nástroje, rukavice bez zápachu, do skleněných těsnících nádob.
- Stopa - zdroj pachu
 - oděv, aktovky, nástroje, zbraně, klíky, volant
 - vlasy, odloupaná pokožka
 - zjištěno trasologicky
- Vlastní stopa
 - spolu se stopou daktyloskopickou, biologickou, trasologickou
 - zajištění pachové stopy má přednost (čas).

Lidský metabolismus

- Vznik odpadních produktů, kterých se tělo zbavuje močí, lejnem, vydechovaných vzduchem, zvracením, potem.
- Člověk je nositelem individuálního pachu, který je stálým projevem jeho životních funkcí
- Zatím není prokázáno, které všechny složky lidského pachu jsou geneticky podmíněné, individuální (neměnné v průběhu života).

Složení lidského pachu

- Dáno
 - Geneticky
 - Věkem
 - Pohlavím
 - Stravou
 - Nemocí
 - Druhem fyzických aktivit
 - Léky
 - Pracovištěm
 - Požíváním tabáku, alkoholu, drog
 - Používáním kosmetiky
 - Psychickým stavem
 - Menstruací, těhotenstvím, šestineděním, menopauzou
- Několik tisíc látek.

Složení lidského pachu

- Dáno
 - Geneticky – primární pach
 - Věkem
 - Pohlavím
 - Stravou
 - Nemocí
 - Druhem fyzických aktivit
 - Léky
 - Pracovištěm
 - Požíváním tabáku, alkoholu, drog
 - Používáním kosmetiky
 - Psychickým stavem
 - Menstruací, těhotenstvím, šestineděním, menopauzou
- Několik tisíc látek.

Látky v pachu

- Estery vyšších mastných kyselin, tuky, alkoholy, organické kyseliny, hydroxykyseliny, aminokyseliny, alkane, alkeny, ketony, aldehydy...
- Bakteriálním a kvasinkovým rozkladem vzniká např. kyselina máselná a valerová

Snímání otisku pachové stopy (OPS)

- Snímáme na místě, nepřenášíme.
 - Kapalné emulze nebo alkoholové roztoky.
 - Pomocí pumpičky prosajeme vzduch trubičkou s absorpčním materiálem (molekulární síto, aktivní uhlí, tenká kovová fólie).
 - Přiložíme speciální textilii Aratex vyčesanou stranou, překryjeme alobalem, zatížíme (>30 min), sterilními pinzetami vložíme do skleněné pachové konzervy.
- Modrým štítkem a popisem označíme hermetický obal (stabilita 1 rok).
- Sterilizujeme pomocí UV, skladujeme chlazené.
- Zašleme v určeném kufru ke zkoumání.
- Osoby přítomné při snímání OPS nesmí být přítomny při následných úkonech.

Komplikace

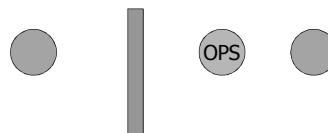
- Snesení
 - Průjezdem motorových vozidel
- Nevhodné místo
 - Jílovité bláto, proudící voda
- Destrukce místa
 - Požár, výbuch
- Ohrožení čichu psa
 - Políť místa čpavkem
- Vlhko
 - Aratex zvlhne, konzerva degraduje

Odebrání srovnávací pachové konzervy (SPK), pach vyzvané osoby (PVO)

- Podrobit se úkonu je povinen každý (po výzvě a poučení, se souhlasem státního zástupce i fyzické překonání odporu)
- Proškolený policista stejného pohlaví jako porovnávaná osoba
- Ne ve věznici (pachové pozadí, přenosové pachy)
- Na každou osobu jeden policista
- Aratex pinzetou zboku na holé tělo ve výši pasu, 20 minut působit (ne do podpaží – pot v konzervě degraduje a znehodnotí stopu).
- S časovým odstupem po odběru OPS (vyvětrají se sekundární pachy)
- Označení štítkem červené barvy.

Olfaktorická komparace

- Metoda pachové identifikace (MPI) ve srovnávacích kójiích
- Před MPI se 24 hodin pach stabilizuje v konzervě
- Napřed kontrola náhodné zajímavosti OPS



Psovod nesmí znát správnou odpověď

- 1) SPK (circle) OPS (circle)
- 2) SPK (circle) OPS (circle)
- 3) SPK (circle)
- 4) SPK (circle) OPS (circle)

Práce psa

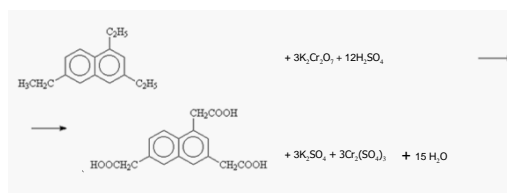
- Subjektivní.
- Služební kynologie.
- Sleduje čerstvou pachovou stopu.
- Srovnává stopy, vyštěkáním nebo zalehnutím (podle výcviku) označí shodu.
- Intenzivní pach (benzinové čerpadlo, lakovna, masna) – přidá se do srovnávací řady vzorek pachového pořadí
- Africké nebo asijské etnikum – přidá se vzorek stejného etnika
- Profesionální hodnotitel parfémů, degustátor.
- Olfaktronická přístrojová technika zatím nevalidovaná.

Detekční přístroje

- Plynová chromatografie
- Páry lihu v dechu pomocí trubičky
 - žlutá barva na zelenou
 - reaguje s redukcujícími látkami (aceton, metanol, aldehydy).

Chemicky

- Analýza sazí z těžkých olejů
- Dvochroman draselný reaguje s 1,3,6-**triethylnaftalenem** v prostředí kyseliny sírové za vzniku naftalen-1,3,6-trioctanu draselného a síranů draselného a chromitého



Možnosti využití chemických senzorů

- CO, SO₂, H₂S, HCN, CS₂, uhlovodíky, bojové látky
- Kontrola těsnosti potrubí
- Přípustné koncentrace ve vzduchu
- Plynová chromatografie pro výbušniny a drogy (jednoúčelové; optický nebo akustický signál při nález; citlivost 10⁻¹⁵ g).

Děkuji vám za pozornost!