Validacija preliminarnog testa na krv

Belobrajdić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department for Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:505772

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU

SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department for Forensic Sciences

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

VALIDACIJA PRELIMINARNOG TESTA NA KRV

MIA BELOBRAJDIĆ

Split, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

VALIDACIJA PRELIMINARNOG TESTA NA KRV

Mentor: Prof. dr. sc. Damir Marjanović

Komentor: Josip Crnjac, prof. biol.

Studentica: Mia Belobrajdić

Matični broj studenta: 476/2019

Split, rujan 2021.

Rad je izrađen u Laboratoriju za forenzičnu genetiku i biologiju

pod nadzorom Josipa Crnjca, prof. biol.

u vremenskom razdoblju od 1. travnja 2021. do 1. rujna 2021.

Datum predaje diplomskog rada: 13. rujan 2021.

Datum prihvaćanja rada: 15. rujan 2021.

Datum usmenog polaganja: 22. rujan 2021.

Ispitno Povjerenstvo:

1. Dr. sc. Ivan Jerković
2. Doc. dr. sc. Snježana Štambuk
3. Prof. dr. sc. Josip Kasum

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Forenzička serologija 2
1.2. Identifikacija krvi 3
1.3. Preliminarni testovi na krv 4
1.3.1. Kolorimetrijski testovi 4
1.3.1.1. Benzidinski test (Adlerov test) 5
1.3.1.2. Fenolftaleinski test (Kastle – Mayerov test) 5
1.3.1.3. O – tolidinski test 5
1.3.1.4. Leucomalachite Green test 5
1.3.1.5. Tetrametilbenzidinski test 6
1.3.1.6. Hemastix® Test 6
1.3.2. Kemiluminiscencija i fluorescencija 6
1.3.2.1. Luminol 7
1.3.2.2. Fluorescein 8
1.4. Potvrdni testovi na krv 9
1.4.1. Teichmann test 9
1.4.2. Takayama test 9
1.5. Određivanje podrijetla krvi 10
1.5.1. Precipitinski test 10
1.5.2. Analiza neserumskih proteina 11
1.6. Validacija metode 13
2. CILJ RADA 16
3. MATERIJALI I METODE 17
3.1. Materijali 17
3.1.1. Uzorci korišteni u izradi rada 17
3.1.2. Laboratorijska oprema 18
3.2. Metode 19
3.2.1. Ispitivanje prikupljenih uzoraka 22
4. REZULTATI 24
5. RASPRAVA 29
6. ZAKLJUČCI 32
7. LITERATURA 33
8. SAŽETCI 35
9. ŽIVOTOPIS 37
10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI 38

1. UVOD

Forenzika je znanost koja obuhvaća široki spektar disciplina, od kojih svaka ima svoje zasebne prakse. Neke su od tih disciplina laboratorijske kao što je analiza nuklearne i mitohondrijske DNK, toksikologija i analiza droga, druge se temelje na stručnoj interpretaciji uočenih obrazaca kao što su otisci prstiju, uzorci rukopisa, tragovi alata, tragovi ugriza i dr. (1). U forenzici je važno Locardovo načelo razmjene, koje se definira kao načelo prema kojemu prilikom kontakta dvaju objekata dolazi do međusobne razmjene tvari, energije ili oboje. Načelo glasi „Svaki dodir ostavlja trag“ (2).

Na mjestu počinjenog kaznenog djela pronalaze se različiti tragovi koji se dokumentiraju, prikupljaju i čuvaju za naknadnu analizu u laboratoriju (1). Tragovi tjelesnih tekućina jedna su od najvažnijih vrsta dokaza forenzičnim istražiteljima. Oni sadrže dragocjene DNK dokaze koji mogu identificirati osumnjičenika ili žrtvu, kao i osloboditi nevinu osobu. Svaka tjelesna tekućina ima jedinstveni sastav, a prisutnost specifičnih komponenata u jednoj tekućini u odnosu na drugu osnova je njezine identifikacije (3). Lociranje i prepoznavanje tjelesnih tekućina puno je teže nego što se to pretpostavlja. Čak i kada se identitet traga može činiti očitim, nužna je apsolutna potvrda kako bi se dokazi mogli koristiti na sudu za dokazivanje ili osporavanje činjenica. Krv nije uvijek crvena, neke crvene tvari nisu krv, a biološki tragovi kao što su slina ili sjemena tekućina nisu lako vidljivi. Istražitelji mjesta događaja za pronalazak bioloških tragova koriste različite testove koji utvrđuju prisutnost određenog biološkog traga. Postoje mnogi preliminarni i potvrdni testovi za identifikaciju tjelesnih tekućina. Najčešće se za otkrivanje krvi koriste preliminarni kolorimetrijski testovi koji mijenjaju boju. Za latentne (nevidljive) tragove krvi može se koristiti i alternativni izvor svjetlosti na 415 nm, valnoj duljini pod kojom tragovi krvi apsorbiraju svjetlost i tako postaju vidljivi golim okom. Danas su dostupni i imunološki testovi koji mogu identificirati humani hemoglobin i glikoforin A, specifične proteine za krv za koje se može dokazati da su ljudskog podrijetla (1).

1.1. Forenzička serologija

Forenzička serologija jedna je od važnih sastavnica forenzične znanosti. Glavna aktivnost forenzičkih serologa je identifikacija tjelesnih tekućina. Ova se znanstvena disciplina fokusira na utvrđivanje jesu li krv, sjemena tekućina, slina ili druge tjelesne tekućine prisutne u ispitivanom uzorku, odnosno pronađenom tragu. Pronađeni tragovi tjelesnih tekućina obično upućuju na nasilne kaznene predmete. Identifikacija tragova krvi često je potrebna za istraživanje slučajeva ubojstava, teških napada, seksualnih napada i provala. Dokaz o prisutnosti krvi može potvrditi sumnju na navodna nasilna djela. Identifikacija sperme i sline posebno je važna za istragu slučajeva seksualnog napada. Prisutnost tragova sjemene tekućine osumnjičenog na odjeći žrtve mogu potvrditi navodnu seksualnu aktivnost. Forenzička serologija smatra se postupkom ispitivanja i identificiranja bioloških dokaza, koji se odvija prije individualizacije bioloških dokaza. Individualizacija bioloških dokaza koristi se da bi se utvrdilo potječe li uzorak tjelesne tekućine od određene osobe ili ne (4).

Forenzička serologija ne analizira samo različite tjelesne tekućine kao što su krv, slina, sperma i mokraća, već češće analizira uzorke u obliku mrlja, koji su često razgrađeni ili u procesu propadanja, što zapravo otežava uspješnu analizu. Količina i kvaliteta uzorka u obliku mrlje ovise o brojnim čimbenicima, od kojih mnogi nisu pod kontrolom analitičara. Uz to količina i kvaliteta uzorka određuju način i metodu koju analitičar može primijeniti u radu s određenim tragovima te može li se provesti bilo kakva analiza. Zahtjevi pravnog sustava moraju se poštivati kako bi se zaštitila sigurnost dokaza i time omogućilo njegovo korištenje na sudu. Integritet dokaza može se lako ugroziti ako se dozvoli da se dokaz razgradi tijekom skladištenja u neprikladnim uvjetima ili ako se ne održava nadzor nad njim. S biokemijskog gledišta, nekontrolirano izlaganje dokaza visokoj temperaturi i vlažnosti može uništiti informacije sadržane u mrlji i potaknuti razgradnju kemijskih tvari koje su važne za analitičare (5).

Iako se vizualna identifikacija mrlje kao krvi čini dovoljnom da opravda daljnju analizu materijala, odgovarajuće znanstvene metode i zakonski zahtjevi nalažu da se takva identifikacija mora uspostaviti sa znanstvenom sigurnošću prije nego što se može izvesti na sudu. Znanstveni pristup u obradi traga zahtijeva upotrebu rutinskog protokola koji uključuje logičan niz postupaka kako bi se osigurala osnova za takvu identifikaciju. Korištenje protokola namijenjeno je sprječavanju nenamjernog uklanjanja koraka u procesu i osiguravanju sličnog postupanja sa svim dokaznim predmetima koji se razmatraju. Primjena

protokola ili njegove varijacije može se primijeniti na bilo koju tjelesnu tekućinu koja se najčešće susreće u forenzičkoj serologiji (5).

Identifikacija tjelesne tekućine može se vršiti uz pomoć preliminarnih i potvrdnih testova kako bi se provjerilo je li uzorak određena tjelesna tekućina. Prednost preliminarnih testova je u tome što su ti testovi osjetljivi, brzi i jednostavni. Pozitivna reakcija preliminarnog ispitivanja ukazuje na moguću prisutnost određene tjelesne tekućine. Međutim, preliminarni testovi nisu vrlo specifični i stoga ih se ne bi trebalo smatrati presudnim za prisutnost neke tjelesne tekućine. Nakon ispitivanja traga preliminarnim testom potrebno je provesti ispitivanje potvrdnim testom, a to je test koji je specifičan za određenu tjelesnu tekućinu. Potvrdni testovi koriste se za utvrđivanje tjelesnih tekućina s većom sigurnošću od preliminarnih, ali oduzimaju više vremena (6).

1.2. Identifikacija krvi

Količina krvi normalnog čovjeka iznosi približno 8% ukupne tjelesne težine. Tekući dio krvi naziva se plazma. Stanični dio krvi, koji je suspendiran u plazmi, sastoji se od eritrocita (crvene krvne stanice), leukocita (bijele krvne stanice) i trombocita (krvne pločice) (7). Većina preliminarnih i potvrdnih testova koji se koriste za identifikaciju tragova krvi temelje se na otkrivanju hemoglobina. Hemoglobin je protein odgovoran za transport kisika u krvi preko eritrocita. Većina odraslog humanog hemoglobina sastoji se od četiri podjedinice, dvije α i dvije β podjedinice. Svaka podjedinica hemoglobina sadrži molekulu hema. Hem se sastoji od složenog organskog prstena koji se zove protoporfirin, na koji je vezan ion željeza Fe^{2+} (4). Krv je najčešća tjelesna tekućina koju pronalazimo na mjestu počinjenog kaznenog djela (3).

Protokol za identifikaciju tragova krvi obuhvaća nekoliko koraka:

1. Pažljivo pregledati dokazni predmet kako bi se pronašle mrlje ili materijali koji su vidljivo karakteristični za krv
2. Primijeniti odgovarajući preliminarni test
3. Primijeniti specifični i osjetljivi test za potvrđivanje prisutnosti krvi
4. Utvrditi vrsno (životinjsko ili ljudsko) podrijetlo
5. Karakterizacija krvi uporabom jednog ili više genetskih markera ili DNK (5).

U identifikaciji krvi korištenjem prethodno opisanog protokola često se koristi preliminarni test nakon kojega slijedi potvrdni test da bi se jasno utvrdila identifikacija. Kada je preliminarni test pozitivan on ukazuje analitičaru da je krv prisutna u ispitivanom uzorku i tada su dalje potrebni potvrdni testovi kako bi se znanstveno dokazalo da je to krv. Ako je negativan, test pomaže u eliminaciji mrlja koje ne trebaju biti dodatno razmatrane (5).

1.3. Preliminarni testovi na krv

Preliminarni testovi su oni koji se na početku biološkog vještačenja koriste za identifikaciju tjelesnih tekućina (8). Ovi testovi proizvode vidljivu reakciju u obliku promjene boje ili rezultiraju oslobađanjem svjetlosti. Obje se vrste oslanjaju na katalitička svojstva krvi da potaknu reakciju (5). Preliminarni testovi temelje se na različitim reakcijama, a to su kemijske, fizikalne ili enzimske reakcije. Najčešće se upotrebljavaju tijekom dinamičkog dijela očevida kada se utvrđuje postojanje relevantnog traga. Imaju veliku važnost za forenzičare jer im služe kao orijentacijska proba, a istražitelje usmjeravaju u daljnjoj istrazi (9).

1.3.1. Kolorimetrijski testovi

U identifikaciji krvi kolorimetrijski testovi temelje se na kemijskoj oksidaciji kromogene tvari oksidacijskim sredstvom koju katalizira prisutnost krvi ili preciznije hemoglobina. Ovi testovi dovode do promjene boje i obično se provode tako da se prvo nanese otopina kromogena na uzorak sumnjivog materijala nakon čega slijedi dodavanje oksidirajućeg agensa, najčešće 3% otopina vodikovog peroksida (5). Katalizator je zapravo peroksidazna aktivnost hem grupe u hemoglobinu. Boja karakteristična za korišteni kromogen brzo se razvija i predstavlja pozitivan test. Važno je napomenuti da ovi testovi ukazuju, ali nisu specifični za identifikaciju krvi. Uobičajena metoda primjene preliminarnih testova uključuje uzimanje uzorka ispitivane mrlje čistim, navlaženim vatenim štapićem i dodavanje otopine reagensa u boji nakon čega slijedi slična količina vodikovog peroksida. Ovim postupkom neposredni razvoj boje karakteristične za određeni korišteni reagens ukazuje na prisutnost krvi u testiranom uzorku (10).

1.3.1.1. Benzidinski test (Adlerov test)

Benzidinski test u prošlosti se koristio intenzivnije od bilo kojeg drugog testa za preliminarnu identifikaciju krvi. Reakcija se obično izvodi u otopini etanol/octena kiselina i rezultira stvaranjem karakteristične plave boje. Benzidin je 1974. godine prepoznat kao kancerogena tvar i danas se više ne koristi u forenzičnim laboratorijima (5).

1.3.1.2. Fenolftaleinski test (Kastle – Mayerov test)

Ovaj se test često koristi u mnogim forenzičnim laboratorijima i uključuje jednostavni kiselinsko – bazni indikator fenolftalein (5). Vateni štapić navlaži se fiziološkom otopinom i protrlja po sumnjivoj mrlji (11). Test se može provoditi i da se uzorak sumnjive mrlje sastruže na filtrirani papir i doda kap etanola kako bi se poboljšala osjetljivost testa. Na štapić se nakon toga kapne fenolftalein, a zatim kap 3% vodikovog peroksida. Ako fenolftalein promijeni boju prije dodavanja vodikovog peroksida, test se smatra negativnim. Vodikov peroksid stupa u interakciju s hemom iz molekule hemoglobina i razgrađuje se na vodu i slobodne radikale kisika. Ti radikali zatim stupaju u interakciju s fenolftaleinom što rezultira promjenom boje iz bezbojne u ružičastu. Kastle - Meyerova reakcija nešto je manje osjetljiva od luminol testa i ne smije se izvoditi izravno na mrljama jer ometa naknadnu izolaciju DNK. Međutim ovaj je test brz, jednostavan i jeftin, a promjena boje odmah je vidljiva. Pozitivan rezultat minutu ili više nakon provedenog testa obično se ne smatra pouzdanim (12).

1.3.1.3. O – tolidinski test

Ortho – tolidine je 3,3' – dimetil derivat benzidina. Reakcija se provodi u kiselim uvjetima i stvara pojavu plave boje kad se ispituje krv. U prošlosti je o-tolidin bio aktivni sastojak Hemastix[7] Test (Miles Laboratories,1981) dijagnostičkog testa koji se koristio u medicinskom kontekstu za otkrivanje krvi u mokraći. Tijekom 1980-ih zanimanje za test u forenzičnom radu nastavilo se razvijati, ali je kancerogenost o-tolidina na kraju rezultirala njegovom zamjenom tetrametilbenzidinom (5).

1.3.1.4. Leucomalachite Green test

Kako navodi Spalding (5) nakon benzidina drugi spoj koji je istraživao Adler bio je reducirani odnosno bezbojni (leuco) oblik malahitno zelene boje (engl. Leucomalachite Green – LMG). Reakcija oksidacije LMG-a koju katalizira hem iz hemoglobina daje zelenu boju. Reakcija se provodi u kiselom mediju s vodikovim peroksidom kao oksidirajući agens. Pozitivan rezultat ovog testa je promjena boje iz bezbojne u zelenu (5).

1.3.1.5. Tetrametilbenzidinski test

Prepoznavanje benzidina kao kancerogene tvari dovelo je do traganja za zamjenskim tvarima koje bi se mogle koristiti kao reagensi. Brojni laboratoriji koristili su fenolftalein kao primarni preliminarni reagens, ali se pokazala zainteresiranost i za tetrametilbenzidin (TMB). TMB je 3,3',5,5' tetrametil derivat benzidina. Prema istraživanju Hollanda, a kako navodi Spalding (5) otkriveno je da je 3,3' dihidroksibenzidin, metabolit benzidina, jači karcinogen od samog benzidina. Također je primijetio i da je metilirani benzidin dao zanemariv prinos tumora na štakorima u usporedbi s benzidinom i o-tolidinom. Reakcija s TMB-om također se provodi u kiselom mediju, a pozitivan rezultat je promjena boje od zelene do plavo-zelene (5).

1.3.1.6. Hemastix® Test

Sam test sastoji se od plastične trake koja na jednom kraju sadrži komadić filter papira koji je tretiran reagensom. Filter papir sadrži TMB, diisopropilbenzen dihidroperoksid, puferske materijale i nereaktante. Ispitivanje mrlje na krv vrši se tako da se vateni štapić navlaži destiliranom vodom, protrlja po mrlji i zatim prebriše po filter papiru s reagensom na plastičnoj traci. Filtrirani je papir s reagensom izvorno žute boje, a trenutna promjena boje u zelenu ili plavo – zelenu označava prisutnost krvi (5).

1.3.2. Kemiluminiscencija i fluorescencija

Često se prisutnost krvi na nekom mjestu procjenjuje na temelju informacija svjedoka ili se očekuje na određenim mjestima. Ako se radi o tragovima krvi koji su očišćeni raznim sredstvima vrlo se malo može vidjeti pod normalnim osvjetljenjem. U takvim situacijama koristi se test luminolom ili fluoresceinom. Oni su također preliminarni testovi koji ukazuju na, ali ne identificiraju krv. Test se sastoji od prskanja kemijske smjese na sumnjivo područje i promatranje rezultata. Ovaj se test izvodi u tami ili pri smanjenoj svjetlosti uz pomoć alternativnog izvora svjetlosti (engl. Alternative Light Source - ALS). Rezultat je stvaranje svjetlosti koja promatraču omogućuje određivanje granica, oblika i detalja izvornog područja krvne mrlje. Prisutnost krvi te obrasci koji prikazuju tragove krvi mogu pružiti vrijedne informacije i stoga treba biti oprezan u njihovoj vizualizaciji. Ako se trag krvi može vidjeti i prikupiti ovi se testovi ne bi trebali koristiti zbog toga što su potencijalni izvori onečišćenja krvi. Ovi testovi imaju veću vrijednost u pronalaženju i definiranju tragova krvi nego u identifikaciji, naročito za stare i latentne odnosno nevidljive tragove (5). Pozitivna reakcija ne

samo da pronalazi krv, već otkriva i uzorke, poput otisaka stopala, otisaka prstiju i obrasce prskanja (4).

Luminol i fluorescein klasificirani su kao iritansi, ali nisu kancerogeni. Luminol i fluorescein proizvode svjetlost, ali na različite načine. Potrebno je razlikovati kemiluminiscenciju od fluorescencije. Kemiluminiscencija je postupak kojim se svjetlost emitira kao produkt kemijske reakcije i za reakciju nije potrebno dodatno svjetlo, a to svojstvo ima Luminol. Fluorescencija se javlja kada je kemijska tvar izložena određenoj valnoj duljini svjetlosti, obično kratke valne duljine, a svjetlosna energija emitira se na dužim valnim duljinama. Svjetlost koju stvara fluorescein obično se provodi ultraljubičastim svjetlom u rasponu od 425 do 485 nanometara (5).

1.3.2.1. Luminol

Luminol se prvi put koristio za otkrivanje tragova krvi 1937. godine i ostao je jedan od najučinkovitijih preliminarnih testova. Za razliku od Kastle - Meyerova testa, luminol se može prskati izravno na sumnjive mrlje jer ne ometa naknadnu analizu DNA. Test se izvodi tako da se luminol pomiješa s natrijevim karbonatom kako bi se stvorila alkalna otopina, dok se zasebno priprema otopina ili natrijevog perborata ili vodikovog peroksida koji djeluju kao oksidans. Neposredno prije same upotrebe testa ove se dvije otopine pomiješaju i raspršuju na sumnjive mrlje. Ako je prisutan hemoglobin, oksidans se razgrađuje i stvaraju se visoko reaktivni slobodni radikali kisika koji dovode do pretvorbe luminola u 3 - aminoftalat u kemiluminescentnoj reakciji koja se očituje kao plavi sjaj koji se najbolje vidi pri slabom svjetlu (12).

Obrisi i detalji često su vidljivi i do 30 sekundi prije nego što je potrebno dodatno prskanje. Najveća prednost luminola je njegova osjetljivost. Luminol može detektirati hematin iz hemoglobina u razrjeđenjima do 1 u 10 000 000. Luminol je više nego sposoban otkriti krv prisutnu u količinama koje se ne mogu vidjeti golim okom. Zbog njegove prolazne prirode važno je zabilježiti reakciju fotografijom. Pretjerano nanošenje luminola na podlogu može dovesti do razrjeđenja ili uništenja traga (5). Razrjeđivanje traga može ga učiniti neupotrebljivim za DNK analizu (13).

1.3.2.2. Fluorescein

Korištenje fluoresceina za otkrivanje tragova krvi prepoznao je Fleig već 1910. godine. Ako se trag krvi na mjestu događaja može vidjeti i prikupiti bez pomoći fluoresceina, tada je njegova upotreba nepotrebna. S druge strane, ako je svrha definirati i/ili poboljšati obrise koji nisu vidljivi, a za koje se smatra da su prisutni, tada se svaki vidljivi trag krvi može prekriti kako bi se zaštitio od kemijske kontaminacije prije nego što se područje ispita. Fluorescein se reducira u alkalnoj otopini preko cinka do fluorescina koji se zatim nanosi na sumnjivo područje. Katalitička aktivnost hem skupine pomoću vodikovog peroksida ubrzava oksidaciju fluorescina u fluorescein, koji zatim fluorescira svjetlo žutom bojom kada se tretira ultraljubičastom svjetlošću. Fluorescein je učinkovitiji na vertikalnim površinama. Jednom kad se smjesa raspršri, za vizualizaciju fluorescencije potrebna je upotreba alternativnog izvora svjetlosti koji je obično postavljen na 450 nanometara (5).

Gore opisani testovi vrlo su osjetljivi, ali nisu specifični za krv i mogu dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Lažno pozitivnu reakciju može uzrokovati prisutnost kemikalija koje su jaki oksidansi kao što su neke metalne soli čak i ako nema hema. Biljne peroksidaze također mogu katalizirati reakciju oksidacije u odsutnosti hema. Biljke koje sadrže peroksidazu, kao što je hren mogu prouzročiti lažno pozitivan rezultat (4). Povrće koje se najčešće uz hren spominje u literaturi, a izazivaju lažno pozitivne rezultate su krumpir i crveni luk te anorganske tvari kao što je željezni sulfat. Uz to, kako bi se osiguralo da test djeluje, uvijek treba provesti negativnu kontrolu (npr. destiliranom vodom) i pozitivnu kontrolu (npr. osušena životinjska krv) neposredno prije procjene nepoznate mrlje (12). Važno je naglasiti da ako je količina traga mala, čitava se mrlja dostavlja u laboratorij bez izvođenja preliminarnih testova (11).

1.4. Potvrdni testovi na krv

Potvrdni testovi su testovi koji točno potvrđuju tip tjelesne tekućine koja je izolirana iz biološkog traga i imaju visoku stopu pouzdanosti (8). Ovi testovi još se nazivaju i testovi mikrokristala gdje se uzorci kemijski tretiraju kako bi se nativni hem pretvorio u derivate hema. Derivati hema tvore kristale koji imaju prepoznatljivu morfologiju koja se ispituje mikroskopskim promatranjem. Prisutnost kristala derivata hema potvrđuje prisutnost krvi. Najčešći mikrokristalni testovi koji se koriste su Teichmann i Takayama test (4).

1.4.1. Teichmann test

Ovaj test prvi je opisao Teichmann 1853. godine. Test se sastoji od zagrijavanja osušene krvi uz prisutnost ledene octene kiseline i halida (najčešće kloridi) kako bi se dobio derivat hematina. Reakcijom nastaju kristali koji su rombičnog oblika i smećkaste boje te se promatraju mikroskopski. Starost traga neće utjecati na rezultate testa ukoliko ga provodi iskusni analitičar. Kristali se formiraju tako da se uzorak za koji se smatra da je krv stavi na stakalce, doda se mala količina ledene octene kiseline koja sadrži klorid i zagrijava. Najveća poteškoća u izvođenju ovog testa je kontrola nad zagrijavanjem preparata. Ako se preprat pregrije ili nedovoljno zagrije neće se stvoriti kristali (5).

1.4.2. Takayama test

Ovim testom kada se hem lagano zagrijava s piridinom u alkalnim uvjetima uz prisutnost reducirajućeg šećera kao što je glukoza, nastaju ružičasti kristali piridin feroprotoporfirina ili hemokromogena. Ovu je reakciju ispitivao Takayama koji je testirao nekoliko smjesa i otkrio smjesu reagensa koji će dati najbolje rezultate. Taj reagens sadrži vodu, zasićenu otopinu glukoze, natrijev hidroksid (10%) i piridin u volumnom omjeru 2:1:1:1. Uobičajeni postupak je staviti mali uzorak mrlje za koju se smatra da je krv ispod pokrovnog stakalca i pustiti da reagens procuri ispod i natopi uzorak. Nakon kratkog zagrijavanja, kristali se promatraju mikroskopski. Ovaj je test učinkovit na mrljama koje su ostarjele te je dao pozitivne rezultate na mrljama krvi koje nisu ispale pozitivne sa Teichmannovim testom (5).

1.5. Određivanje podrijetla krvi

Kada se sumnjiva mrlja identificira kao krv, utvrđivanje podrijetla mrlje od krvi presudno je u forenzičnom radu. Uzorak krvi testira se kako bi se utvrdilo je li ljudskog podrijetla. Takvi testovi identifikacije vrsta mogu biti korisni kao metoda probira za isključivanje krvnih mrlja koje nisu ljudske i nisu povezane s istragom. Ako mrlja od krvi nije ljudska, nije potrebno dalje analizirati mrlju (4). Ponekad je važno posebno tražiti životinjsku krv kao što je to prilikom istrage zločina kada je kućni ljubimac ozlijeđen ili ubijen tijekom provale ili ubojstva (12).

1.5.1. Precipitinski test

Da bi se utvrdilo potječe li krv od čovjeka ili životinje, obično se provodi precipitinski test koji je prikazan na slici 1. Ovaj se test može provoditi na gelu ili u otopini. Precipitinski test temelji se na reakciji antigena u uzorku krvi s antihumanim antitijelima koji su komercijalno dostupni ili se uzgajaju u zečevima. Uzorci krvi i antiserumi (antihumana antitijela) stavljaju se u jažice u agar gelu koji se raširi preko staklene posude. Uzorci se kroz agar difuzijom pomiču jedan prema drugom i postupak se može ubrzati pomoću električne struje. Ako se na mjestu gdje se dva uzorka dodiruju stvori bijela crta, koja se naziva precipitinska linija, to ukazuje na interakciju između antigena u krvi i antitijela u antiserumima. Pojava precipitinske linije potvrđuje da se radi o ljudskoj krvi (12).



Slika 1. Prikaz precipitinskog testa

(Izvor: Crnjac J. (2020) Testiranje bioloških tragova (Powerpoint prezentacija s predavanja Forenzične biologije u ak. god. 2019/2020 na Sveučilištu u Splitu). Split: Sveučilišni odjel za forenzične znanosti.)

1.5.2. Analiza neserumskih proteina

Danas postoje imunološki testovi koji koriste antitijela antihumanog hemoglobina kako bi se otkrila prisutnost humanog hemoglobina. Prednost tih testova u usporedbi s kolorimetrijskim testovima je što ne daju lažno pozitivne rezultate zbog prisutnosti drugih peroksidaza. Ovi su testovi specifični za primate, a to može biti važno kada se radi o zločinu u kućnim uvjetima gdje može biti i krvi koja nije ljudska s obzirom na to da danas veliki broj stanovništva ima kućne ljubimce koji se također mogu lako ozlijediti. Jedan od takvih testova je Hexagon OBTI čiju su validacijsku studiju za forenzičnu uporabu prvi puta proveli Hochmeister i suradnici (14). Utvrdili su da je test u jednom koraku prikladan za laboratorijsku i terensku upotrebu (5).

Test Hexagon OBTI koristi mobilna monoklonska antitijela antihumanog hemoglobina koja su označena s česticama plave boje i mogu vezati hemoglobin. Dodavanjem uzorka koji sadrži humani hemoglobin stvara se imunokompleks između humanog hemoglobina i označenih antitijela. Ovaj imunokompleks migrira na membrani test uređaja u reakcijsku zonu, gdje borave imobilizirana poliklonska antitijela antihumanog hemoglobina. Oni se vežu za prethodno formirani imunokompleks stvarajući sendvič-kompleks antitijelo-antigen-antitijelo. Taj sendvič-kompleks antitijelo-antigen-antitijelo koncentrira čestice boje i rezultira stvaranjem plave linije (14). Nevezana mobilna monoklonska antitijela antihumanog hemoglobina migriraju na membrani u kontrolnu zonu gdje borave imobilizirana anti-Ig antitijela. Vezanjem nastaje kompleks koji koncentrira čestice boje, što također rezultira stvaranjem plave linije. Test se smatra valjanim kada se uoči jedna plava linija u kontrolnoj zoni. S pozitivnim rezultatom testa pojavit će se dvije plave linije, a s negativnim rezultatom bit će vidljiva samo jedna plava linija u kontrolnoj zoni (15).

Hexagon OBTI komplet sadrži dva djela – testnu traku i bočicu s puferom koja unutar poklopca ima aplikator za uzimanje uzorka. S aplikatorom se postruže mrlja krvi i vrati u bočicu s puferom te promućka nekoliko sekundi. Dvije kapljice nastale smjese nanesu se na test traku i pričeka nekoliko minuta. Kako je gore navedeno, jedna plava linija označava da ispitna smjesa radi ispravno, ali nije pronađena ljudska krv. Dvije plave linije ukazuju na to da je test utvrdio da je uzorak krvi ljudskog podrijetla (14). Hexagon OBTI komplet i pozitivna reakcija na ljudsku krv prikazani su na slici 2.



Slika 2. Hexagon OBTI komplet i prikaz pozitivne reakcije na ljudsku krv
(Izvor:https://www.sirchie.com/hexagon-obti-24-tests.html#.YOYorpgza00)

Drugi kromatografski imunološki test za otkrivanje hemoglobina koji se koristi u identifikaciji ljudske krvi je SERATEC HemDirect. Ovaj test djeluje tako da hemoglobin reagira s monoklonskim mišjim antitijelom antihumanog hemoglobina pri čemu se formira kompleks antigen-antitijelo u podlozi od vlakana nakon što se doda uzorak. Kroz kapilarni učinak u membrani, kompleks se pomiče prema testnom i kontrolnom području. Drugo monoklonsko mišje antitijelo antihumanog hemoglobina imobilizirano je na membrani u testnom području. Kada uzorak koji sadrži humani hemoglobin prođe kroz testno područje, kompleks antigen-antitijelo veže se na imobilizirano monoklonsko antitijelo stvarajući sendvič-kompleks antitijelo-antigen-antitijelo. Vezanje i stvaranje ovog kompleksa označeno je crvenom linijom u testnoj regiji. Test također ima unutarnju kontrolu koja sadrži imobilizirana poliklonska kozja antizečja antitijela na membrani u kontrolnoj liniji koja se vežu na zečja antitijela označena zlatom prisutna u podlozi od vlakana. Ovo vezivanje rezultira stvaranjem crvene linije u kontrolnom području i ukazuje na valjani test (16). Ovaj će se test validirati u ovom diplomskom radu te će detaljnije biti opisan u materijalima i metodama.

1.6. Validacija metode

Validacija je postupak ocjenjivanja značajki mjernog postupka i provjeravanje zadovoljavaju li te značajke neka prethodno postavljena mjerila (17). Ona je vrijednosna prosudba u kojoj se parametri izvedbe metode uspoređuju sa zahtjevima za analitičkim podacima. Očito je da metoda koja vrijedi u jednoj situaciji možda nije važeća u drugoj. Sukladno tome, uspostavljanje čvrstih zahtjeva za podacima preduvjet je za odabir i validaciju metode (18).

Opći koraci za postupke validacije su:

1. Odrediti analitičke parametre
2. Planirati niz pokusa koji će se provoditi
3. Provesti pokuse
4. Procijeniti dobivene podatke kako bi se utvrdile mogućnosti i ograničenja tehnike
5. Ponovno procijeniti parametre, promijeniti uvjete i po potrebi ponavljati korake 2–4 dok se ne postignu optimizirane karakteristike
6. Prikupiti dokumentaciju svih koraka i izraditi izjavu o valjanosti s detaljima o opsegu tehnike (19).

Validacija tehnike u forenzičnoj znanosti može se definirati kao postupak uspostavljanja karakteristika izvedbe (mogućnosti) tehnike, ograničenja tehnike, utvrđivanje utjecaja koji mogu promijeniti karakteristike izvedbe te opseg u kojoj mjeri ti utjecaji mijenjaju karakteristike izvedbe. Validacija osigurava pouzdanost, ali ne daje jamstvo da su u bilo kojem konkretnom slučaju dobiveni točni rezultati. Čak i nakon što se pokaže da je forenzička tehnika valjana, stvarna uporaba tehnike mora se standardizirati i razviti prihvatljivi protokoli. Validacija je dokumentirani proces koji pruža visok stupanj sigurnosti da će određena tehnika dosljedno donijeti rezultat unutar definiranih specifikacija i parametara kvalitete. Tijekom validacije forenzične tehnike, tehniku treba procijeniti testiranjem kako bi se pokazalo da se pouzdanost održava tijekom cijele analize i da karakteristike izvođenja tehnike nisu ugrožene (19).

Kriteriji za validaciju uključuju sljedeće radne značajke:

1. Točnost – koliko su eksperimentalni rezultati bliski referentnoj vrijednosti
2. Granica detekcije – najmanja količina tvari koja se može otkriti
3. Preciznost – koliko su eksperimentalni rezultati bliski (stupanj ponovljivosti tehnike pod istim uvjetima)
4. Granica kvantifikacije – najmanja količina tvari u uzorku koja se tehnikom može točno izmjeriti odnosno kvantificirati
5. Specifičnost – sposobnost tehnike da mjeri ili detektira samo ono za što je namijenjena da mjeri ili detektira
6. Raspon – interval između donje i gornje razine u kojem je tehnika pokazala da daje točne i precizne rezultate
7. Ponovljivost – sposobnost tehnike da daje rezultate koje može ponoviti drugi kvalificirani analitičar
8. Robusnost – sposobnost tehnike da ostane nepromijenjena namjernim varijacijama ostalih parametara tehnike
9. Obnovljivost – sposobnost upotrebe tehnike u različitim laboratorijima ili pod različitim okolnostima bez pojave neočekivanih razlika u rezultatima (19).

Specifični postupak validacije potreban za bilo koju određenu tehniku bit će onoliko opsežan koliko je potrebno da bi se udovoljilo potrebama područja primjene. Proces validacije mora dokazati da parametri tehnike udovoljavaju zahtjevima upotrebe. Analitičke metode u području forenzične znanosti uvelike se razlikuju i zbog toga postupak validacije za određene tehnike forenzične znanosti mora biti pažljivo prilagođen toj tehnici. U dizajniranju postupka validacije, namjeravana uporaba tehnike usmjerava koje parametre treba testirati. Značajke metode trebaju se temeljiti na njezinoj namjeni. To znači, da ako se metoda koristi za kvalitativnu analizu tragova, nema potrebe ispitivati linearnost metode za cjelokupni dinamički raspon opreme (19). U tablici 1. prikazane su značajke metode koje je potrebno odrediti za validaciju kvalitativne ili kvantitativne metode.

Tablica 1. Značajke metode koje je potrebno odrediti za validaciju kvalitativne ili kvantitativne metode

	KVALITATIVNE METODE	KVANTITATIVNE METODE
PRECIZNOST		+
SELEKTIVNOST	+	+
GRANICA DETEKCIJE	+	+
GRANICA KVANTIFIKACIJE		+
LINEARNOST		+
RASPON		+
NESIGURNOST MJERENJA	+	+
ROBUSNOST	+	+
POTVRDA IDENTITETA	+	+
TOČNOST		+
ISKORIŠTENJE		+
OSJETLJIVOST	+	

(Izvor: Božić J. Validacija analitičkih metoda [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2020. Dostupno na: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:581055)

2. CILJ RADA

Preliminarni testovi na krv osmišljeni su tako da daju pozitivne rezultate kada dođu u kontakt s krvi primata, točnije njihovim hemoglobinom. Cilj ovog rada je ispitati vjerodostojnost i visoku specifičnost rada testa SERATEC HemDirect kada je izložen punoj i razrijeđenoj krvi čovjeka i različitih životinjskih vrsta koje se mogu naći u našem okruženju, odnosno postoje li životinje čija bi krv pokazala lažno pozitivan rezultat na ovom testu.

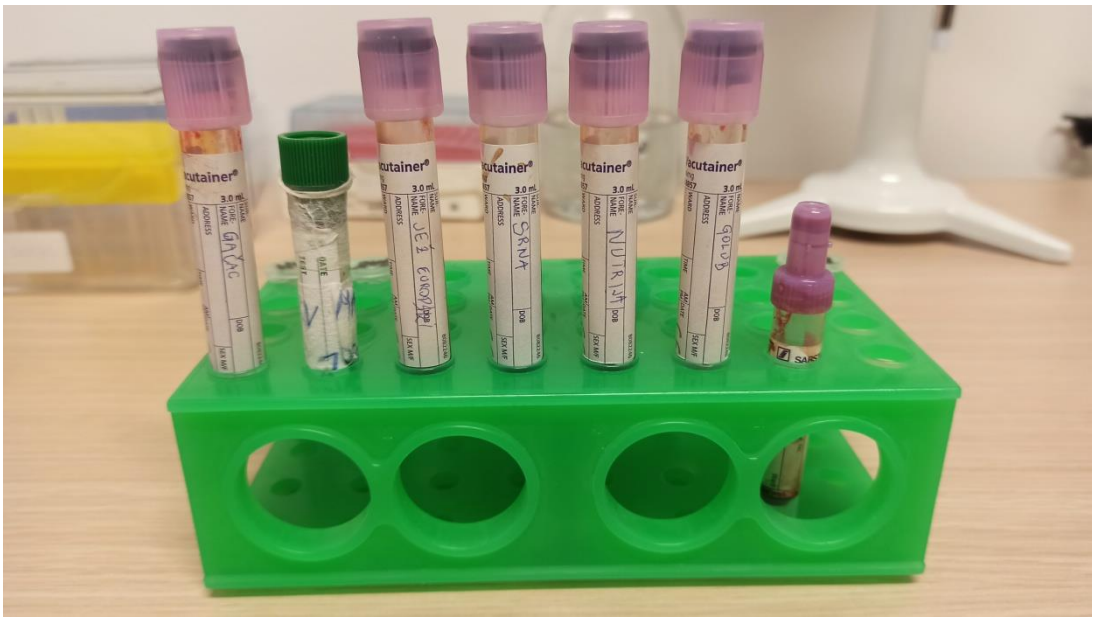
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci korišteni u izradi rada

Svi uzorci dopremljeni su u Laboratorij za forenzičnu genetiku i biologiju na Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti, Sveučilišta u Splitu. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno osam uzoraka venske krvi prikupljene u epruveti s dodanim antikoagulansom EDTA. Jedan je uzorak krvi humanog podrijetla dok je ostalih sedam uzoraka životinjskog podrijetla. Uzorak krvi humanog podrijetla izvađen je autorici ovog rada na KBC-u Split u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju. Uzorci krvi životinja prikazani na slici 3. dobiveni su iz Zoološkog vrta u Zagrebu od sljedećih vrsta: konj (*Equus caballus* L.), mačka (*Felis catus* L.), nutrija (*Myocastor coypus* Molina), gačac (*Corvus frugilegus* L.), srna (*Capreolus capreolus* L.), europski jež (*Erinaceus europaeus* L.) i golub (*Columba livia* Gmelin). Uzorcima su dodijeljeni laboratorijski brojevi i to sljedećim rasporedom:

1. Ljudska krv
2. Krv konja
3. Krv mačke
4. Krv nutrije
5. Krv gačka
6. Krv srne
7. Krv europskog ježa
8. Krv goluba



Slika 3. Uzorci krvi životinja

3.1.2. Laboratorijska oprema

U provedenom istraživanju koristila se sljedeća laboratorijska oprema:

1. Stalak za epruvete
2. Epruvete
3. Pipete različitih volumena
4. Nastavci za pipete
5. Dvostruko destilirana voda
6. Miješalica vortex
7. Pamučna bijela tkanina
8. SERATEC HemDirect test
9. Štoperica
10. Škare

3.2. Metode

Sva ispitivanja izvedena su pomoću SERATEC HemDirect testa, serije Hem kazeta 200114 i puferne serije B200114. SERATEC HemDirect je kromatografski imunološki test za brzo otkrivanje humanog hemoglobina radi identifikacije krvi u forenzičnim uzorcima. Test sadrži dva monoklonska antitijela antihumang hemoglobina kao aktivne komponente. Testovi dolaze zapakirani u kutiji u kojoj se nalazi 30 pojedinačno pakiranih HemDirecta u formatu kazete s po jednom plastičnom kapalicom i 30 bočica s 1,5 ml pufera za ekstrakciju. Sve komponente testa SERATEC HemDirect prikazane su na slikama 4A i 4B. Pufer za ekstrakciju u 1L destilirane vode sadrži 12,1g Tris; 8,8g Na_3Citrat; 0,2g NaN_3; 0,5g Tween 20; 5g BSA; pH 6,8 (20).



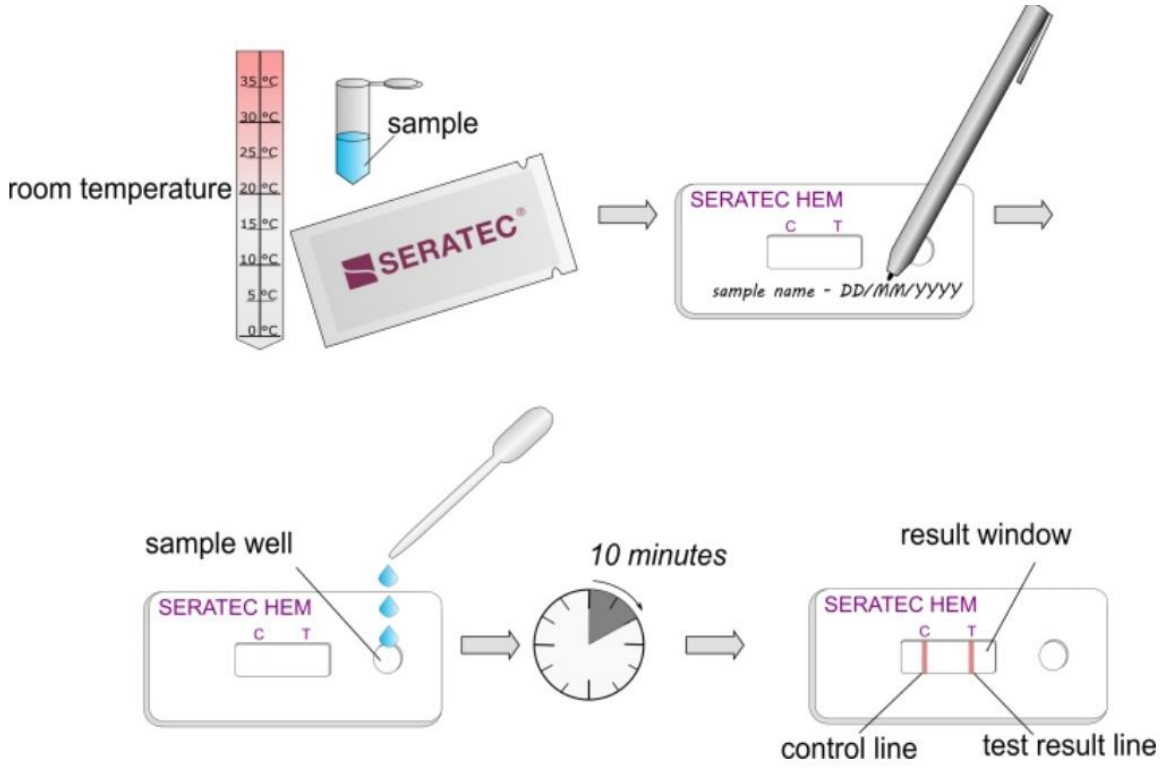
Slika 4. (A) HemDirect testne kazete i puferi (B) HemDirect kazeta i kapalica unutar pakiranja

SERATEC HemDirect može se koristiti za otkrivanje minimalne količine od 20 ng/ml humanog hemoglobina. Kod vrlo visokih koncentracija hemoglobina javlja se „high dose hook effect“ koji može uzrokovati smanjeni intenzitet linije, stoga se preporučuje uvijek razrijediti uzorke. SERATEC HemDirect ne pokazuje reaktivnost s drugim proteinima u krvi te nije primijećena reaktivnost s krvlju različitih životinjskih vrsta (pas, zec, mačka, govedo, svinja, divlja svinja, konj, kokoš, ovca, mazga, koza, crveni jelen i drugi.) Krv primata i tvora može uzrokovati pozitivni rezultat (20) zato što ljudi, neki primati i tvorovi dijele zajedničku aminokiselinsku sekvencu (TNAVAHV) u alfa lancu hemoglobina (16). Ne smiju se koristiti tekućine koje imaju pH ispod 3 ili iznad 12 jer to može uzrokovati netočne ili neispravne rezultate. Dodavanje deterdženata poput SDS-a, sarcosyla ili izbjeljivača također može

uzrokovati netočne ili nevažeće rezultate, što je vjerojatno uzrokovano denaturacijom hemoglobina. Čestice tkiva ne utječu na rezultat testa (20).

Uzorci se mogu prikupiti aplikatorom pričvršćenim na poklopac bočice s puferom ili izrezati komadić uzorka veličine između 0,25 i 1 cm^2 koji se može staviti izravno u bočicu s puferom. Preporučuje se vrijeme ekstrakcije od 10 minuta, ali treba slijediti pravilo da što je mrlja starija ili manja, duže je preporučeno vrijeme ekstrakcije. Ekstrahirani uzorci stabilni su na sobnoj temperaturi oko dva dana (16, 20).

Prije izvođenja testa sve komponente testa potrebno je staviti na sobnu temperaturu jer niska temperatura može dovesti do smanjenja osjetljivosti. Testne kazete izvade se iz pakiranja i označe radi identifikacije. Dodaje se tri kapi uzorka u jažicu za uzorak priloženom plastičnom kapalicom i započne mjerenje. Rezultati testa očitavaju se nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi. Tekućina u jažici za uzorke treba biti potpuno apsorbirana (20). Princip izvođenja testa prikazan je na slici 5.



Slika 5. Princip izvođenja testa

(Izvor: SERATEC HemDirect – Instruction for use. SERATEC Gesellschaft fur Biotechnologie mbH, Ernst-Ruhstrat-Str. 5, D-37079 Gottingen, Germany, 2019.)

Nakon 10 minuta do dvije linije mogu biti vidljive u prozoru rezultata. Linija rezultata ispitivanja (T) vidljiva je samo kada je uzorak pozitivan na hemoglobin, a intenzitet boje linije može varirati i ovisi o koncentraciji hemoglobina u uzorku. Kontrolna linija (C) je kontrola za moguće pogreške u izvođenju te integritet komponenti testa. Ova linija je uvijek vidljiva nakon uspješnog izvođenja testa (20).

Nakon izvođenja testa moguća su tri rezultata.

1. Negativni rezultat - hemoglobin se ne može otkriti (nema hemoglobina u uzorku ili je koncentracija ispod granice detekcije). Jedna vidljiva linija u prozoru rezultata: linija rezultata ispitivanja (T) nije vidljiva, dok je vidljiva kontrolna linija (C) i potvrđuje da je ispitivanje ispravno izvedeno.

2. Pozitivni rezultat - hemoglobin otkriven. Vidljive su dvije linije u prozoru rezultata: linija rezultata ispitivanja (T) i kontrolna linija (C). Svaka vidljiva T-linija jakog ili slabog intenziteta smatra se pozitivnim rezultatom.

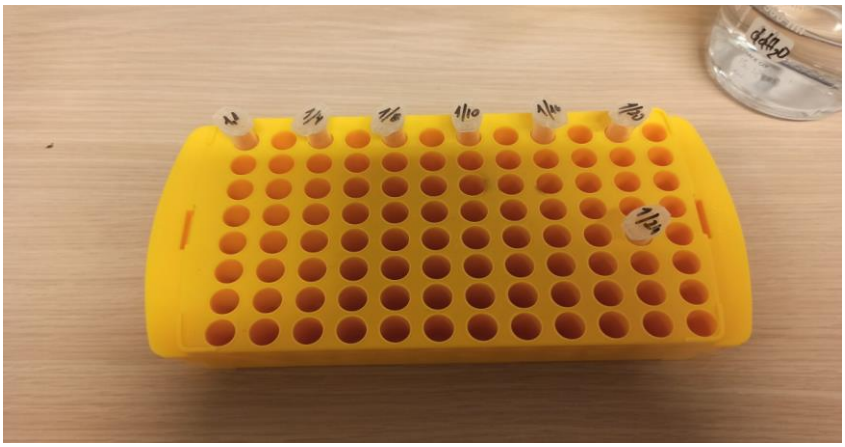
3. Nevažeći rezultat - Jedna vidljiva linija u prozoru rezultata: linija rezultata ispitivanja (T) je vidljiva, dok se kontrolna linija (C) ne vidi. U ovom slučaju test je nevažeći i treba ga ponoviti s novom ispitnom kazetom (20).

3.2.1. Ispitivanje prikupljenih uzoraka

Na sljedeće opisani način provedeno je ispitivanje svih osam prikupljenih uzoraka krvi. Od uzorka pune krvi dodavanjem dvostruko destilirane vode pripremi se serija razrjeđenja u omjeru 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24 (slike 6,7). Za uzorak ljudske krvi napravljeno je i dodatno razrjeđenje 1/40.

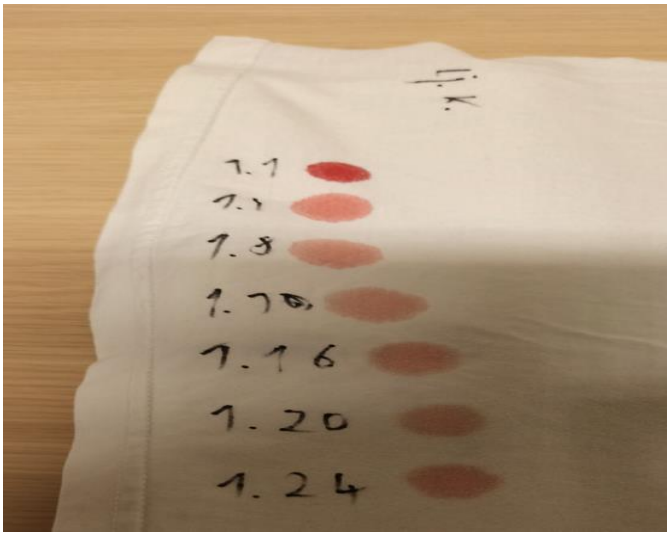


Slika 6. Pipetiranje uzorka za pripremu razrjeđenja



Slika 7. Razrjeđenja uzorka u epruvetama

Nakon pripreme razrjeđenja, uzorci se kratko izmiješaju na vortexu, a zatim se 50 µL uzorka pune krvi i svakog razrjeđenja stavlja na pamučnu bijelu tkaninu kao što je prikazano na slici 8. i ostavi da se osuši na sobnoj temperaturi.



Slika 8. Uzorci na pamučnoj tkanini

Nakon sušenja, 1/4 dijela uzorka reže se sterilnim škarama (slika 9A) počevši od dolje prema gore, odnosno od većeg razrjeđenja prema manjem te ekstrahira u HemDirect puferu 30 minuta što je prikazano na slici 9B.



.

Slika 9. (A) Izrezani uzorci (B) Ekstrakcija uzoraka u puferu

Po isteku vremena od 30 minuta tri kapi svakog uzorka dodaju se u jažicu za ispitivanje te se rezultati očitavaju i bilježe nakon 10 minuta.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju analizirana je krv čovjeka i sedam različitih životinjskih vrsta. Ukupno je provedeno 57 testiranja koja uključuju punu krv i razrjeđenja u omjeru 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24 te 1/40 samo za ljudsku krv.

Puna i razrijeđena krv čovjeka, nakon nanošenja na pamučnu bijelu tkaninu i sušenja, testirana je SERATEC HemDirect testom. Ukupno je provedeno osam testiranja ljudske krvi koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/24 i 1/40. Testovi su pokazali pozitivan rezultat za svih osam provedenih testiranja, odnosno pojavila se linija rezultata ispitivanja (T) u prozoru rezultata. Linija rezultata ispitivanja (T) u prozoru rezultata testa kod pune ljudske krvi bila je slabijeg intenziteta u odnosu na razrjeđenja, gdje je linija rezultata ispitivanja (T) bila puno jačeg intenziteta (slika 10).



Slika 10. Rezultati testiranja uzoraka ljudske krvi

Puna i razrijeđena krv konja (*Equus caballus* L.), nakon nanošenja i sušenja na pamučnoj bijeloj tkanini, testirana je SERATEC HemDirect testom. Ukupno je provedeno sedam testiranja krvi konja koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24. Testovi su pokazali negativan rezultat za svih sedam provedenih testiranja koji su prikazani na slici 11.



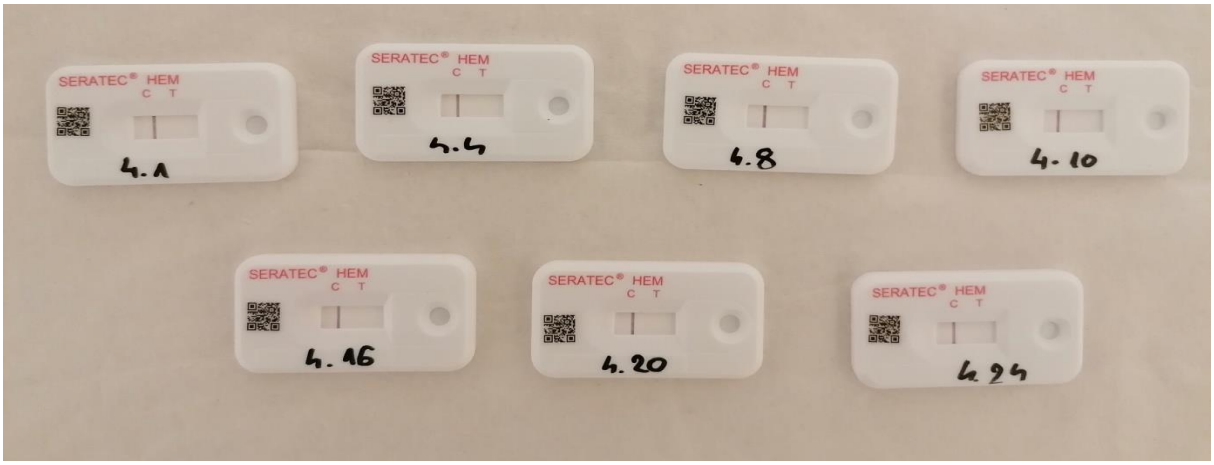
Slika 11. Rezultati testiranja uzoraka krvi konja

Puna i razrijeđena krv mačke (*Felis catus* L.), nakon nanošenja na pamučnu bijelu tkaninu i sušenja, testirana je SERATEC HemDirect testom. Ukupno je provedeno sedam testiranja krvi mačke koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24. Testovi su pokazali negativan rezultat za svih sedam provedenih testiranja koji su prikazani na slici 12.



Slika 12. Rezultati testiranja uzoraka krvi mačke

Puna i razrijeđena krv nutrije (*Myocastor coypus* Molina) testirana je SERATEC HemDirect testom nakon nanošenja uzoraka na pamučnu bijelu tkaninu i sušenja. Ukupno je provedeno sedam testiranja krvi nutrije koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24. Testovi su pokazali negativan rezultat za svih sedam provedenih testiranja koji su prikazani na slici 13.



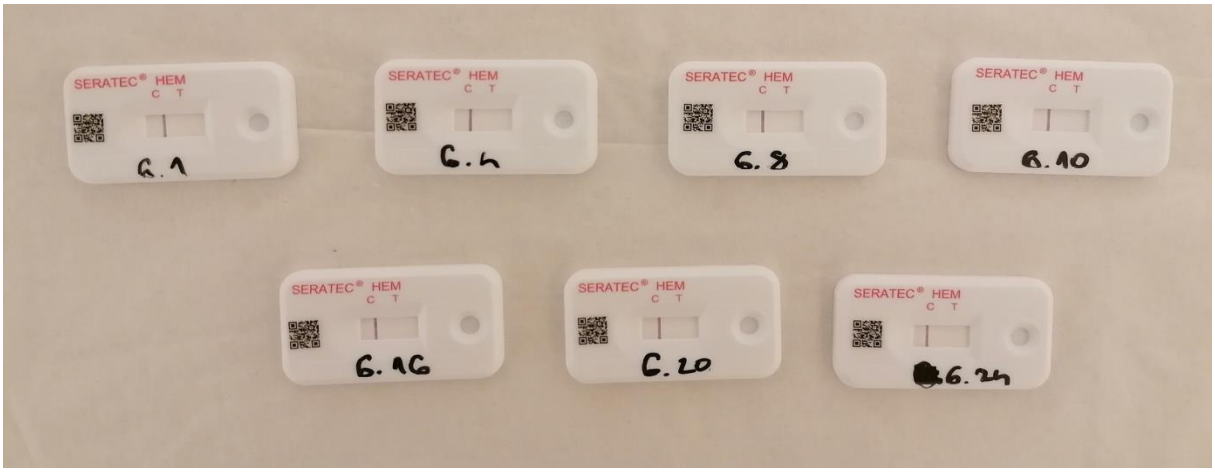
Slika 13. Rezultati testiranja uzoraka krvi nutrije

Puna i razrijeđena krv gačka (*Corvus frugilegus* L.), nakon nanošenja i sušenja na pamučnoj bijeloj tkanini, testirana je SERATEC HemDirect testom. Ukupno je provedeno sedam testiranja krvi gačka koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24. Testovi su pokazali negativan rezultat za svih sedam provedenih testiranja koji su prikazani na slici 14.



Slika 14. Rezultati testiranja uzoraka krvi gačka

Puna i razrijeđena krv srne (*Capreolus capreolus* L.), nakon nanošenja na pamučnu bijelu tkaninu i sušenja, testirana je SERATEC HemDirect testom. Ukupno je provedeno sedam testiranja krvi srne koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24. Testovi su pokazali negativan rezultat za svih sedam provedenih testiranja koji su prikazani na slici 15.



Slika 15. Rezultati testiranja uzoraka krvi srne

Puna i razrijeđena krv europskog ježa (*Erinaceus europaeus* L.) testirana je SERATEC HemDirect testom nakon nanošenja uzoraka na pamučnu bijelu tkaninu i sušenja. Ukupno je provedeno sedam testiranja krvi europskog ježa koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24. Testovi su pokazali negativan rezultat za svih sedam provedenih testiranja koji su prikazani na slici 16.



Slika 16. Rezultati testiranja uzoraka krvi europskog ježa

Puna i razrijeđena krv goluba (*Columba livia* Gmelin), nakon nanošenja na pamučnu bijelu tkaninu i sušenja, testirana je SERATEC HemDirect testom. Ukupno je provedeno sedam testiranja krvi goluba koja uključuju testiranje pune krvi i testiranje razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24. Testovi su pokazali negativan rezultat za svih sedam provedenih testiranja koji su prikazani na slici 17.



Slika 17. Rezultati testiranja uzoraka krvi goluba

U tablici 2. prikazani su rezultati svih 57 testiranih uzoraka krvi čovjeka i životinja testom SERATEC HemDirect.

Tablica 2. Rezultati ispitivanja svih uzoraka testom SERATEC HemDirect

	RAZRJEĐENJA							
UZORAK KRVI	**1/1**	**1/4**	**1/8**	**1/10**	**1/16**	**1/20**	**1/24**	**1/40**
LJUDSKA	+	+	+	+	+	+	+	+
KONJ	-	-	-	-	-	-	-	
MAČKA	-	-	-	-	-	-	-	
NUTRIJA	-	-	-	-	-	-	-	
GAČAC	-	-	-	-	-	-	-	
SRNA	-	-	-	-	-	-	-	
EUROPSKI JEŽ	-	-	-	-	-	-	-	
GOLUB	-	-	-	-	-	-	-	

5. RASPRAVA

Primjena preliminarnih testova na krv olakšava rad istražitelja prilikom obrade mjesta događaja i pomaže im pravilno prikupiti sve tragove koji mogu dovesti do identiteta počinitelja. Ovi testovi također potvrđuju da je trag kojeg su pronašli ljudska krv te da ga treba prikupiti i poslati na DNK analizu kako bi se pokušao utvrditi identitet osobe. Konačni rezultati koji se dobivaju u laboratoriju ovise o pouzdanosti preliminarnih testova. Ovi se testovi često rabe na mjestu počinjenja kaznenog djela, ali se njihov značaj obično umanjuje (9).

Preliminarni test na krv SERATEC HemDirect osmišljen je tako da kada dođe u kontakt s krvi primata, odnosno njihovim hemoglobinom, daje pozitivan rezultat. Iako je ovaj test visoko specifičan postoji mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata. Takvi lažno pozitivni rezultati forenzičare mogu navesti na krivi trag te istragu usmjeriti u krivom smjeru, što dovodi do ispitivanja životinjskog traga krvi kao ljudskog. Kako bi se ovakve situacije izbjegle provode se validacijska istraživanja koja uključuju ispitivanje specifičnosti testa kada je izložen krvi različitih životinja u različitim koncentracijama.

U inicijalnom validacijskom istraživanju testa SERATEC HemDirect obuhvaćeno je 26 različitih vrsta životinja (16). Istraživanje u ovom radu uključuje životinjske vrste koje nisu bile zastupljene u navedenom istraživanju, a to su: mačka (*Felis catus L.*), nutrija (*Myocastor coypus* Molina), gačac (*Corvus frugilegus* L.), srna (*Capreolus capreolus L.*), europski jež (*Erinaceus europaeus L.*) i golub *(Columba livia* Gmelin). U ovo istraživanje posebice su uključene dvije vrste ptica jer je inicijalno validacijsko istraživanje obuhvatilo samo sisavce.

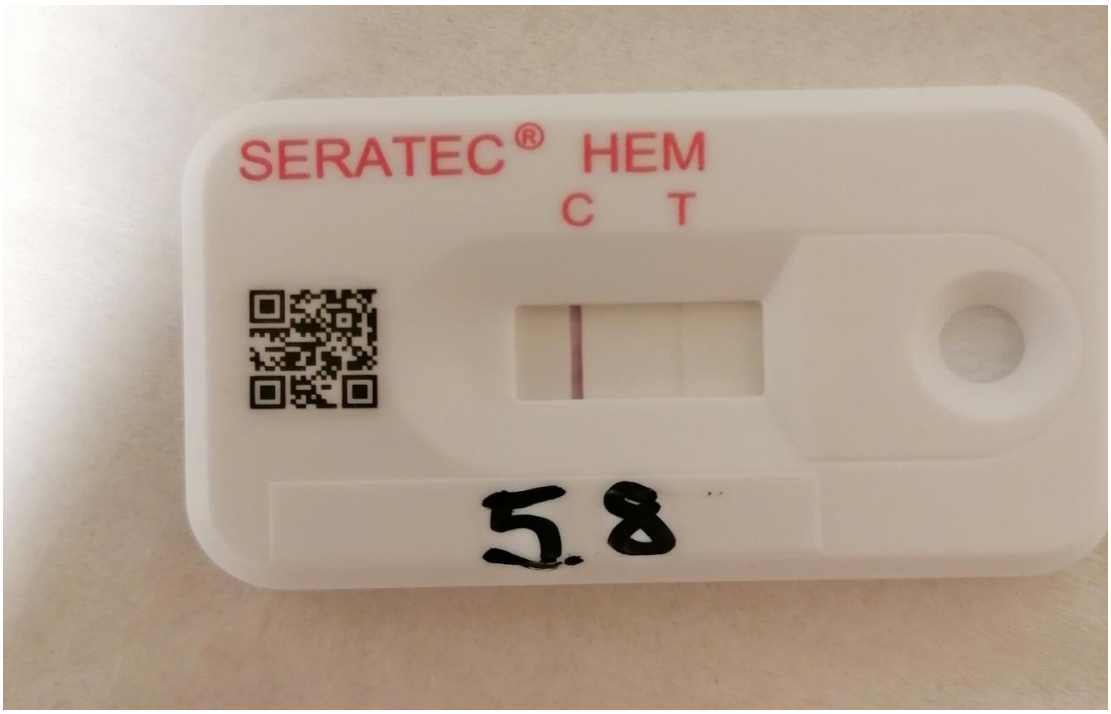
Ukupno je provedeno 57 testiranja koja uključuju punu krv i razrjeđenja u omjeru 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24 te 1/40 samo za ljudsku krv. Sva testiranja provedena su u skladu s preporukama proizvođača testa kako bi se izbjegle bilo kakve nepravilnosti.

Uzorci su prvo razrijeđeni u omjerima 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20 i 1/24 te uzorak ljudske krvi dodatno u omjeru 1/40 kako bi se smanjila koncentracija hemoglobina i ispitala učinkovitost rada testa. Nakon pripreme razrjeđenja uzorci su naneseni na bijelu pamučnu tkaninu i ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi. Na pamučnu tkaninu također se nanosio i uzorak pune krvi kako bi se provjerilo hoće li dovesti do pojave „high dose hook effect“ koji se javlja kod vrlo visokih koncentracija hemoglobina. Ovaj se efekt javlja u uzorku koji je dosegao testnu liniju, a ima previše slobodnog hemoglobina koji se nije vezao za antitijela u podlozi

koja se mobiliziraju dodatkom uzorka. U tom slučaju antitijela koja su imobilizirana u testnom području na membrani postaju zasićena slobodnim hemoglobinom i sprječavaju nastajanje sendvič kompleksa antitijelo-antigen-antitijelo. U ovom istraživanju „high dose hook effect“ primijećen je nakon testiranja uzorka pune ljudske krvi, što je posljedica prevelike količine otopljenog hemoglobina. Testiranje uzoraka razrijeđene ljudske krvi dalo je pozitivne rezultate s intenzivnije vidljivom linijom rezultata ispitivanja (T) u prozoru rezultata testa. Razlog tome je da su uzorci razrijeđene ljudske krvi imali optimalnu koncentraciju hemoglobina.

Prema istraživanju kojeg su proveli Misencik Amanda i Laux Dale L. test SERATEC HemDirect specifičan je za krv čovjeka i primata te ima i reaktivnost s krvlju tvora. U toj studiji test je pokazao pozitivan rezultat na krv sljedećih životinja: čimpanza, gorila, orangutan i tvor, dok je kod sijamanga linija rezultata ispitivanja (T) u prozoru rezultata bila slabo vidljiva (16).

U istraživanju provedenom pri izradi ovog rada kod testiranja uzorka krvi gačka (*Corvus frugilegus* L.) u razrjeđenju 1/8 nakon 15 minuta pojavila se slabo vidljiva linija rezultata ispitivanja (T) u prozoru rezultata koja se može vidjeti na slici 18. Prema uputama proizvođača rezultati se očitavaju nakon 10 minuta. S obzirom na to da se linija pojavila nakon isteka vremena koje je propisano za očitavanje rezultata, ovaj se rezultat smatra nevažećim, ali pokazuje da bi u validacije testova trebalo uključiti i druge skupine životinja osim sisavaca posebice zbog sve većeg broja egzotičnih kućnih ljubimaca (ptice, gušteri, zmije i sl.). Ostali ispitivani uzorci životinja koje se mogu naći u našem okruženju nisu dale vidljivu liniju rezultata ispitivanja (T) bilo kojeg intenziteta u prozoru rezultata.



Slika 18. Rezultat testiranja uzorka krvi gačka u razrjeđenju 1/8

Prema istraživanju kojeg su proveli Emma Johnston i suradnici u kojem se uspoređivala osjetljivost preliminarnih kolorimetrijskih testova (Kastle-Meyer (KM), Hemastix, Leucomalachite green (LMG)) i preliminarnog Hexagon OBTI testa koji je prethodnik testu SERATEC HemDirect dobiveni su sljedeći rezultati. Preliminarni test Hexagon OBTI na uzorku pune krvi i razrjeđenju 1/10 pokazao je lažno negativni rezultat i smatra se da je to posljedica „high dose hook effecta“. Hexagon OBTI test pokazao je pozitivni rezultat u razrjeđenjima 1/50, 1/100, 1/250, 1/1 x 10^3. Također je pokazao i pozitivni rezultat u razrjeđenjima 1/5 x 10^3 i 1/1 x 10^4, ali je volumen pufera u bočici smanjen s 2 mL na 200 µL. Rezultati ukazuju na to da se Hexagon OBTI test ne preporučuje za traženje ljudske krvi na mjestu počinjenja kaznenog djela bez prethodne upotrebe kolorimetrijskog testa (14).

U provedenom istraživanju na uzorku pune krvi i razrjeđenju 1/10 test SERATEC HemDirect pokazao je pozitivnu reakciju, stoga rezultati ovog istraživanja pokazuju da je SERATEC HemDirect primjenjiv test za traženje ljudske krvi u forenzičnom području. Ovaj imunološki test ima širok raspon osjetljivosti za otkrivanje različitih koncentracija hemoglobina i ne zahtjeva prethodnu upotrebu kolorimetrijskih testova te bi trebao imati prednost u odabiru za rad nad Hexagon OBTI testom.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, u kojem se pomoću preliminarnog testa SERATEC HemDirect testirala puna i razrijeđena ljudska krv i krv sedam različitih životinjskih vrsta, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Nakon testiranja pune i razrijeđene ljudske krvi, preliminarni test SERATEC HemDirect dao je pozitivan rezultat u svim ispitivanim uzorcima, ali je kod uzorka pune krvi uočena razlika u intenzitetu linije rezultata ispitivanja (T) u odnosu na uzorke razrijeđene ljudske krvi.

2. Test SERATEC HemDirect nije reagirao na punu niti na razrijeđenu krv sedam ispitivanih životinjskih vrsta.

3. Temeljem dobivenih rezultata zaključuje se da je SERATEC HemDirect brz i pouzdan preliminarni test za identifikaciju ljudske krvi u laboratoriju i na mjestu počinjenja kaznenog djela.

4. Ova preliminarna metoda može jednostavno, brzo i pouzdano odrediti ljudsko podrijetlo krvi, što je neizmjerno važno kako se životinjski tragovi ne bi ispitivali kao ljudski i kako bi istraga išla u pravom smjeru.

7. LITERATURA

1. National Research Council. Strengthening forensic science in the United States: a path forward. [Internet] National Academies Press; 2009. Pristupljeno 21.06.2021. Dostupno na: https://www.ojp.gov/pdffiles1/nij/grants/228091.pdf

2. Struna. Hrvatsko strukovno nazivlje. Pojam: Locardovo načelo razmjene. Dostupno na: http://struna.ihjj.hr/naziv/locardovo-nacelo-razmjene/44337/

3. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. Forensic science international. 2009 Jul 1;188(1-3):1-7. Dostupno na: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19328638/

4. Li R. Forensic Serology. In: Kobilinsky L, editor. Forensic chemistry handbook. John Wiley & Sons; 2011 Nov 17. p. 269-278. Pristupljeno 05.07.2021. Dostupno na: http://www.ffh.bg.ac.rs/wp-content/uploads/2021/01/Forensic-Chemistry-Handbook-by-Lawrence-Kobilinsky.pdf

5. Spalding RP. Presumptive Testing and Species Determination of Blood and Bloodstains. In: James SH, Kish PE, Sutton TP. Principles of bloodstain pattern analysis: theory and practice. CRC press; 2005. p. 349-368

6. Marjanović D, Primorac D, Drobnič K. Molekularna forenzična genetika. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju; 2009.

7. Marjanovic D, Primorac D. Forenzična genetika teorija i aplikacija. Bosnia and Herzegovina: Naučna i stručna knjiga „Lelo“. 2013.

8. Mršić G, Moodly D, ur. Rječnik kriminalistike i forenzike. Zagreb: Hrvatska sveučilišna naklada; 2020.

9. Brdakić I, Bokšić A, Kružić I, Jerković I, Bašić Ž. Detekcija tragova krvi Combur3-testom® nakon tretiranja sredstvima za čišćenje. Policija i sigurnost [Internet]. 2017 [pristupljeno 03.07.2021.];26(2/2017.):160-167. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/189709

10. Primorac D, Schanfield M, editors. Forensic DNA applications: An interdisciplinary perspective. CRC Press; 2014 Jan 29.

11. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Medicinska naklada; 2008. 80 str.

12. Gunn A. Essential forensic biology. John Wiley & Sons; 2019 Mar 18. p. 48-51

13. Castello A, Alvarez M, Verdu F. Accuracy, reliability, and safety of luminol in bloodstain investigation. Canadian Society of Forensic Science Journal. 2002 Jan 1;35(3):113-21. Dostupno na: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00085030.2002.10757540

14. Johnston E, Ames CE, Dagnall KE, Foster J, Daniel BE. Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI. Journal of forensic sciences. 2008 May;53(3):687-9. Dostupno na: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471215/

15. Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M, Schmidt L, Cordier A, Dirnhofer R. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. Journal of Forensic Science. 1999 May 1;44(3):597-602. Dostupno na: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10408117/

16. Misencik A, Laux DL. Validation study of the seratec hemdirect hemoglobin assay for the forensic identification of human blood. MAFS Newslett. 2007;36(2):18-26. Dostupno na: https://www.seratec.com/docs/HemDirect_Validation_MAFS.pdf

17. Struna. Hrvatsko strukovno nazivlje. Pojam: Validacija. Dostupno na: http://struna.ihjj.hr/naziv/validacija/8718/

18. Taylor JK. Validation of analytical methods. Analytical Chemistry. 1983 May 1;55(6):600A-8A. Dostupno na: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00257a001

19. Layne DesPortes B. Validation of Forensic Science Techniques: Principles and Procedures. Wiley Encyclopedia of Forensic Science. 2011. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/314622727_Validation_of_Forensic_Science_Techniques_Principles_and_Procedures

20. SERATEC HemDirect – Instruction for use. SERATEC Gesellschaft fur Biotechnologie mbH, Ernst-Ruhstrat-Str. 5, D-37079 Gottingen, Germany, 2019.

8. SAŽETCI

Validacija preliminarnog testa na krv

Cilj: Cilj ovog rada je bio utvrditi je li imunokromatografski test SERATEC HemDirect visoko specifičan za forenzičku identifikaciju ljudske krvi, odnosno postoje li životinje čija bi krv pokazala lažno pozitivan rezultat na ovom testu. U ovom istraživanju ispitala se osjetljivost i specifičnost testa kada je izložen punoj i razrijeđenoj krvi čovjeka i različitih životinjskih vrsta.

Metode: Istraživanje je obuhvatilo osam uzoraka venske krvi, čovjek i sedam različitih životinjskih vrsta. Svi uzorci krvi analizirani su testom SERATEC HemDirect. Pripremljena je serija razrjeđenja (1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/24 te 1/40 samo za krv čovjeka) iz pune krvi dodavanjem dvostruko destilirane vode. Nakon što je napravljena serija razrjeđenja, 50 µL uzorka pune krvi i svakog razrjeđenja naneseno je na pamučnu bijelu tkaninu i ostavljeno da se osuši na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, 1/4 dijela uzorka izrezana je i ekstrahirana u HemDirect puferu 30 minuta. Po isteku protokolom propisanih 30 minuta dodale su se tri kapi svakog uzorka u jažicu za ispitivanje te su se rezultati očitavali i bilježili nakon 10 minuta.

Rezultati: Test SERATEC HemDirect pokazao je pozitivne rezultate u svim analiziranim uzorcima ljudske krvi (puna krv i razrjeđenja 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/24, 1/40). U analiziranim uzorcima krvi svih životinjskih vrsta test je pokazao negativne rezultate.

Zaključak: Temeljem dobivenih rezultata zaključeno je da se SERATEC HemDirect kao brz i pouzdan test može koristiti za identifikaciju ljudske krvi u laboratoriju i na mjestu počinjenja kaznenog djela.

Ključne riječi: krv, tragovi krvi, preliminarni test, SERATEC HemDirect

ABSTRACT

Validation study of a preliminary blood test

Aim: The aim of this study was to determine whether the SERATEC HemDirect immunochromatographic test is highly specific for forensic identification of human blood, and whether there are animals whose blood would show a false positive result on this test. In this study, the sensitivity and specificity of the test when exposed to whole and diluted blood of human and various animal species were examined.

Methods: The study included eight samples of venous blood, human and seven different animal species. All blood samples were analyzed by the SERATEC HemDirect test. A dilution set (1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/24, and 1/40 for human blood only) was prepared from whole blood by adding double destilled water. A 50 µL sample of whole blood and each dilution were placed on a white cotton cloth and left to dry at room temperature. After drying, 1/4 of the sample was cut out and extracted in HemDirect buffer for 30 minutes. After extraction, three drops of each sample were added to the test well and the results were read and recorded after 10 minutes.

Results: The SERATEC HemDirect test showed positive results in all analyzed human blood samples (whole blood and dilutions 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/24, 1/40). In the analyzed blood samples of all animal species, the test showed negative results.

Conclusion: Based on the obtained results, it was concluded that SERATEC HemDirect as a fast and reliable test can be used for identification of human blood in the laboratory and at the crime scene.

Keywords: blood, blood traces, preliminary test, SERATEC HemDirect

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i Prezime: Mia Belobrajdić

Datum i mjesto rođenja: 18. 05. 1992. godine, Zagreb, Hrvatska

E-mail: mia_b18@hotmail.com

Obrazovanje:

- 2019. – 2021. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Diplomski studij Forenzike, modul Forenzična kemija i molekularna biologija
- 2013. – 2018. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, Preddiplomski stručni studij sanitarnog inženjerstva
- 2007. – 2011. Zdravstveno učilište Zagreb, Zdravstveno laboratorijski tehničar
- 1999. – 2007. Osnovna škola „Ivo Andrić“ u Zagrebu

Nagrade i priznanja:

- 2016. Priznanje za najuspješniju studenticu preddiplomskog stručnog studija sanitarnog inženjerstva u akademskoj godini 2014./2015.
- 2021. Rektorova nagrada za izvrsnost za postignuća u akademskoj godini 2019./2020.

10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Mia Belobrajdić, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom
Validacija preliminarnog testa na krv rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, _____

Potpis studenta/studentice: _____