



BIOMEDREC  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 rozprostření krevních skvrn
  - znát omezení odorologie.

### Osnova přednášky

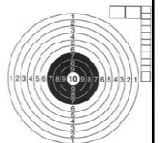
- Krev
- Rozprostření skvrn
- Semeno, sliny, pot, moč
- Kosti
- Pach

### 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; mozkomíšní 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 sejmemo 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 rukavic
- Prohlédnutí přístupových cest
- Prohlédnutí objektů, rostlinného porostu
- Prohlédnutí těla lékařem, za přítomnosti lékaře (nebo osobou stejného pohlaví)
- Prohlédnutí oděvních součástí – znalec v laboratoři
- Dokumentace protokolem a fotografií
- Srovnávací materiál: vlasy, chlupy (kriminalistický 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.

## Antikoagulantia

- 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 jednorázovým skalpelem
- Fyzikálně
  - převedení do roztoku, 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
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** s krví pění
- 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, luminiscence ve tmě)
  - i na velké plochy (nevadí následné DNA analýze)
- Hemoglobin katalyzuje oxidaci (**peroxidázová aktivita hemu**)
  - Komerční: Hematest, Desmophan
  - fenolftalein – redukován bezbarvý, oxidovaný růžovořalový (Kastle-Meyerův test), pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - 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
- Rozlišení lidské krve
  - imunohistochemie: imunoprecipitace, barevné reakce: detekční krok alkalická fosfatáza, křenová 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.

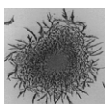
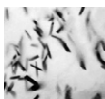


Foto: Miami Dade Forensic Police Department

## Důkaz krevních skvrn z plodu

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

## Ženská krev

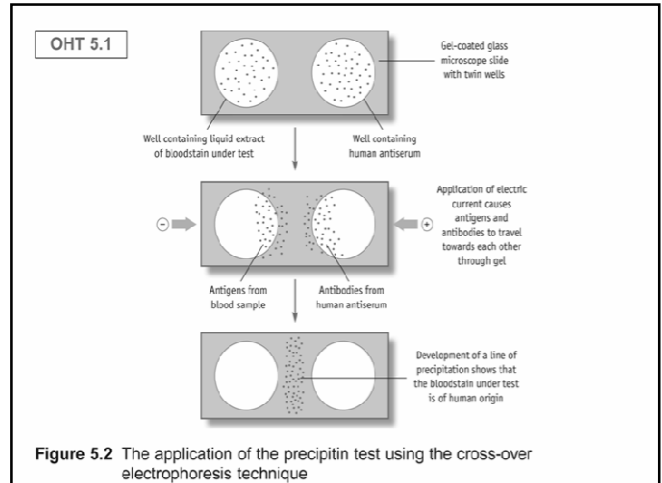
- Těhotenská
  - choriogonadotropin
- Menstruační
  - fibrinolytická aktivita.

## Transfundovaná krev

- Nekompatibilní transfúze
  - detekovatelné v glomerulech ledvin

## Rozlišení zvířecí krve

- Sérologický test
  - Ag-Ab
  - 1901 Paul Uhlenhuth: tekuté prostředí
  - injikoval králíka bílkovinami slepičího vajíčka
  - odebral králíkovi 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
- DNA



## Imunohistochemické typy

- Tkáně 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

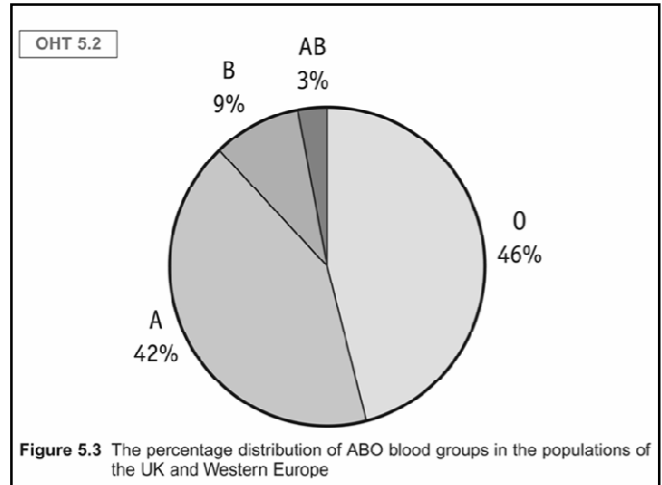
- Test smíšené aglutinace, absorpčně eluční test
- ABO systém
- Na erythrocytech, endotelu cév, epitelu, v hlenu (u vylučovatelů i jinde)
- Základní jsou tři alely:  $I^A$ ,  $I^B$  a  $i$  (někdy označovaná jako  $I^O$ ).  $I^A$  a  $I^B$  jsou *kodominantní*,  $i$  je vůči oběma *recesivní*

## 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

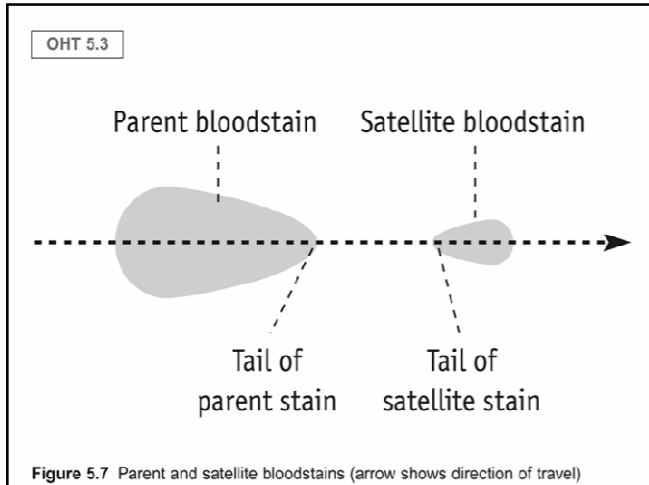
- Rh (*Macaca mullata*), Diego, MNS, Duffy, Lutheran, Kell, Kidd, Lewis, Landsteiner-Wiener, ....

## Polymorfní enzymy séra

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

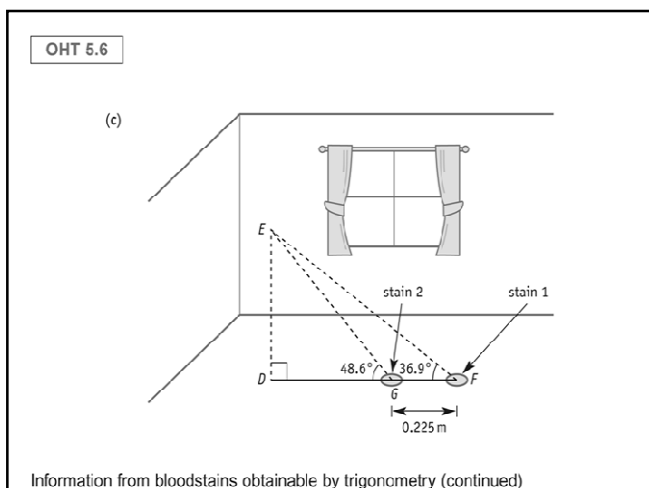
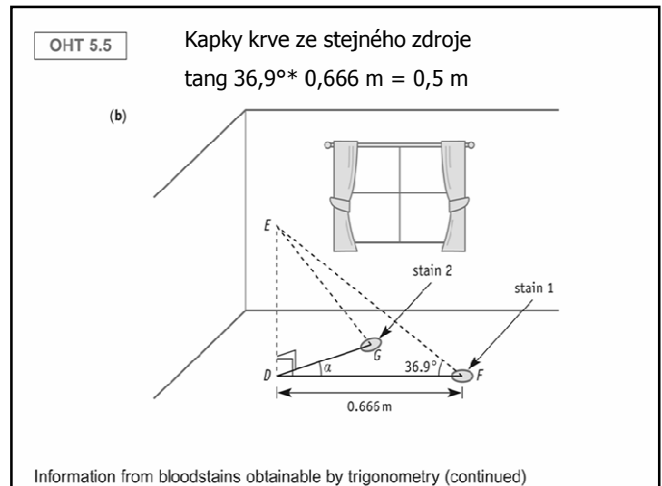
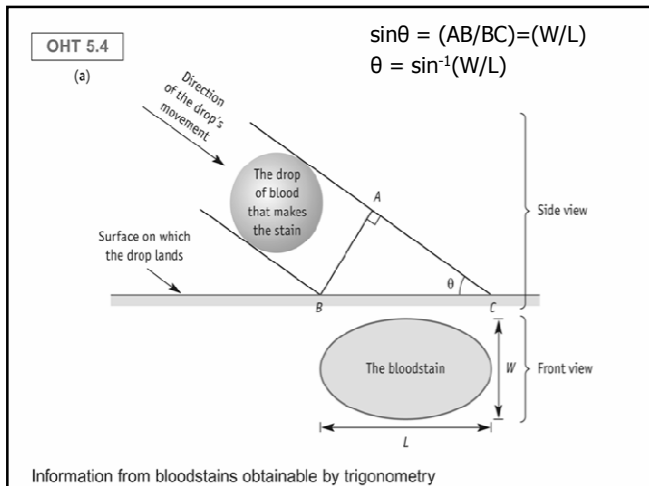
## Analýza rozprostření krevních skvrn

- 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

- 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)

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

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

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

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

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

Information from bloodstains obtainable by trigonometry (continued)

## Pasivní krevní skvrny

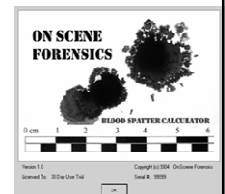
- Jen působením gravitace
- Pozice těla někdy může zabránit toku krve
- Změna polohy mrtvého těla se odrazí ve změně toku krve
- Kulatá kapka krve tvoří rychle (50 s) oschlý kroužkovitý okraj (i při utření lze vidět); možnost odhalit snahu umýt skvrny.

## 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 farmáři 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 zakrvavená 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 váčku (spermatozoa, voda, sůl, bílkoviny, fruktóza, spermin, cholin) + spermatická plazma (výměšky 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

## Sliny

- Pod UV fluoreskuje
  - moč falešně pozitivně, azoospermie falešně negativně
- Mikroskop
- Kyselá fosfatáza ACP
  - s  $\alpha$ -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.

- 99% voda
  - mucin
  - $\alpha$  amyláza rozkládá škrob na maltózu a dextriny
  - buňky bukalní 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  $\alpha$  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”.*

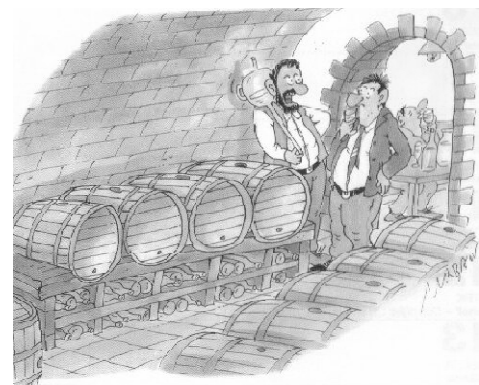
*Homer, The Odyssey*

„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.“



„ROUKÁM, ŽE JSTE OUBURNÍK, POZNAL JSTE, ŽE TOHLE VÍNO JE PIVO!”

## Odorologie

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

## Lidský metabolismus

- Vznik odpadních produktů, kterých se tělo zbavuje močí, lejnem, vydechovaným 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
  - Léky
  - Pracovištěm
  - Požíváním tabáku, alkoholu, drog
  - Používáním kosmetiky
  - Psychickým stavem
- Několik tisíc látek.

## Využití pachových stop v kriminalistice

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

## 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, kliky, volant
  - vlasy, odloupaná pokožka
  - zjištěno trasologicky
- Vlastní stopa
  - spolu se stopou daktyloskopickou, biologickou, trasologickou
  - zajištění pachové stopy má přednost (čas).

## Snímání otisku pachové stopy (OPS)

- Snímáme na místě, nepřenášíme
- Pomocí pumpičky prosajeme vzduch trubičkou s absorpčním materiálem (molekulární síto, aktivní uhlí, tenká kovová fólie).
- Alternativní postup: 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).
- Zašleme v určeném kufru ke zkoumání.
- Osoby přítomné při snímání OPS nesmí být přítomny při následných úkonech.

## Komplikace

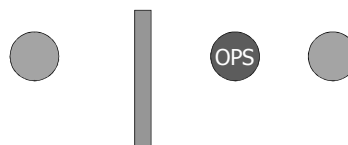
- Snesení
  - Průjezdem motorových vozidel
- Nevhodné místo
  - Jílovité bláto, proudící voda
- Destrukce místa
  - Požár, výbuch
- Ohrožení čichu psa
  - Politá místa čpavkem
- Vlhko
  - Aratex zvlhne, konzerva degraduje

## Odebrání srovnávací pachové konzervy (SPK)

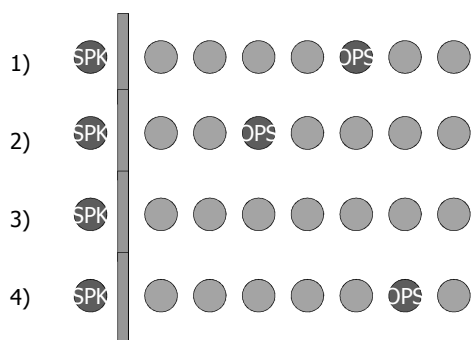
- Podrobit se úkonu je povinen každý (po výzvě a poučení, se souhlasem státního zástupce i fyzické překonání odporu)
- Proškolený policista stejného pohlaví jako porovnávaná osoba
- Ne ve věznici (pachové pozadí, přenosové pachy)
- Na každou osobu jeden policista
- Aratex pinzetou zboku na holé tělo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



## Práce psa

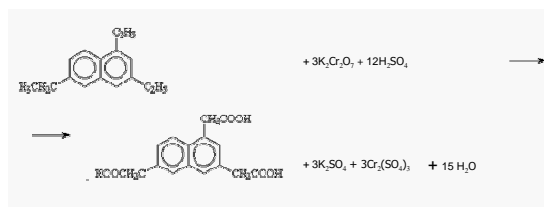
- Subjektivní.
- Služební kynologie.
- Sleduje čerstvou pachovou stopu.
- Srovnává stopy, vyštěkáním nebo zalehnutím (podle výcviku) označí shodu.
- Intenzivní pach (benzinové čerpadlo, lakovna, masna) – přidá se do srovnávací řady vzorek pachového pořadí
- Africké nebo asijské etnikum – přidá se vzorek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

## Detekční přístroje

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

## Chemicky

- Analýza sazí z těžkých olejů
- Dvojchroman 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, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, HCN, CS<sub>2</sub>, 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<sup>-15</sup> g).

Děkuji vám za pozornost!