

Osjetljivost i specifičnost Seratec HemDirect testa na krv životinja koje nisu sisavci

Svetina, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:144874>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-18**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST SERATEC HEMDIRECT
TESTA NA KRV ŽIVOTINJA KOJE NISU SISAVCI

ANTONIJA SVETINA

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA
FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST SERATEC HEMDIRECT
TESTA NA KRV ŽIVOTINJA KOJE NISU SISAVCI

Mentor: Prof.dr.sc. Damir Marjanović

Komentor: Josip Crnjac, prof. biol.

Studentica: Antonija Svetina

Matični broj studenta: 545/2020.

Split, rujan 2022.

Rad je izrađen u Laboratoriju za forenzičnu genetiku i biologiju
pod nadzorom Josipa Crnjca, prof. biol.
u vremenskom razdoblju od 01. travnja 2022. do 01. rujna 2022.

Datum predaje diplomskog rada: 15. rujan 2022.

Datum prihvatanja rada: 16. rujan 2022.

Datum usmenog polaganja: 22. rujan 2022.

Povjerenstvo:

1. **Doc.dr.sc. Snježana Štambuk**
2. **Dr.sc. Nevena Aljinović**
3. **Prof.dr.sc. Damir Marijanović**

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Krv.....	2
1.2. Validacija.....	8
1.3. Identifikacija i individualizacija.....	9
1.4. Animalna forenzika.....	14
1.5. Seratec HemDirect test.....	15
2. CILJ RADA.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Materijali.....	18
3.1.1. Uzorci.....	18
3.1.2. Laboratorijska oprema.....	20
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Priprema uzoraka i ispitivanje.....	23
4. REZULTATI.....	25
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČAK.....	35
7. LITERATURA.....	36
8. SAŽETCI.....	38
9. ŽIVOTOPIS.....	40
10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI.....	41

1. UVOD

Krv je jedna od najznačajnijih i najčešćih vrsta fizičkih dokaza koji su povezani s forenzičnim istraživanjem smrti i nasilnog zločina. Identifikacija i individualizacija tragova ljudske krvi napredovala je u proteklih 120 godina, od kada je Landsteiner 1901. godine otkrio sustav krvnih grupa ABO. Krvavi tragovi krvi sakupljeni s mjesta događaja nasilne smrti i izuzeti uzorci krvi s odjeće žrtve i optuženika mogu sada pružiti vezu između napadača i žrtve s visokim stupnjem znanstvene sigurnosti (1).

Znanstvena analiza dokaza uzoraka tragova krvi pokazala se ključnom u brojnim slučajevima u kojima se dovodi u pitanje način smrti odnosno pitanje ubojstva, samoubojstva, nesreće, ili prirodne smrti koje se moraju riješiti u kaznenom ili građanskom sporu odnosno postupku (2).

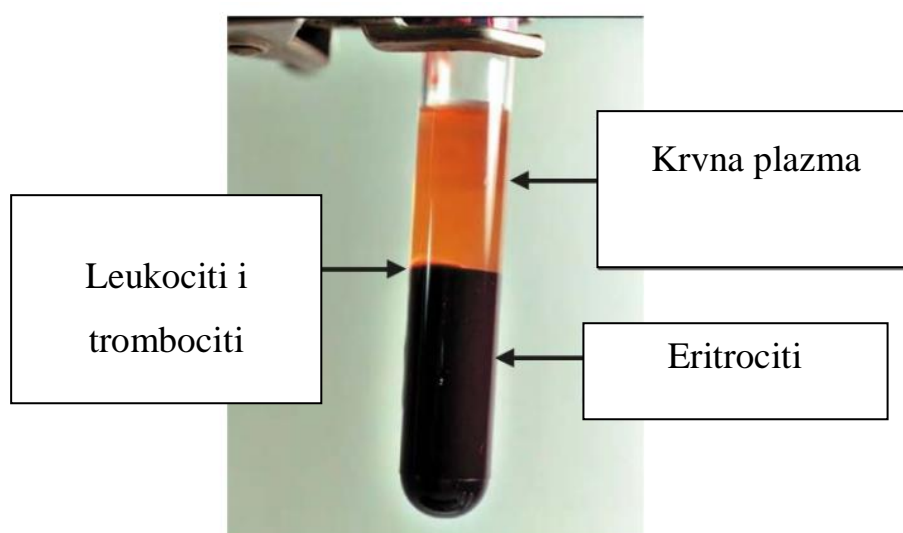
Prilikom dolaska na mjesto događaja, ukoliko se radi o tragovima nalik na krv, potrebno je odgovoriti na nekoliko pitanja. Prvo i najvažnije, je li se u konkretnom slučaju radi o krvi? Naime, postoje i tragovi nalik na krv, poput mrlja od čokolade, voća, vina, boje i slično. Na to pitanje odgovor daju jednostavne orijentacijske metode koje nemaju dokaznu vrijednost, ali ipak mogu pokazati potječe li ispitivana mrlja od krvi i to sa određenim stupnjem vjerojatnosti. Temelj ovakvih proba je reakcija sastojaka hemoglobina u kemijskim reagensima (3).

Također, pronađena krv na mjestu događaja nije uvijek ljudska, te je od vrlo velike važnosti za forenzičare da utvrde radi li se o krvi životinjskog ili ljudskog podrijetla. To je ključni korak za daljnji tijek očevida. Tu na snagu stupa Seratec HemDirect test, forenzični test koji detektira ljudski hemoglobin. Nakon utvrđivanja i identifikacije traga kao ljudske krvi potrebno je odgovoriti možemo li ju individualizirati? Zatim, kome pripada, žrtvi ili osumnjičeniku? Kada se odgovori na ova i slična pitanja, rješavanje forenzične istrage je neupitno (1).

1.1. Krv

Funkcionalno najvažnija tjelesna tekućina kod ljudi je krv. Krv je crvena, neprozirna te gusta tekućina osebujnog mirisa i slanog okusa. Protječe kroz tjelesni kadiovaskularni sustav, prenoseći hranjive tvari i kisik kroz tijelo. Ukupna količina krvi u tijelu odrasle osobe iznosi 5 do 6 litara, što je oko 8% ukupne tjelesne težine. Uloge krvi su višestruke, a najvažnija je njena transportna funkcija. Krv omogućava dovođenje kisika, a odvođenje ugljičnog dioksida iz pluća do svake stanice i obrnuto. Sljedeća također vrlo važna funkcija je nutritivna uloga koja omogućuje dopremanje hranjivih tvari poput glukoze, lipida i aminokiselina do svake stanice. Za odstranjivanje produkata metabolizma te raspadnutih i neiskorištenih tvari iz organizma tu je ekskretorna uloga krvi. Osim dosad navedenih funkcija, krv ima i uloge reguliranja volumena tjelesnih tekućina, acido-bazne ravnoteže te tjelesne temperature. Zadnja, ali ne i manje bitna, je zaštitna uloga, koju obavljaju bijele krvne stanice te antitijela (1).

Krv je tekuće tkivo koje ispunjava srce i krvne žile, a sastoji se od tekuće komponente koja se naziva plazma (sastoji se od vode, organskih tvari, anorganskih soli i glukoze) i od stanica uronjenih u njoj: eritrocita, leukocita i trombocita (4). Odvajanje krvne plazme od ostalih dijelova krvi obavlja se centrifugiranjem (5). Pri tome postupku krvne stanice i pločice se odvajaju od tekućeg dijela odnosno krvne plazme (slika 1).



Slika 1: Komponente krvi (izvor: 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. 43, prilagođeno od strane autora)

Krvna plazma je blijedožuta, prozirna tekućina čiji najveći dio čini voda (oko 90%) u kojoj su otopljene različite organske i anorganske tvari, oko 0,1% glukoze, 1% raznih anorganskih soli te oko 7 % proteina (tablica 1) (6).

Najvažnije među organskim tvarima su bjelančevine plazme. Funkcija krvne plazme je prijenos i otklanjanje tvari. Krvna plazma doprinosi tekućem svojstvu krvi te na taj način omogućava staničnim elementima da se kreću. Kada krvne plazme ne bi bilo, stanični elementi u krvi bili bi zgusnuti (1).

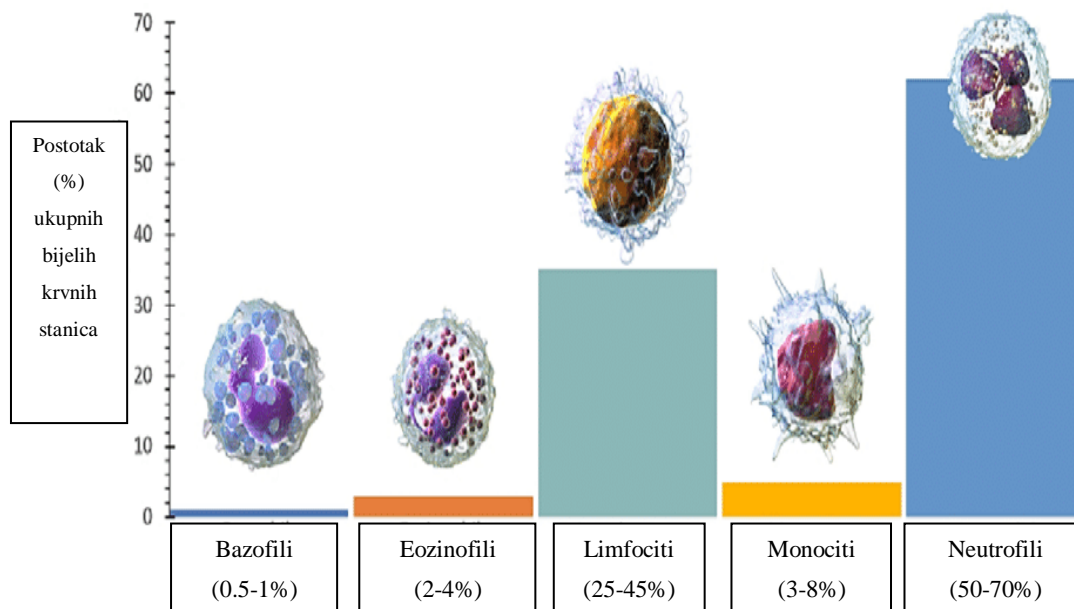
Tablica 1: Komponente i sastav plazme (izvor: Spalding RP. Presumptive Testing and Species Determination of Blood and Bloodstains. In: James SH, Kish PE, Sutton TP. Principles of bloodstain pattern analysis: theory and practice. CRC press; 2005., p. 43, prilagođeno od strane autora)

Voda 90%	
Otopljene tvari 10%	
Proteini plazme 7%	Albumin Globulini Fibrinogen
Hranjive tvari 2%	Lipidi Glukoza Vitamini Steroidni hormoni Aminokiseline
Anorganske soli 1%	Natrij Kalij Kalcijeva sol

Leukociti ili bijele krvne stanice su odgovorni za zaštitu organizma od patogena. Manje od 1 % u ljudskoj krvi su bijele krvne stanice. Primjera radi, na 1000 eritrocita dolazi 1 ili 2 leukocita. Oni su veći od eritrocita i imaju jezgru. Nadalje, leukociti nisu ograničeni na krv kao eritrociti, već mogu migrirati iz kapilara u intersticijsku (tkivnu) tekućinu (7).

Prema prisutnosti ili odsutnosti vidljivih granula u njihovoj citoplazmi dijele se u dvije osnovne grupe, granulocite i agranulocite. Granulociti uključuju neutrofile, eozinofile i bazofile, a proizvode se u koštanoj srži. Agranulociti se sastoje od limfocita i monocita, a nastaju u limfnim čvorovima (slika 2) (6).

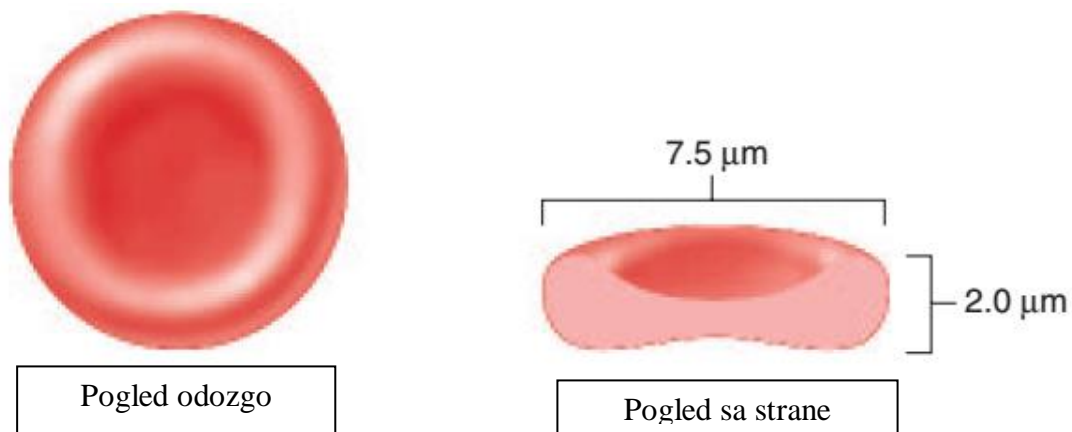
Najzastupljenija vrsta leukocita su neutrofile i njihova odgovornost je u preveniranju prekomjernog razmnožavanja gljivica i bakterija. B-limfociti proizvode antitijela (imunoglobuline) te sudjeluju u aktivaciji T-limfocita kada tijelo prepozna strane bjelančevine. U uklanjanju stanica zaraženih virusom te tumorskih stanica također sudjeluju T-limfociti (1).



Slika 2: Podjela i prosječne vrijednosti za normalan broj bijelih krvnih stanica odrasle osobe (izvor: https://www.researchgate.net/figure/Average-values-for-a-normal-adult-white-blood-cell-count-Another-group-of-leukocytes_fig1_331103361, prilagođeno od strane autora)

Eritrociti ili crvene krvne stanice se proizvode u koštanoj srži i najbrojnija su stanična komponenta u krvi. Bikonkavnog su oblika te nemaju jezgru osim u fazi eritroblasta (nezrela crvena krvna stanica). Normalna količina crvenih krvnih stanica je 4,8 milijuna do 5,4 milijuna po μl krvi, što je razina koja odgovara 1 milijardi eritrocita u samo 2 do 3 kapi krvi.

Budući da nemaju jezgru, nemaju niti mitohondrije što zauzvrat pridonosi njihovom kratkom vijeku od 120 dana. S takvim kratkim životnim vijekom, 3 milijuna eritrocita umire svake sekunde, a razgradnja se vrši u slezeni i jetri. Glavna funkcija eritrocita je transport kisika i CO₂ te regulacija pH krvi. Cirkulaciju kroz najmanje kapilare im omogućuje njihova vrlo mala veličina (7 do 8 μm) (slika 3) (6). Eritropoeza je proces stvaranja eritrocita i regulirana je potrebama tkiva za kisikom (8). U svim stanjima u kojima postoji apsolutni ili relativni manjak kisika, stvaranje eritrocita je ubrzano.



Slika 3: Oblik i veličina eritrocita (izvor:

https://thefactfactor.com/facts/pure_science/biology/human-biology/erythrocytes/4557/,

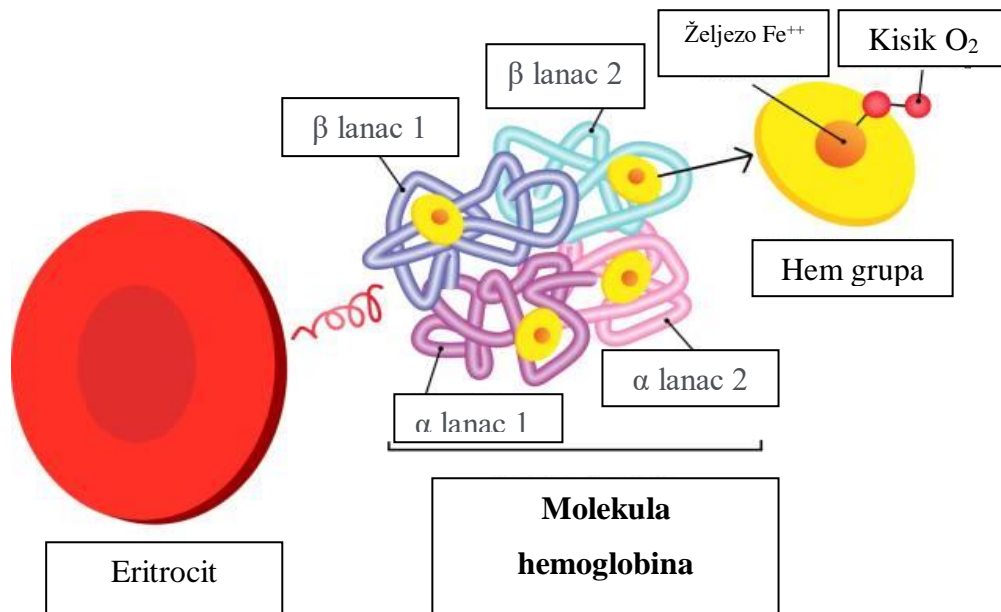
prilagođeno od strane autora)

U citoplazmi eritrocita se nalazi hemoglobin i čini 90 % njegove suhe težine. On je taj koji eritrocitima omogućuje prijenos O₂ i CO₂. Molekula hemoglobina sastoji se od četiriju polipeptidna lanca, dva alfa i dva beta lanca, od kojih je svaki vezan za hem grupu (slika 4). U središtu hem grupe nalazi se jedan atom željeza na koji se može vezati jedna molekula kisika. Kao rezultat toga, svaka molekula hemoglobina može ukupno nositi do četiri molekule O₂ (6).

Hemoglobin se puni kisikom u plućima, stvarajući tako oksihemoglobin. Ova molekula ima svjetlocrvenu boju. Dok krv prolazi kroz kapilare u ostatak tijela, dio oksihemoglobina

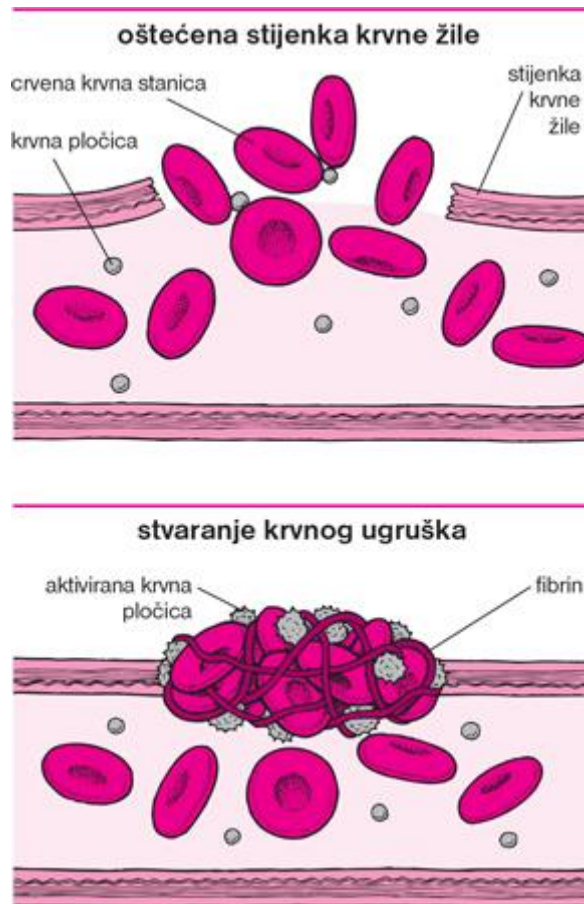
oslobađa kisik, postajući deoksihemoglobin. Deoksihemoglobin ima tamniju, plavocrvenu boju (7).

Kada se hemoglobin razgrađuje, pretvara se u bilirubin, a oslobođeno željezo se koristi za sintezu novog hemoglobina ili se pohranjuje u tijelu (1).



Slika 4: Struktura molekule hemoglobina ([izvor: https://www.istockphoto.com/vector/vector-medical-icon-erythrocyte-red-blood-cell-hemoglobin-molecule-gm1216748897-354912665?phrase=hemoglobin%20molecule](https://www.istockphoto.com/vector/vector-medical-icon-erythrocyte-red-blood-cell-hemoglobin-molecule-gm1216748897-354912665?phrase=hemoglobin%20molecule), prilagođeno od strane autora)

Krvne pločice ili trombociti su malena tjelešca nepravilna oblika bez jezgre. Komadići citoplazme se odvajaju od megakariocita i postaju trombociti. Trombociti ulaze u krv, gdje imaju važnu ulogu u zgrušavanju krvi. Kada je stijenka krvne žile oštećena, glatki mišići u stijenkama žile se kontrahiraju, uzrokujući stezanje žile. Krvne pločice se tada nakupljaju na ozlijeđenom mjestu i tvore čep lijepeći se jedna za drugu i za okolna tkiva. Ovaj čep je ojačan nitima proteina fibrina, koje se kontrahiraju i tvore čvrstu masu. Stegnuti trombocitni čep, fibrin i često zarobljeni eritrociti čine krvni ugrušak (slika 5) (7).



Slika 5: Zgrušavanje krvi ([izvor: http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-krvi-i-krvotoka/poremecaji-s-krvarenjem](http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-krvi-i-krvotoka/poremecaji-s-krvarenjem))

Gustoća, volumen, temperatura, boja, viskoznost, površinska napetost, miris, osmotski tlak, sedimentacija krvnih stanica te zgrušavanje pripadaju fizičkim svojstvima krvi. Za istraživanje tragova krvi od posebne su važnosti viskoznost, površinska napetost i relativna gustoća (specifična težina) (1).

Viskoznost tekućine je mjera njezine otpornosti na promjenu oblika ili protoka. Krv je otprilike četiri puta viskoznija od vode, iako je njena specifična težina samo malo veća od vode. Membrane eritrocita imaju visoku koncentraciju sijalične kiseline koja stvara veliki elektronegativni naboj na površini eritrocita. Taj negativni naboj krvi daje viskoznost. Promjene tlaka ne mijenjaju značajno viskoznost tekućine, ali promjene temperature imaju učinka. Opće pravilo, viskoznost tekućine opada s porastom temperature. Površinska napetost se izražava silom po jedinici duljine (din po centimetru) i predstavlja pohranjenu energiju. Površinska napetost krvi je 50 din/cm na 20°C. Termin relativna gustoća zamijenio je termin

specifična težina. Relativna gustoća je usporedba omjera gustoće bilo koje tvari u odnosu na gustoću vode koja je 1 g/cm^3 . To je veličina bez jedinice jer je omjer dva broja, svaki s istom mjernom jedinicom, te se jedinice međusobno poništavaju. Svaka tvar s manjom gustoćom od gustoće vode će plutati na vodi, a tvari s većom gustoćom će potonuti u vodu. Krv ima relativnu gustoću od 1,060 (6).

1.2. Validacija

Validacija je postupak ocjenjivanja značajki mjernog postupka i testiranje da li te značajke zadovoljavaju neka ranije postavljena mjerila (9). Izraz validacija se koristi za opisivanje različitih procesa svojstvenih dobrom znanstvenom istraživanju i analizi. U analitičkom kontekstu, validacija se odnosi na proces utvrđivanja putem dokumentiranog eksperimentiranja da je znanstvena metoda ili tehnika prikladna za namjeravanu svrhu odnosno da radi ono za što je namijenjena. Također, validacija predstavlja dio najbolje znanstvene prakse (10).

Ona se provodi prije primjene nove ili modificirane metode. Najbitnije kod svakog procesa validacije je definirati radne značajke metode, odnosno parametre validacije te odrediti kriterije njihove prihvatljivosti. Radne značajke metode su: točnost, granica detekcije, preciznost, granica kvantifikacije, specifičnost, raspon, ponovljivost, robusnost te obnovljivost (11).

Ovisno o metodi, bilo kvalitativnoj ili kvantitativnoj, moraju se odrediti različite značajke metode. Kod kvalitativne metode je potrebno odrediti ove značajke metode za njezinu validaciju: selektivnost, granica detekcije, nesigurnost mjerenja, robusnost, potvrda identiteta te osjetljivost. Kod kvantitativnih metoda je potrebno odrediti puno više značajki metode. To su: preciznost, selektivnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, raspon, nesigurnost mjerenja, robusnost, potvrda identiteta, točnost te iskorištenje. Stoga, ukoliko se metoda koristi, primjera radi, za kvalitativnu analizu krvi, većinu prethodno nabrojanih značajki metode nije potrebno ispitivati (10).

Validacija metode zahtjeva značajan angažman laboratorijskog osoblja. Uključuje odabir i ovlaštenje osoblja za provođenje aktivnosti, planiranje procesa validacije, određivanje parametara validacije, dokumentiranje dokaza te izradu izvješća o validaciji. Poslije provedbe validacije metode, potrebna je i verifikacija u konkretnim uvjetima u kojima laboratorij provodi metodu.

1.3. Identifikacija i individualizacija

Pojam forenzična identifikacija se odnosi na određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava traga, dok se forenzična individualizacija odnosi na utvrđivanje identiteta pronađenih skeletnih ostataka ili utvrđivanje porijekla nekog biološkog traga. Primjera radi, ukoliko se na mjestu događaja pronađe materijalni trag, prvo ga je potrebno identificirati. To znači odrediti da je taj trag zaista i krv (primjerice) na način da uz pomoć preliminarnih testova za krv to i ustanovimo. Individualizacija je kada se analizom DNA ustanovi da ta krv pripada osobi NN odnosno identitet osobe. Kada se utvrdi čija je to krv, za tijek istrage je također važno da li je ta NN osoba osumnjičenik ili žrtva (4).

Na mjestu događaja, mrlje od krvi nisu uvijek vidljive bilo zbog načina na koji nastaju bilo zato što je napadač očistio mjesto zločina nakon što je napad počinio. Međutim, jednom kada se krv prolije, vrlo teško je ukloniti sve tragove. U procesu čišćenja, krv se može zaući između primjerice dasaka drvenog poda i slično. Otkriti se može čak i u naizgled besprijekorno čistoj sobi ako se zna gdje tražiti. Istraživač koristi indikatorsku tvar kako bi identificirao prisutnost skrivene krvi. Preliminarni testovi za krv prvenstveno se temelje na dokazivanju prisustva hemoglobina, gdje uz upotrebu oksidirajućeg sredstva (vodikov peroksid) reakciju katalizira hemoglobin te proizvodi oksidacije tada međusobno djeluju s drugim kemikalijama i tada dolazi do brze promjene boje što označava pozitivan rezultat. Ovi testovi su jako osjetljivi, što znači da mogu dati pozitivan rezultat kod jako oskudne količine traga (krvi). Međutim, pozitivna reakcija samo ukazuje na prisutnost krvi i nije dokaz te se stoga nazivaju preliminarni testovi. Pored toga, moguće je dobiti lažno pozitivan rezultat reakcije, a zbog uobičajenih kemikalija iz okoliša koje također razgrađuju oksidans (12).

Tjelesne tekućine, sa stajališta forenzičnih znanosti, dijelimo u dvije skupine, a to su krv i sekreti. U sekrete spadaju sjemena tekućina (sperma), slina (pljuvačka), urin (mokraća) te vaginalni iscjedak (3).

U nastavku rada biti će nešto više riječi o preliminarnim testovima za krv, sjemenu tekućinu te slinu, a s naglaskom na krv. Također će biti riječi i o potvrdnim metodama testiranja tih tragova koje se nazivaju i laboratorijske metode. One se koriste u cilju dokazivanja prisustva traga (primjerice krvi), visoko su specifične te ne daju lažne pozitivne reakcije.

Da bi se osigurala osnova za identifikaciju, postoji disciplinarni znanstveni pristup koji diktira upotrebu rutinskog protokola, a uključuje logičan niz postupaka testiranja. Također, na taj način spriječena je i nenamjerna eliminacija koraka u postupku te je osigurano isto postupanje sa svim dokazima koji se razmatraju. Taj protokol, odnosno njegova varijacija može se primijeniti na bilo koju tjelesnu tekućinu koja se najčešće susreće u forenzičnoj serologiji.

Kada je riječ o krvi, opći koraci protokola su:

1. Pažljiv vizualni pregled dokaznog predmeta kako bi se locirale mrlje ili materijal koji ima vidljive karakteristike krvi
2. Primjena odgovarajuće orijentacijske metode (preliminarnog testa)
3. Primjena specifičnog i osjetljivog testa za potvrdu prisutnosti krvi
4. Određivanje biološkog odnosno podrijetla vrste (životinjskog ili ljudskog)
5. Karakterizacija krvi pomoću jednog ili više genetskih markera ili DNA (6).

Bitno je naglasiti da se tragovi koji su pronađeni u malim količinama ne trebaju analizirati preliminarnim testovima da se ne bi uništili ili kontaminirali.

Katalitički testovi bojom, benzidinski test, Kastle-Meyerov (KM) ili fenolftaleinski test, o-toluidinski test, leukomalahitski test (LMG), tetrametilbenzidinski test (TMB), test luminolom te fluoresceinski test spadaju u najvažnije preliminarne testove za otkrivanje prisutnosti krvi u pronađenom tragu (1).

Kod katalitičkih testova se uz pomoć kemijske oksidacije kromogene tvari te uz uporabu oksidansa kao katalizatora dokazuje prisutnost hemoglobina u pronađenome tragu. Na uzorak traga krvi odnosno sumnjivog materijala, nanosi se otopina kromogena, a zatim oksidansa. Kromogen je kemikalija koja mijenja boju, a oksidirajuće sredstvo je u većini slučajeva

vodikov peroksid. Boja dobivene reakcije ovisi o korištenom kromogenu. Redosljed dodavanja specifičnih reagensa je jako bitan jer u suprotnom može doći do dobivanja pozitivne reakcije od materijala koji ne sadržavaju tragove krvi. Lažno pozitivna reakcija je prisutna pri testiranju uzoraka koji sadržavaju tragove gnoja, sline, sluzi, hrđe, kalijeva permanganata, biljne peroksidaze i slično (1).

Benzidinski test je prvi preliminarni test u forenzici te se još naziva i Adlerov test. Reakcija otopine benzidina s vodikovim peroksidom i ledenom octenom kiselinom koja rezultira stvaranjem plave boje kromogena koju katalizira hemoglobin iz krvi. Plava boja na kraju može postati smeđa i izgubiti intenzitet, a sve to ako se izostavi postupak fiksiranja taloga u metanolu. Također, moguće je dobivanje lažno pozitivnih rezultata zbog kontaminiranosti krvi gdje su prisutni primjerice oksidansi, hrđa ili znoj. Benzidin je, međutim, prepoznat kao kancerogen te se danas vrlo rijetko primjenjuje u forenzičnim istraživanjima (6).

Kastle-Meyerov ili fenolftaleinski test je dobio ime po dvama kemičarima, Josephu Hoeingu Kastleu i Erichu Meyeru. U ovom testu ispituje se željezo u hemoglobinu pri čemu fenolftalin oksidira u fenolftalein. Kada se pomiješa s krvlju i vodikovim peroksidom, bezbojan fenolftalin oksidira u svijetloružičasti fenolftalein. Ovaj test daje istu reakciju kako s ljudskom krvlju, tako i s bilo kojom drugom krvlju, a koja ima osnovu hemoglobin te je potrebno napraviti potvrdni test da se otkrije podrijetlo krvi. Kod ovog testa je također velika mogućnost lažno pozitivnih rezultata ako postoje tragovi nekog recidirajućeg sredstva poput sline, soli teških metala ili ekstrakata povrća. Kastle-Meyerova reakcija je nešto manje osjetljiva od reakcije luminolskog testa te se ne smije izravno provoditi na mrljama da ne ometa naknadnu ekstrakciju DNA. Međutim, prednosti ovog testa su njegova jednostavnost i brzina te je najčešće korišten u identifikaciji tragova krvi (12).

O-toluidinski test ili ortotoluidin je 3,3-dimetilni derivat benzidina. Kod ovog testa, reakcija se provodi u kiselim uvjetima, slično kao kod benzidina, te proizvodi plavu boju koja također podsjeća na benzidin pri testiranju krvi. Na samom početku, ovaj test je trebao zamijeniti benzidinski test, ali naknadno je spoj prijavljen kao kancerogen te da može naštetiti ljudskom organizmu i samim tim se odustalo od njega. Bitno je naglasiti da je o-toluidin bio aktivni sastojak u testu Hemastix koji se rabio u medicini jer je bio osjetljiv na krv u urinu. Nakon što su potvrdili kancerogenost, zamijenjen je tetrametilbenzidinom (1).

Luminol ili 3-aminoftalhidrazin luminiscira nakon oksidacije u kiseloj ili alkalnoj otopini. Utvrđeno je da različita oksidacijska sredstva mogu uzrokovati luminiscenciju u alkalnoj

otopini, a pozitivni rezultati su primjećeni kako na starim tako i na svježim mrljama krvi. Luminol reagira na sličan način kao i prethodni testovi boje, gdje se luminol i oksidans nanose na mrlju od krvi. Luminol koji ima ulogu kromogena se pomiješa sa oksidansom (vodikovim peroksidom) te se popraska površina na kojoj se sumnja da postoji trag. Katalitička aktivnost hem skupine zatim ubrzava oksidaciju luminola, stvarajući plavo-bijelo odnosno žuto-zeleno svjetlo (ovisno o pripremi reagensa) gdje je prisutna krv. Ovaj test se mora odvijati isključivo u mračnoj prostoriji bez svjetla, te je to njegovo najveće ograničenje. Također, i kod ovog testa su moguće lažno pozitivne reakcije. Metali, izbjeljivači (sredstva za čišćenje) te biljni materijali dovode do reakcije. Uz to, luminol ima i kancerogena svojstva te izaziva iritacije dišnih puteva. Možda najveća prednost luminola je njegova osjetljivost. Sposoban je detektirati krv koja nije prisutna u dovoljnim količinama da se vidi golim okom. Njegova dodatna prednost je što ne ometa naknadne DNA analize te se može prskati izravno na sumnjive mrlje (12).

Leukomalahitski test (engl. Leucomalachite green – LMG) se koristi za otkrivanje latentnih tragova krvi. U ovom testu bezbojni LMG poprima malahit zelenu boju tako što dolazi do kataliziranja hemoglobina reakcijom između LMG-a i vodikovog peroksida u octenoj kiselini, a pomoću vodikova peroksida kao oksidansa. Zeleno obojenje je pozitivan rezultat odnosno upućuje na prisutnost krvi. Lažno pozitivni rezultati ne izostaju ni kod ovog testa, primjerice pri reakciji s visokooksidacijskim spojevima te ostacima biljnog materijala (6).

Fluoresceinski test se koristi za otkrivanje latentnih tragova krvi na raznim površinama. Fluorescein se priprema za upotrebu slično kao fenolftalein. Fluorescein se reducira u alkalnoj otopini preko cinka u fluorescein, koji se zatim primjenjuje na područje za koje se sumnja da sadrži krv. Katalitička aktivnost hema zatim ubrzava oksidaciju vodikovim peroksidom fluorescina u fluorescein koji će zatim fluorescirati kada se tretira ultraljubičastim svjetlom. Na popisu kancerogenih tvari je također i fluorescein. (6).

Najbolje se koristiti fluoresceinskim testom u ovim slučajevima:

1. Starije mjesto događaja
2. Nedavno mjesto događaja na kojem su vidljivi tragovi čišćenja radi skrivanja tragova i onemogućavanja njihova pronalaska
3. Zatvoreno ili otvoreno mjesto događaja na kojemu je zbog boje podloge teško uočiti tragove krvi
4. Vozilo pod sumnjom da je očišćeno radi prikrivanja i uklanjanja tragova krvi

5. Mjesto događaja na kojem je krv razrijeđena pod utjecajem kiše te više nije vidljiva
6. Odjeća žrtve i/ili osumnjičenika nakon pranja (1).

Tetrametilbenzidinski test (TMB) je posljednji u nizu preliminarnih testova za krv koji je izrazito osjetljiv. Također, smatra se da ima mogućnost obavljanja funkcije potvrdnog testa nakon provedbe preliminarnog testa fenolftaleinom. Prvo je potrebno navlaženi vateni štapić protrljati po krvnoj mrlji, zatim se dodaje jedna kap reagensa TMB, a nakon toga slijedi dodavanje jedne kapi vodikova peroksida. Pozitivnom reakcijom dolazi do promjene boje u tamnoplavu, a sve u samo nekoliko sekunda. Brisevi prethodno tretirani kozmetičkim tvarima mogu pridonijeti lažno pozitivnim rezultatima. Jedan od glavnih predstavnika testova čiji su temelji postavljeni na tetrametilbenzidinu je Combur test (6).

Budući da pozitivna reakcija koja se dobije uporabom dosad navedenih metoda ne upozorava na podrijetlo već samo upućuje na prisutnost krvi, potrebno je provesti i potvrdne metode koje se provode u laboratorijima. Još jedan od razloga zašto su potvrdne metode neizostavan korak je upravo zbog lažno pozitivnih rezultata koji su mogući kod preliminarnih testova.

Dobar potvrdni test treba imati najmanju mogućnost davanja lažno pozitivnih rezultata odnosno njegova glavna funkcija je upravo ta specifičnost. Nedostaci potvrdnih testova su najčešće cijena, zatim dugotrajnost te nužnost posjedovanja opreme za analizu. Najčešći potvrdni testovi za krv su kristalični testovi gdje spadaju Teichmannov i Takayamin test. Glavni nedostatak je veća količina uzorka koja je potrebna te se ne rabe prilikom ispitivanja male količine uzorka kako bi bilo dovoljno traga za daljnje postupke. Teichmannov test se temelji na izazivanju reakcije grijanjem osušenog traga u prisutnosti halida i ledene octene kiseline pri čemu dolazi do stvaranja hematina. Stvaranje smeđih romboidnih kristala označavaju da je test pozitivan. Takayamin test prilikom pozitivne reakcije daje trostruku potvrdu: promjenu boje, stvaranje kristala i vrpce vidljive pod spektroskopom. Postupak kod ovog testa je da se kap krvi stavi na mikroskopsko stakalce, zatim se doda otopina (piridin i šećer) te se zagrije. Nastaju kristali hemoglobina vidljivi ispod mikroskopa, a temelje se na reakciji piridina sa hemoglobinom(1).

Osim preliminarnih i potvrdnih testova na krv, postoje i testovi za sjemenu tekućinu i slinu. Analiza prisutnosti prostatskog enzima kisele fosfataze je temelj koji se koristi u preliminarnim testovima dokazivanja prisustva sjemene tekućine. Potvrdne ili laboratorijske metode za ispitivanje tragova sjemene tekućine mogu se podijeliti na analizu prisutnosti prostata specifičnog antigena (PSA) i na analizu pomoću mikroskopa s različitim metodama

bojenja. Kada govorimo o tragu sline koji se može naći na različitim predmetima poput cigarete ili čaše, orijentacijske metode se temelje na enzimatskoj aktivnosti amilaze, točnije α amilaze, a potvrdna metoda ne postoji (4).

1.4. Animalna forenzika

Analiza DNA životinjskih (animalnih ili nehumanih) uzoraka se dijeli na: forenzičnu entomologiju i forenziku kralježnjaka. Forenzična entomologija služi isključivo kao pomoćni alat u humanoj forenzici, proučava životinje koljena člankonožaca (Arthropoda) iz razreda kukaca (Insecta) te joj je glavni cilj doprinos određivanju vremena, uzroka, načina i mjesta smrti. Animalna forenzika kralježnjaka ima podjednaku primjenu kako u humanoj tako i u animalnoj forenzici na široj razini (4).

Kralježnjaci (ribe, ptice, vodozemci, gmazovi i ptice) se mogu u forenzičnim slučajevima pojaviti kao izvor dokaza u ove 3 glavne skupine:

1. Životinja kao svjedok (povezivanje osumnjičenog i žrtve ili povezivanje osumnjičenog s mjestom zločina)
2. Životinja kao žrtva
3. Životinja kao počinitelj (pri napadu na čovjeka) (3).

Mogu biti strvinari ljudskih trupla te razbacivati dijelove tijela odnosno odnositi ih u svoje jazbine. Određene egzotične životinje ukoliko se koriste kao kućni ljubimci mogu osim zastrašivanja imati i ulogu napadača te tako uzrokovati ozljede i na kraju smrt. Čest je slučaj zanemarivanja i zlostavljanja životinja koji je namjeren, a sve radi osobnog zadovoljstva. Poznate su i borbe životinja koje uvijek uključuju novac, drogu i oružje. Za otkrivanje droge i eksploziva na aerodromima, željezničkim postajama i slično koriste se psi jer imaju izrazit osjet njuha. Razni glodavci se podmeću u hranu, a sve kako bi dobili novac od tužbe proizvođača. I na kraju, najčešći problem, ilegalna trgovina životinja zbog privatnih zbirki, hrane, medicine i ukrasa. Zarada je glavni razlog, a moguća je zbog toga što se radi o rijetkim životinjama.

Kralježnjaci koji se najčešće proučavaju su:

1. Sisavci: psi i mačke te ostale češće domaće životinje (ovca, koza, govedo, svinja)
2. Ptice: kokoši i/ili purice, guske, patke i nojevi
3. Ribe: tuna, losos i kečiga (3).

Budući da životinje ostavljaju svoje tragove i na mjestu događaja i na počiniteljima, postaju izvor informacija od bitnog značaja za istražitelje različitih kaznenih djela. Ima jako puno opisanih slučajeva kada je upravo trag odnosno dokaz životinjskog podrijetla povezivao osumnjičenog sa mjestom zločina, a jedan od primjera je Snowball slučaj iz 1994. godine (3).

1.5. Seratec HemDirect test

Seratec HemDirect test je vizualni imunološki test za otkrivanje hemoglobina koji se koristi za brzu identifikaciju ljudske krvi u forenzičnim uzorcima. Od iznimne je važnosti znati je li biološki uzorak krvi ljudskog podrijetla prilikom forenzične istrage. Većina testova samo upućuje da se radi o krvi, te su potrebna dodatna ispitivanja da se odgovori na to pitanje, a samim time radi se o dugotrajnom, intenzivnom radu koji se izvodi u laboratoriju. Te probleme rješavaju imunotestovi, a jedan od njih je Seratec HemDirect test (13).

U ovom testu hemoglobin reagira s monoklonskim mišjim antitijelom antihumanog hemoglobina te se formira kompleks antigen-antitijelo u podlozi od vlakana, a sve to nakon što se doda uzorak. Kapilarni učinak membrane omogućava da se kompleks pomiče prema testnoj i kontrolnoj regiji. Na membrani u testnoj regiji je imobilizirano drugo monoklonsko mišje antitijelo antihumanog hemoglobina. Kada uzorak koji sadrži ljudski hemoglobin prođe kroz testnu regiju, kompleks antigen-antitijelo se veže na imobilizirano monoklonsko antitijelo te se stvara sendvič kompleks, antitijelo-antigen-antitijelo. Crvena linija u testnom području označava vezivanje i stvaranje ovog kompleksa. Uz to, test ima i unutarnju kontrolu koja sadrži imobilizirana poliklonska kozja antizečja antitijela na membrani u kontrolnoj regiji, a koja se vežu na zečja antitijela označena zlatom, a prisutna u podlozi od vlakana. Budući da ta antitijela međusobno izravno djeluju, uvijek će se stvoriti crvena linija u kontrolnoj regiji, neovisno o hemoglobinu. Valjanost testa određuje se prisustvom kontrolne linije (14).

Glavne značajke ovog testa su njegova visoka specifičnost te izvrsna osjetljivost, a jedna od prednosti je mogućnost korištenja testa na terenu, mjestu zločina. Također, ovaj test je jako jednostavan te nije potrebna prethodna obuka. Bitno je za naglasiti da je ovaj test izvorno razvijen za određivanje malih količina krvi u uzorcima stolice, a sve kako bi se rano detektirao rak debelog crijeva (13). Više riječi o samom testu i njegovoj primjeni biti će prikazano u nastavku rada kroz istraživački dio.

2. CILJ RADA

Prije upotrebe novog testa na tržištu provodi se validacija u forenzičnim laboratorijima, a sve kako bi se utvrdila njegova specifičnost i osjetljivost. Taj standardni postupak za Seratec HemDirect test je napravljen i objavljen, međutim uočeno je da se prilikom validacije koristila samo životinjska krv sisavaca a ne i drugih skupina kralježnjaka čija se krv može pronaći na mjestu događaja. Cilj ovog rada je, prateći sva pravila struke, provesti dodatnu validaciju i ispitati osjetljivost i specifičnost testa za krv te utvrditi postoje li životinjske vrste koje ne pripadaju sisavcima i čija krv daje lažno pozitivan rezultat na ovom testu koji bi trebao biti specifičan za krv primata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

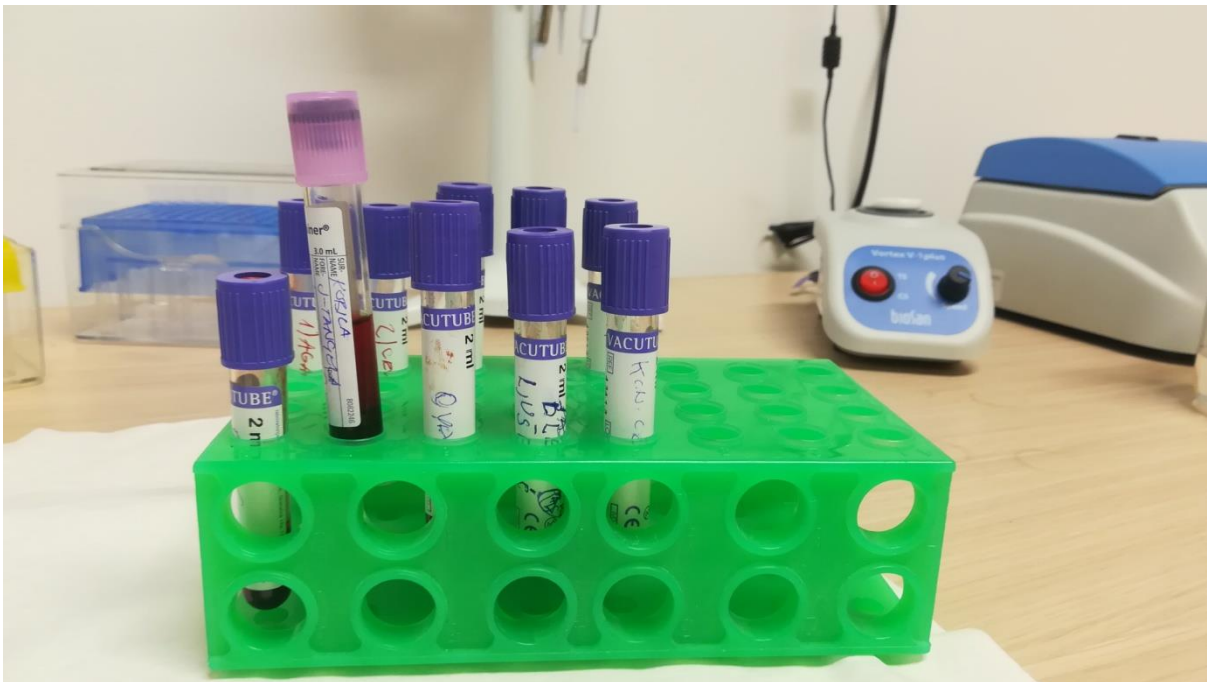
U ovom istraživanju obuhvaćeno je ukupno 10 uzoraka venske krvi prikupljene u epruvete s dodanim antikoagulansom EDTA. Svi uzorci prikupljeni su od strane stručnog veterinarskog osoblja, a izuzeti su od životinja s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu tijekom mjeseca rujna 2022. godine nakon čega su dopremljeni u Laboratorij za forenzičnu genetiku i biologiju na Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti, Sveučilišta u Splitu (slika 6).



Slika 6: Laboratorij za forenzičnu genetiku i biologiju Sveučilišnog odjela za forenzične znanosti u Splitu (izvor: autor)

Uzorci krvi životinja (slika 7) pripadaju ovim vrstama: Bradata agama (*Pogona vitticeps* A.), Crvenouha kornjača (*Trachemys scripta* WN.), Čančara (*Testudo hermanni* G.), Tigrica (*Melopsittacini undulatus* S.), Nimfa (*Nymphicus hollandicus* K.), Pijetao (*Gallus gallus domesticus* L.), Kobila (*Equus caballus* L.), Ovan (*Ovis aries aries* L.), Pas (*Canis lupus familiaris* L.) i Konj (*Equus caballus* L.). Radi lakšeg rada, uzorcima su dodijeljeni laboratorijski brojevi ovim redoslijedom:

1. Krv bradate agame
2. Krv crvenouhe kornjače
3. Krv čančare
4. Krv tigrice
5. Krv nimfe
6. Krv pijetla
7. Krv kobile
8. Krv ovna
9. Krv psa
10. Krv konja



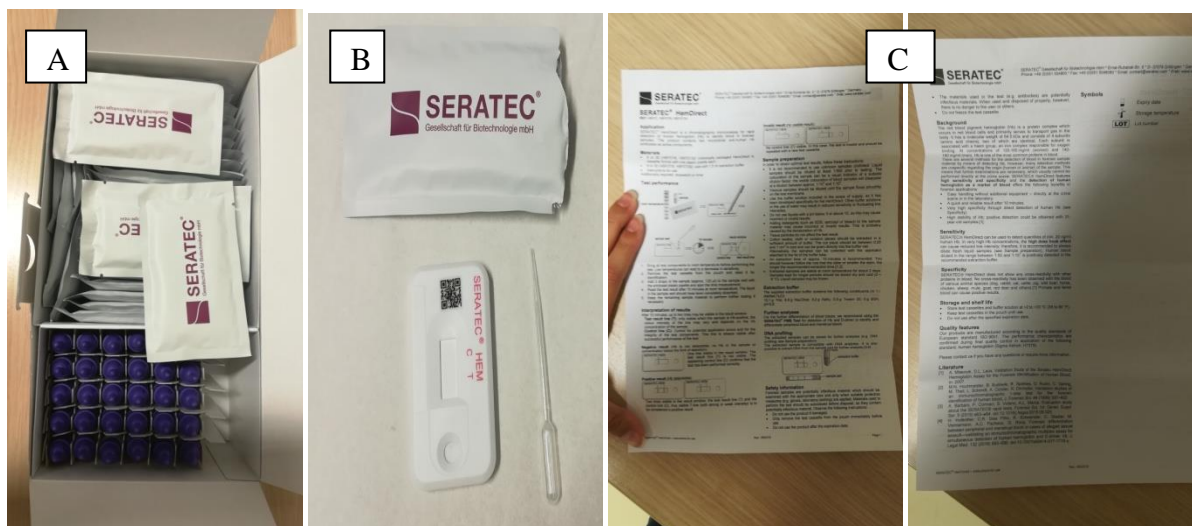
Slika 7: Uzorci krvi životinja (izvor: autor)

3.1.2. Laboratorijska oprema

Laboratorijski pribor i materijali koji su se koristili prilikom istraživanja su:

1. Seratec HemDirect test
2. Epruvete
3. Stalak za epruvete
4. Miješalica vortex
5. Dvostruko destilirana voda
6. Pipete različitih volumena
7. Nastavci za pipete
8. Pamučna bijela tkanina
9. Škare
10. Štoperica
11. Posuda za otpad
12. Eppendorf tubice
13. Venska krv

U kutiji Seratec HemDirect testa nalazi se 30 pojedinačno pakiranih testova od kojih svaki dolazi sa po jednom plastičnom kapalicom, zatim 30 epruveta s 1,5 ml pufera za ekstrakciju jedno uputstvo za korištenje (slika 8A, 8B, 8C).

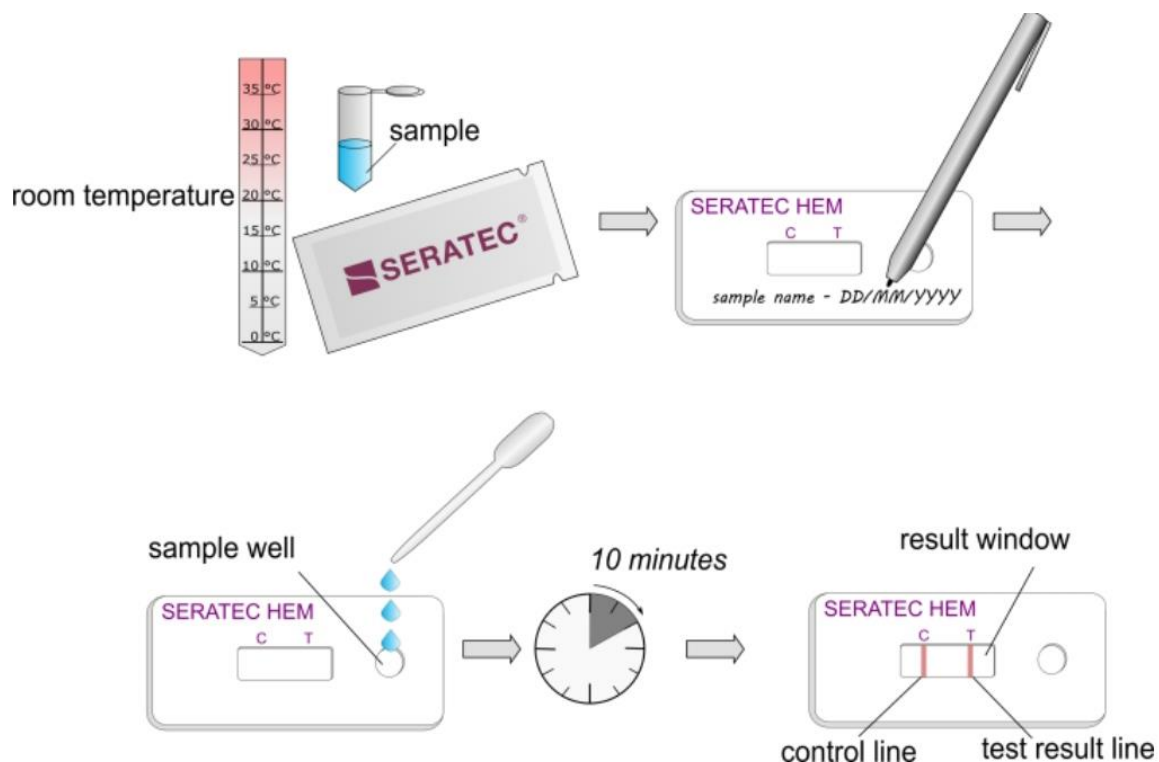


Slika 8: (A) Seratec HemDirect testovi i puferi, (B) Seratec HemDirect pločica i kapalica, (C) uputstvo za uporabu (izvor: autor)

3.2. Metode

Seratec HemDirect test služi brznoj identifikaciji ljudske krvi u forenzičke svrhe. Njegova detekcija se temelji na određivanju ljudskog hemoglobina u uzorku. Protein hemoglobin se nalazi u eritrocitima te ima ulogu prijenosa kisika u sve tjelesne stanice (15). Ovaj test koristi dva specifična monoklonska antitijela antihumanog hemoglobina kao aktivne komponente. Pomoću njega mogu se otkriti minimalne količine humanog hemoglobina koja iznosi 20 ng/ml. S druge strane, zbog visoke koncentracije hemoglobina će doći do pojave takozvanog „high dose hook effect“ koji se očituje u smanjenom intenzitetu linije. Kako bi se to izbjeglo, treba razrijediti uzorke. pH vrijednost uzoraka, ako je moguće, treba biti blizu neutralnog na pH ljestvici. Uzorci s pH manjim od 5 mogu izazvati lažno pozitivan rezultat testa, u alkalnom području je osjetljivost testa malo smanjena između 9 i 11, a kod pH vrijednosti 12 i više test nije funkcionalan. Na rezultate testa osim navedenog utječe i temperatura pri kojoj se provodi testiranje i osjetljivost testa je zajamčena samo ukoliko se test provodi na sobnoj temperaturi. Pad temperature na 8 °C dovodi do smanjenja osjetljivosti na 400 ng/ml. Nevažne ili netočne podatke može uzrokovati dodavanje deterdženata kao što su SDS, sarcosyl te izbjeljivač, a razlog tome je denaturacija hemoglobina. Pufer za ekstrakciju se sastoji od sljedećih sastojaka: 12,1 g Tris; 8,8 g Na₃Citrat; 0,2 g NaN₃; 0,5 g Tween 20; 5 g BSA; pH 6,8 je potrebno nadopuniti sa destiliranom vodom do 1000 ml (13).

Prilikom provođenja testiranja uzoraka sa Seratec HemDirect testom nužno je pratiti protokol testiranja uzoraka. Kao što je ranije navedeno, prije testiranja je važno sve komponente koje su potrebne za provođenje testa staviti na sobnu temperaturu. Sljedeći korak je da se izvade testne pločice iz pakiranja te se iste i označe radi identifikacije. Pomoću kapalice se zatim dodaju 3 kapi uzorka otopljenog u puferu (približno 120µl) u jažicu za uzorak te započinje mjerenje vremena. Potrebno je pričekati 10 minuta na sobnoj temperaturi te se nakon toga očitavaju rezultati testa. Dobro je sačuvati ostatak materijala uzorka radi eventualne potrebe za daljnjim istraživanjima (13). Koraci prilikom testiranja prikazani vizualno radi lakšeg snalaženja (slika 9).



Slika 9: Protokol testiranja po koracima (Izvor: Seratec HemDirect – Instruction for use. Seratec Gesellschaft fur Biotechnologie mbH, Ernst-Ruhstrat-Str. 5, D-37079 Gottingen, Germany, 2019.)

Rezultati koji se mogu dobiti se mogu podijeliti u tri skupine. Ukoliko bude samo jedna crvena crta koja se pojavila u kontrolnoj regiji (C) radi se o negativnom rezultatu. Rezultat može biti negativan zbog 2 razloga, ili nema hemoglobina u uzorku ili je hemoglobin ispod granice detekcije, a očituje se u nedostatku linije u području rezultata ispitivanja (T). Pozitivan rezultat znači da je hemoglobin otkriven te su vidljive dvije crvene linije u prozoru rezultata. Jedna u liniji rezultata ispitivanja (T), a druga kontrolna linija (C). Bitno je za naglasiti da nije bitan intenzitet T linije jer svakako označava pozitivan rezultat. Treći rezultat koji je moguće dobiti je nevažeći rezultat. Ukoliko se pojavi jedna vidljiva linija u prozoru rezultata te je to linija rezultata ispitivanja (T), a kontrolna linija se ne pojavi radi se o nevažećem testu te je potrebno ponovno testirati ciljni uzorak na novoj testnoj pločici. Može se reći da je kontrolna linija (C) kontrola za moguće pogreške jer ta linija mora biti uvijek vidljiva nakon uspješnog izvođenja testa.

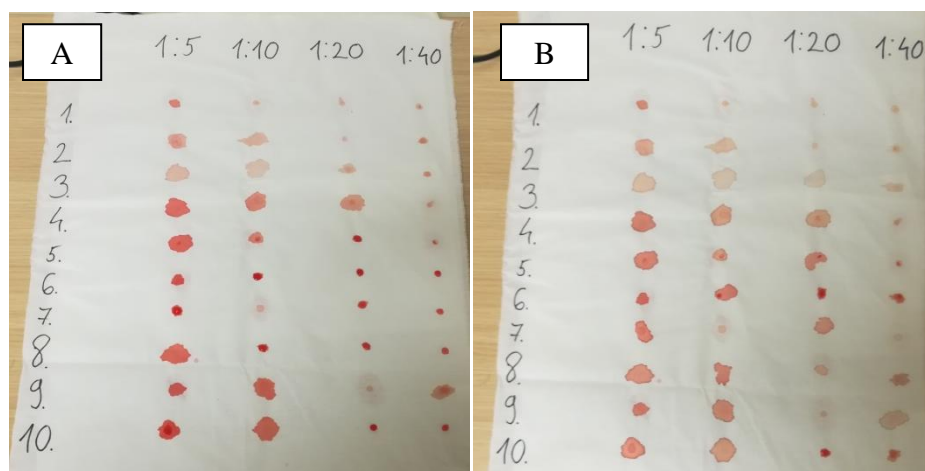
3.2.1. Priprema uzoraka i ispitivanje

Ispitivanje svih 10 prikupljenih uzoraka krvi je provedeno na način da se prvo pripreme razrjeđenja. Od uzoraka pune krvi pripremi se skup razrjeđenja u omjeru 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, a pomoću dvostruko destilirane vode (slika 10).



Slika 10: Prikaz razrjeđenja uzorka (izvor:autor)

Sljedeći korak uključuje upotrebu vortexa jer je uzorke potrebno kratko izmiješati te količinu uzorka od 50 μ L staviti na prethodno izrezanu i pripremljenu (obilježene vrijednosti) pamučnu bijelu tkaninu. Zatim slijedi sušenje na sobnoj temperaturi (slika 11A i 11 B).



Slika 11: (A) Uzorci prije sušenja, (B) uzorci nakon sušenja (izvor: autor)

Nakon što se uzorci osuše na sobnoj temperaturi slijedi rezanje 1/4 uzorka sa sterilnim škarama (dezinficirane 70% etanolom) te se komadić odrezane tkanine ubacuje u bočicu pufera iz Seratec HemDirect testa (slika 12). Potrebno je rezati od većeg razrjeđenja prema manjem. U puferu komad tkanine treba biti 30 minuta. Nakon isteka tih 30 minuta uzorci su spremni za analizu. Daljnji korak je dodavanje 3 kapi svakog uzorka u jažicu za ispitivanje te očitavanje rezultata, kao i njihovo bilježenje nakon 10 minuta.

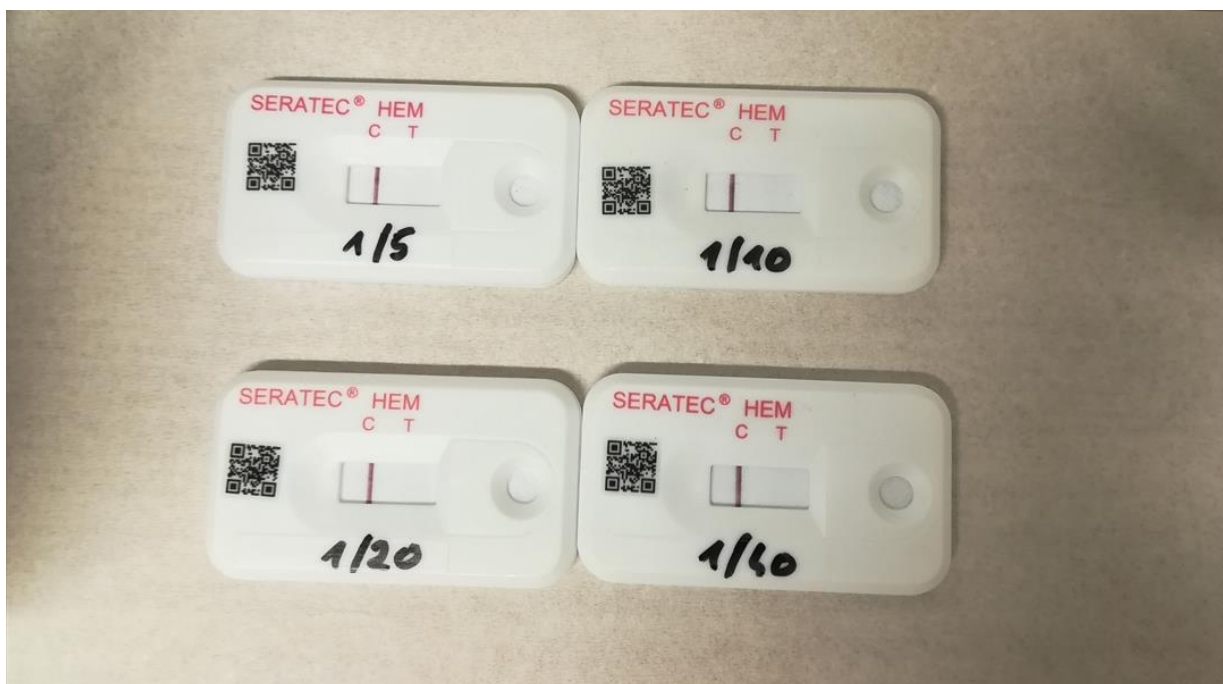


Slika 12: Uzorci koji se ekstrahiraju u HemDirect puferu (izvor: autor)

4. REZULTATI

Za potrebe ovog istraživanja analizirano je 10 različitih životinja, te je provedeno ukupno 40 testiranja. Ona uključuju razrjeđenja u omjeru 1/5, 1/10, 1/20 te 1/40, a testirana su Seratec HemDirect testom nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu te sušenja na sobnoj temperaturi. Svi testovi (testne pločice) su prethodno označeni kako ne bi došlo do zamjene. Prva znamenka označuje redni broj životinje pod kojim je stavljena, a druga znamenka označuje razrjeđenje.

Razrijeđena krv bradate agame (*Pogona vitticeps* A.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi bradate agame koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 13).



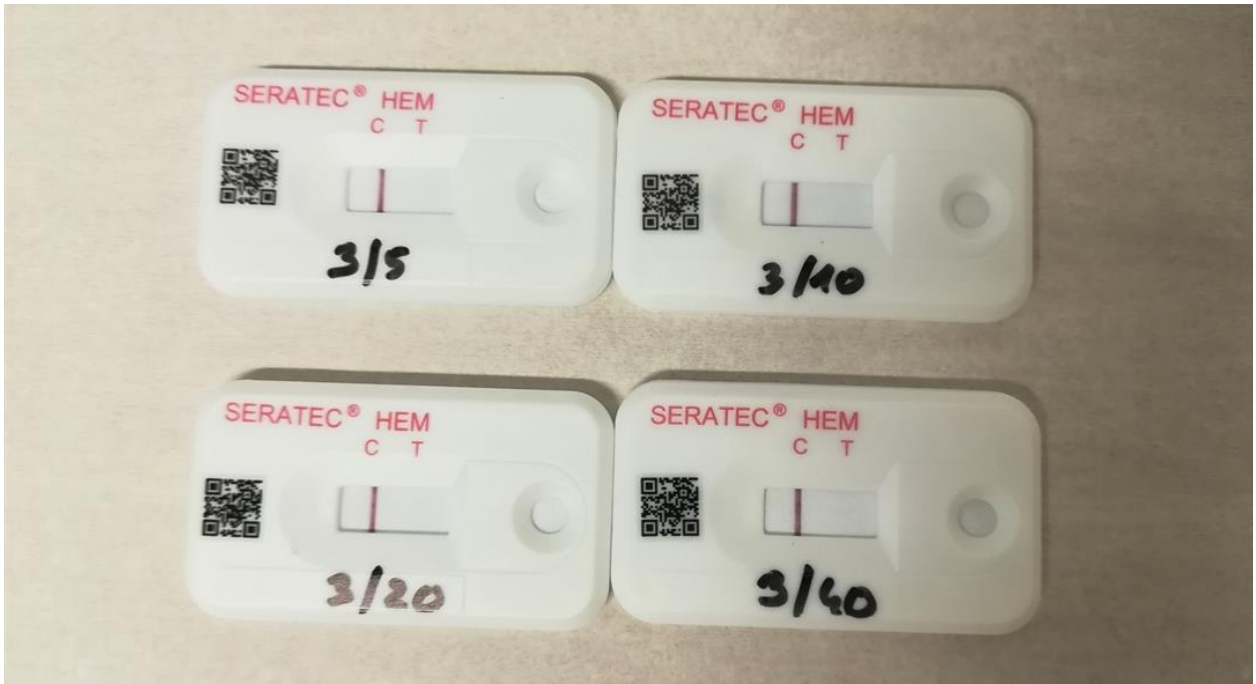
Slika 13: Rezultati testiranja uzoraka krvi bradate agame (izvor: autor)

Razrijeđena krv crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta* WN.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi crvenouhe kornjače koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 14).



Slika 14: Rezultati testiranja uzoraka krvi crvenouhe kornjače (izvor: autor)

Razrijeđena krv čančare (*Testudo hermanni* G.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi čančare koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 15).



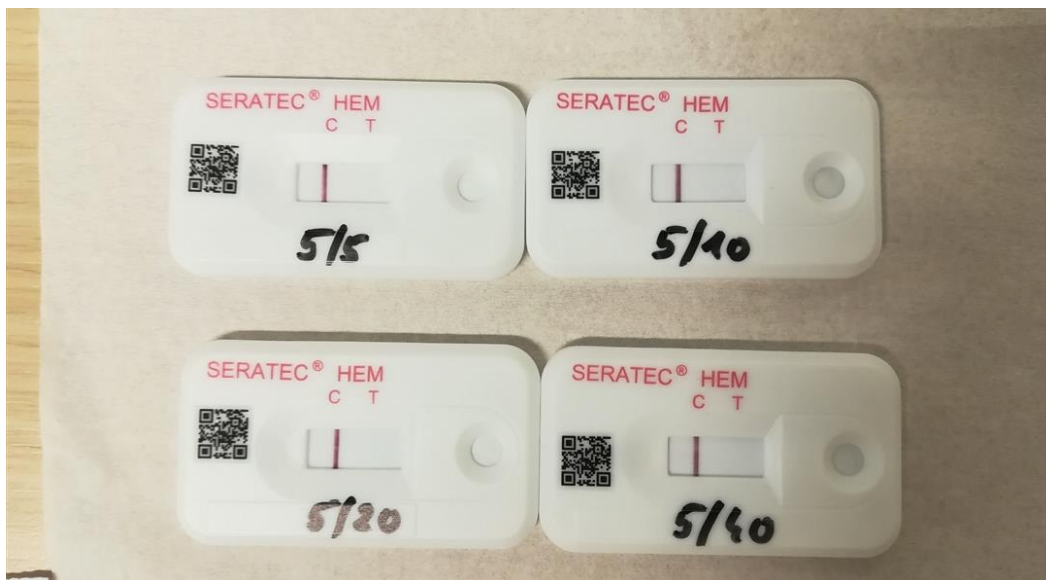
Slika 15: Rezultati testiranja uzoraka krvi čančare (izvor: autor)

Razrijeđena krv tigrice (*Melopsittacini undulatus* S.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi tigrice koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 16).



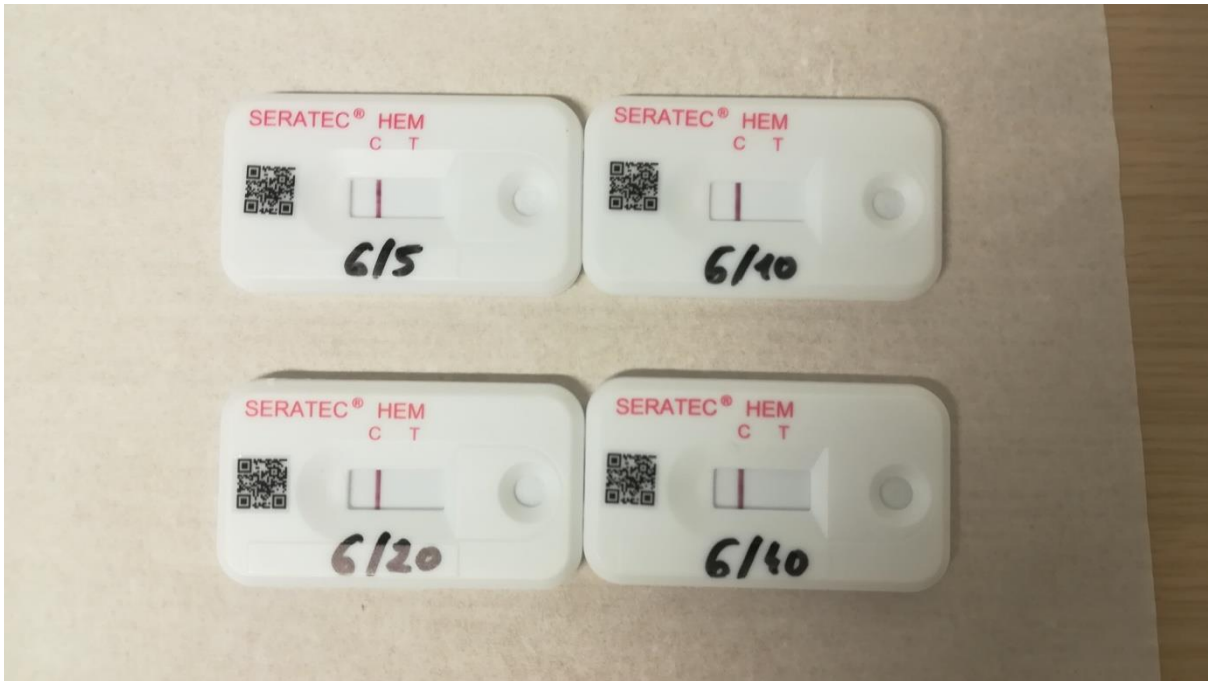
Slika 16: Rezultati testiranja uzoraka krvi tigrice (izvor: autor)

Razrijeđena krv nimfe (*Nymphicus hollandicus* K.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi nimfe koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 17).



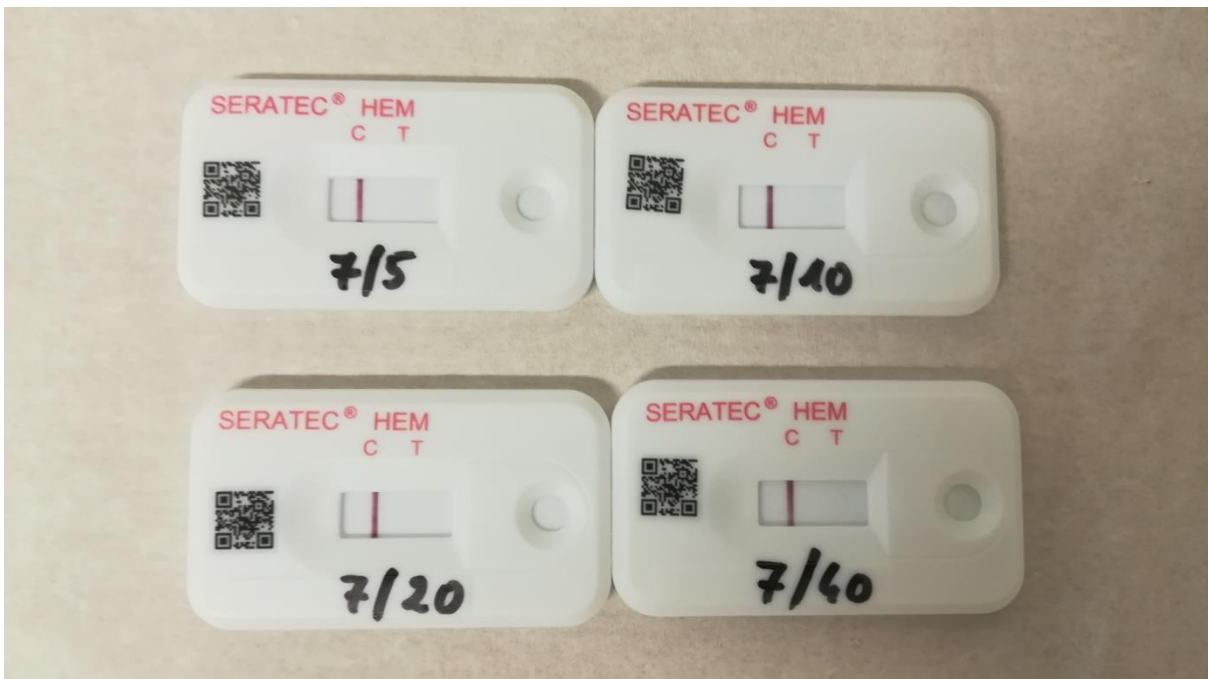
Slika 17: Rezultati testiranja uzoraka krvi nimfe (izvor: autor)

Razrijeđena krv pijetla (*Gallus gallus domesticus* L.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi pijetla koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 18).



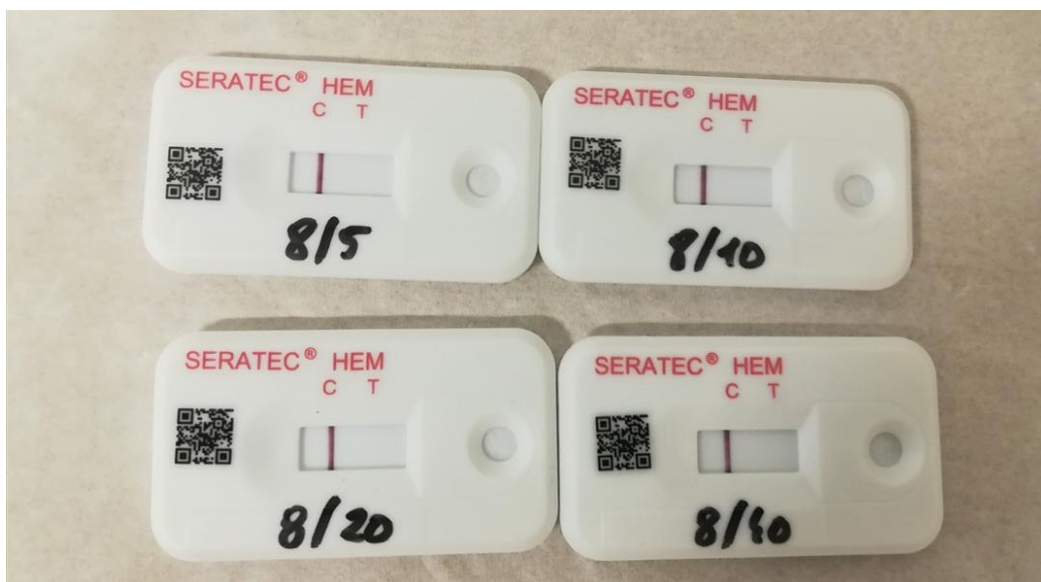
Slika 18: Rezultati testiranja uzoraka krvi pijetla (izvor: autor)

Razrijeđena krv kobile (*Equus caballus* L.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi kobile koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 19).



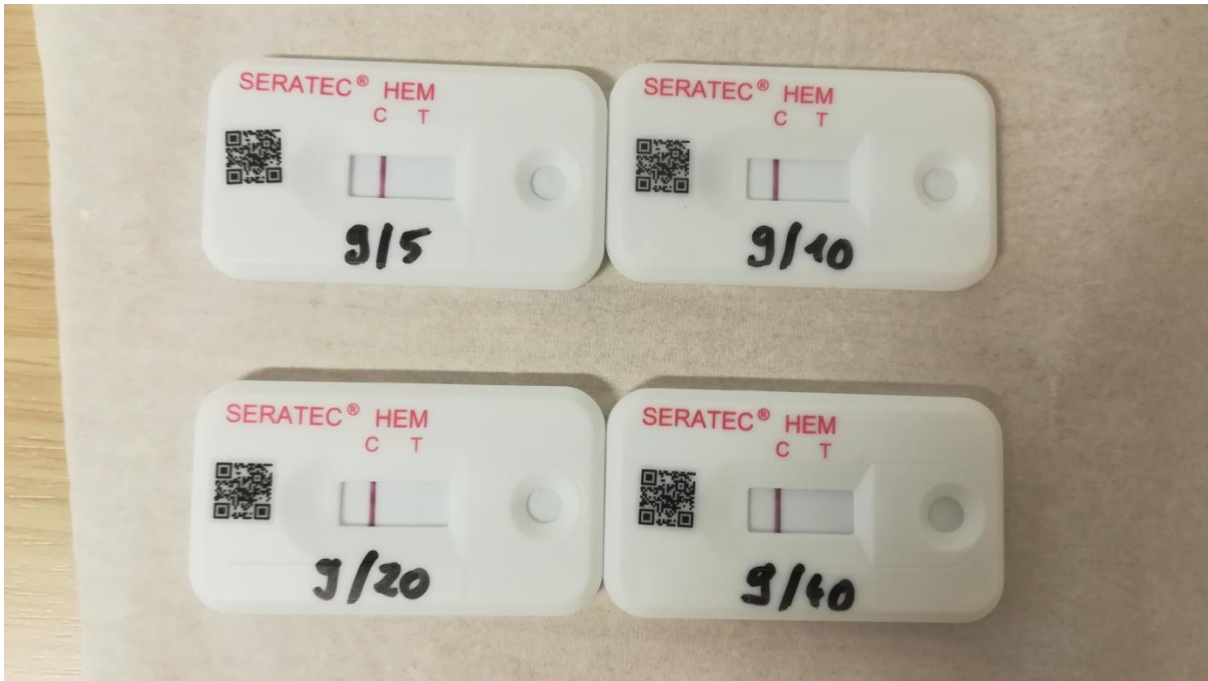
Slika 19: Rezultati testiranja uzoraka krvi kobile (izvor:autor)

Razrijeđena krv ovna (*Ovis aries aries* L.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi ovna koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 20).



Slika 20: Rezultati testiranja uzoraka krvi ovna (izvor: autor)

Razrijeđena krv psa (*Canis lupus familiaris* L.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi psa koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 21).



Slika 21: Rezultati testiranja uzoraka krvi psa (izvor: autor)

Razrijeđena krv konja (*Equus caballus* L.) je nakon nanošenja na bijelu pamučnu tkaninu i sušenja na sobnoj temperaturi testirana Seratec HemDirect testom. Provedena su ukupno 4 testiranja krvi konja koja su uključivala testiranje razrjeđenja 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Za sva 4 provedena istraživanja, testovi su pokazali negativan rezultat (slika 22).



Slika 22: Rezultati testiranja uzoraka krvi konja (izvor: autor)

Radi lakšeg snalaženja i preglednosti, u tablici su prikazani rezultati svih 40 testiranja Seratec HemDirect testom (tablica 2).

Tablica 2: Ukupni rezultati ispitivanja uzoraka Seratec HemDirect testom

UZORAK KRVI	RAZRJEĐENJA			
	1/5	1/10	1/20	1/40
BRADATA AGAMA	-	-	-	-
CRVENOUHA KORNJAČA	-	-	-	-
ČANČARA	-	-	-	-
TIGRICA	-	-	-	-
NIMFA	-	-	-	-
PIJETAO	-	-	-	-
KOBILA	-	-	-	-
OVAN	-	-	-	-
PAS	-	-	-	-
KONJ	-	-	-	-

5. RASPRAVA

Od velike pomoći za forenzičare su preliminarni i potvrdni testovi među koje pripada i Seratec HemDirect test. Jako je bitno da su potvrdni testovi točni, odnosno da su osjetljivi i specifični jer su od velike važnosti za daljnji tijek istrage. Kako bi se to postiglo i potvrdila njihova specifičnost potrebno je napraviti validaciju testa. Ovaj rad je nadopuna već napravljene validacije navedenog testa iz razloga što se u inicijalnom validacijskom istraživanju nisu obuhvatile sve skupine životinja. Točnije, obuhvaćeno je 26 različitih vrsta životinja, a sve pripadaju sisavcima (14). Istraživanje su proveli Misencik Amanda i Laux Dale L testom Seratec HemDirect te su uočili da je ovaj test specifičan za krv čovjeka i primata te da ima reaktivnost s krvlju tvora. Krvi životinja koje su pokazivale pozitivan rezultat nakon testiranja su: Gorila, Čimpanza, Orangutan i Tvor. Kod Sijamanga je crvena linija u području rezultata ispitivanja (T) bila slabo vidljiva.

Osim inicijalnog istraživanja, 2021. godine je provedeno još jedno istraživanje (16) koje je obuhvaćalo dodatnih 6 životinjskih vrsta koje nisu bile zastupljene u inicijalnom. Uključene su bile 2 vrste ptica. Kod tog istraživanja koje je provela Belobrajdić Mia, pri testiranju uzorka krvi Gačka (ptica) u razrjeđenju 1/8 nakon 15 minuta se pojavila slabo vidljiva linijarezultata ispitivanja (T) u prozoru rezultata te se upravo radi toga javila potreba za dodatnom validacijom koja bi uključivala i druge skupine životinja osim prvotnih sisavaca.

Istraživanje provedeno u ovom radu uključuje životinjske vrste koje nisu bile zastupljene u inicijalnom istraživanju, kao ni u istraživanju iz 2021. godine., a to su: Bradata agama (*Pogona vitticeps* A.), Crvenouha kornjača (*Trachemys scripta* WN.), Čančara (*Testudo hermanni* G.), Tigrica (*Melopsittacini undulatus* S.), Nimfa (*Nymphicus hollandicus* K.), Pijetao (*Gallus gallus domesticus* L.) i Pas (*Canis lupus familiaris* L.). Naglasak je bio na gmazovima i pticama.

Ukupno je provedeno 40 testiranja, koja uključuju razrjeđenja u omjeru 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40. Sva testiranja provedena su u skladu s preporukama proizvođača testa kako bi se izbjegle bilo kakve nepravilnosti.

Nakon razrjeđenja u omjerima 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 radi smanjenja koncentracije hemoglobina, ispitala se učinkovitost rada Seratec HemDirect testa. Uzorci su nanoseni na pamučnu bijelu tkaninu te su ostavljeni da se osuše, a sve to na sobnoj temperaturi. Testiranje

uzoraka razrijeđene krvi svih životinja u ovome radu nije dalo pozitivnih rezultata što je bilo i očekivano. Uzorci krvi koji su korišteni u istraživanju pripadaju vrstama životinja koje se sve češće pojavljuju kao kućni ljubimci i nije nemoguće pronalaženje i njihovih bioloških tragova na mjestu događaja. Ovo istraživanje smo proveli kako bi se potvrdila specifičnost testa i za ove uzorke jer u protivnom bi istražitelji na mjestu događaja morali znati da postoji mogućnost i lažno pozitivne reakcije ukoliko test pokaže pozitivan rezultat. Budući su svi testirani uzorci dali negativan rezultat možemo zaključiti da krv gmazova i ptica korištena u ovome radu ne reagira pri testiranju sa Seratec HemDirect testom.

6. ZAKLJUČAK

Preliminarni test Seratec HemDirect je specifičan za krv čovjeka i primata te se u ovome radu provela dodatna validacija ovog testa. Seratec HemDirect forenzični test nije reagirao na razrijeđenu krv životinja (bradata agama, crvenouha kornjača, čančara, tigrica, nimfa, pijetao, kobilica, ovan, pas i konj), te u ovome istraživanju nisu zabilježeni lažno pozitivni rezultati.

Samim time cilj ovog diplomskog rada je ostvaren. Test ima visoku specifičnost te je vjerodostojan. Gmazovi i ptice uključeni u ovo istraživanje nisu reagirali na testu. Još jedna potvrda da je test izuzetno točan te ne reagira na krv koja nije ljudska.

Upravo zbog njegove visoke osjetljivosti na ljudsku krv, a ne reagiranja na životinjsku, upotrebljiv je na mjestu događaja gdje se sa velikom pouzdanošću može ustanoviti da sporni trag pripada ljudskoj krvi, odnosno da trag nije ljudski ukoliko ne dođe do pozitivnog rezultata.

7. LITERATURA

1. Marenić S, Anđelinović Š, Kružić I, Bašić Ž. Forenzička analiza tragova krvi. Sveučilišni odjel za forenzične znanosti; 2021. p. 33-38, 131-148
2. Ministarstvo unutarnjih poslova, Ravnateljstvo policije, Priručnik za kriminalističke tehničare; verzija 1, 2010. p. 64-75
3. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Medicinska naklada; 2008. p. 79-83, 183-194
4. Marjanović D, Primorac D, Dogan S. Forensic genetics. Theory and application. International Burch University, 2018. p. 25, 81-87, 238-242
5. Struna. Hrvatsko strukovno nazivlje. Pojam: Centrifugiranje. Dostupno na: <http://struna.ihjj.hr/naziv/centrifugiranje/3329/>
6. 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. 48-56, 349-368
7. Raven PH, Johnson GB, Losos J, Singer S. Biology. 7th edition, 2005. p. 911-934
8. Enciklopedija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Pojam: Eritropoeza. Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=18283>
9. Struna. Hrvatsko strukovno nazivlje. Pojam: Validacija. Dostupno na: <http://struna.ihjj.hr/naziv/validacija/8718/>
10. 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>
11. 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
12. Gunn A. Essential forensic biology. John Wiley & Sons; 2009 Mar 18. p. 48-51
13. Product Literature. Seratec HemDirect Hemoglobin Assay. Seratec Diagnostica Gesellschaft für Biotechnologie mbH, 2004; Str. 5, D-37079 Dostupno na: https://www.seratec.com/docs/user_instructions/hbf07_en.pdf
14. Misencik A, Laux DL. Validation study of the seratec hemdirect hemoglobin assay for the forensic identification of human blood. *MAFS Newslett*, 2007; 36(2), p. 18-26. Dostupno na: https://www.seratec.com/docs/HemDirect_Validation_MAFS.pdf

15. Mader SS. Essential of biology. Mc Graw Hill; 2007; p. 38
16. Belobrajdić M. Validacija preliminarnog testa na krv [diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti; 2021. Dostupno na: <https://dabar.srce.hr/en/islandora/object/forezikast%3A147>

8. SAŽETCI

Osjetljivost i specifičnost Seratec HemDirect testa na krv životinja koje nisu sisavci

Cilj: Cilj ovog rada je bio provesti dodatnu validaciju Seratec HemDirect testa odnosno ispitati osjetljivost i specifičnost testa za krv te utvrditi postoje li životinjske vrste čija krv daje lažno pozitivan rezultat na ovom testu koji bi trebao biti specifičan za krv primata.

Metode: Istraživanje je obuhvatilo 10 uzoraka venske krvi životinjskih vrsta. Testom Seratec HemDirect su analizirani svi uzorci krvi. Iz pune krvi dodavanjem dvostruko destilirane vode su pripremljena razrjeđenja (1/5, 1/10, 1/20, 1/40). Nakon toga su uzorci svakog razrjeđenja volumena 50 μ L stavljani na bijelu pamučnu tkaninu te sušeni na sobnoj temperaturi. Zatim je slijedilo rezanje 1/4 uzorka koji se ekstrahirao u puferu 30 minuta. Poslije ekstrakcije potrebno je nakapati tri kapi svakog uzorka u jažicu za ispitivanje te pričekati 10 minuta kada se rezultati očitavaju i bilježe.

Rezultati: U analiziranim uzorcima razrijeđene krvi svih životinjskih vrsta, Seratec HemDirect test je pokazao negativne rezultate.

Zaključak: Seratec HemDirect test je pouzdan preliminarni test koji pokazuje visoku osjetljivost na ljudsku krv, te na životinjsku ne reagira. Upotreba ovog testa u forenzici može biti od velikog značaja za daljnji tijek istrage.

Ključne riječi: osjetljivost, specifičnost, krv, preliminarni test, Seratec HemDirect

ABSTRACT

Sensitivity and specificity of Seratec HemDirect Test on nonmammalian blood

Aim: The aim of this study was to further validate the Seratec HemDirect test, test the sensitivity and specificity of the blood test and determine if there are any animal species whose blood gives false positive results on this test which should be specific to primate blood.

Methods: The study included 10 samples of venous blood of animal species. Seratec HemDirect tested all blood samples. Dilutions have been prepared from the whole blood by adding double distilled water (1/5, 1/10, 1/20, 1/40). After that, samples of each 50 μ L dilution were placed on a white cotton fabric and dried at room temperature. Then followed by the cutting of 1/4 of the sample, which was extracted in the buffer for 30 minutes. After extraction three drops of each sample should be added into the test well and wait 10 minutes before the results are read and recorded.

Results: In the analyzed samples of diluted blood of all animal species, Seratec HemDirect test showed negative results.

Conclusion: Seratec HemDirect test is a reliable preliminary test that shows high sensitivity to human blood and does not respond to animal blood. The use of this test in forensics can be of great importance for the further course of the investigation.

Keywords: sensitivity, specificity, blood, preliminary test, Seratec HemDirect

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Antonija Svetina

Datum rođenja: 18. veljače 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

Email: svetina.antonija@gmail.com

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

Fakultet: - Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Diplomski studij

Forenzike, modul Forenzična kemija i molekularna biologija (2020.-2022.)

- Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Razlikovni modul
Forenzika (2020.)

- Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, Preddiplomski stručni studij Medicinsko
laboratorijske dijagnostike (2015.-2019.)

Srednja škola: XI. gimnazija, Zagreb, Hrvatska (2011.-2015.)

Osnovna škola: OŠ braće Radić, Zagreb, Hrvatska (2003.-2011.)

10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Antonija Svetina, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom Osigurnost i specifičnost seratec HemDirect testa na krv životinja koje nisu sisavci

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 uredenoga rada.

Split, 15.09.2022.

Potpis studenta/studentice: Antonija Svetina