

# Laboratorní zkoumání biologických stop v soudním lékařství

MUDr. Libor Bauer  
doc. MUDr. Alexander Pilin, CSc

# Identifikace stopy biologického původu

Jedná se o stopu lidského původu?

– Odkud stopa pochází?

- Krev
- Sperma
- Sliny
- Moč
- Plodová voda
- Stolice

# SKVRNY OD KRVE

- **Určení, zda jde o krev (důkaz krve)**  
(orientační zkoušky a specifické krystalografické metody)
- **Určení druhové příslušnosti**  
(důkaz lidské bílkoviny)
- **Stanovení krevní skupiny**  
(ABO systém, Rh systém, MN systém, apod.)
- **Stanovení původu krve**  
(menstruační krev, těhotenská krev, novorozenecká krev)

# Důkaz krve

- **Nespecifický** (orientační)
  - **Chemiluminiscenční** reakce s luminolem (ke zviditelnění latentních stop)
  - **Peroxidázová reakce**

hemová skupina hemoglobinu má peroxidase podobnou aktivitu, která katalyzuje štěpení  $H_2O_2$ . Oxidační produkty pak reagují s celou řadou látek (benzidin, fenolftalein, orthotolidin atp.) za změny jejich barvy.
  - **Detekční papírky**

Nevýhodou těchto zkoušek je, že mají různou průkazní hodnotu a mohou poskytovat falešně pozitivní výsledek

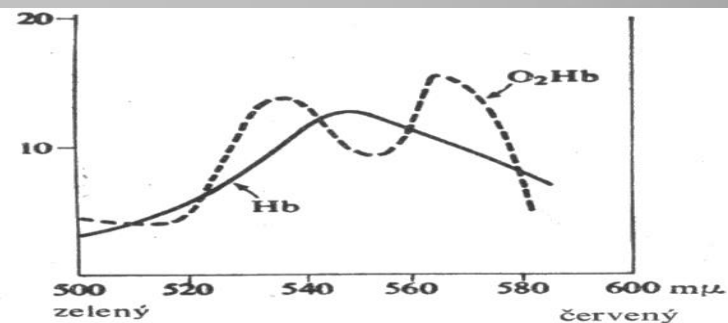
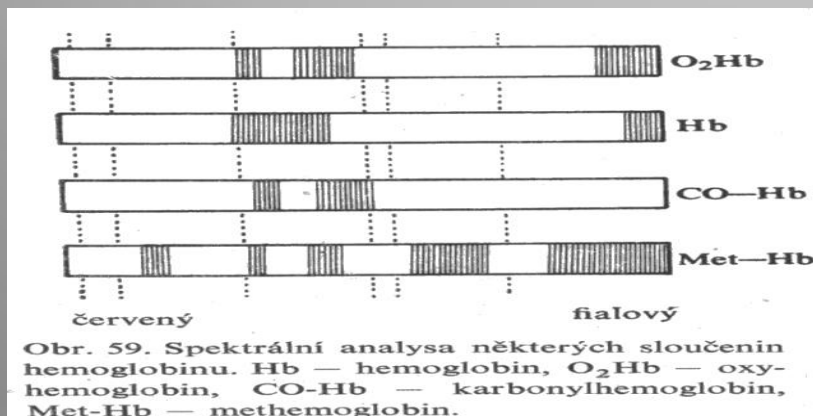


# Důkaz krve

- **Specifický:**
  - Krystalografické metody:
    - Bertrandova metoda – vznik krystalů acetchlorheminu
    - Takayamova metoda: vznik krystalů hemochromogenu

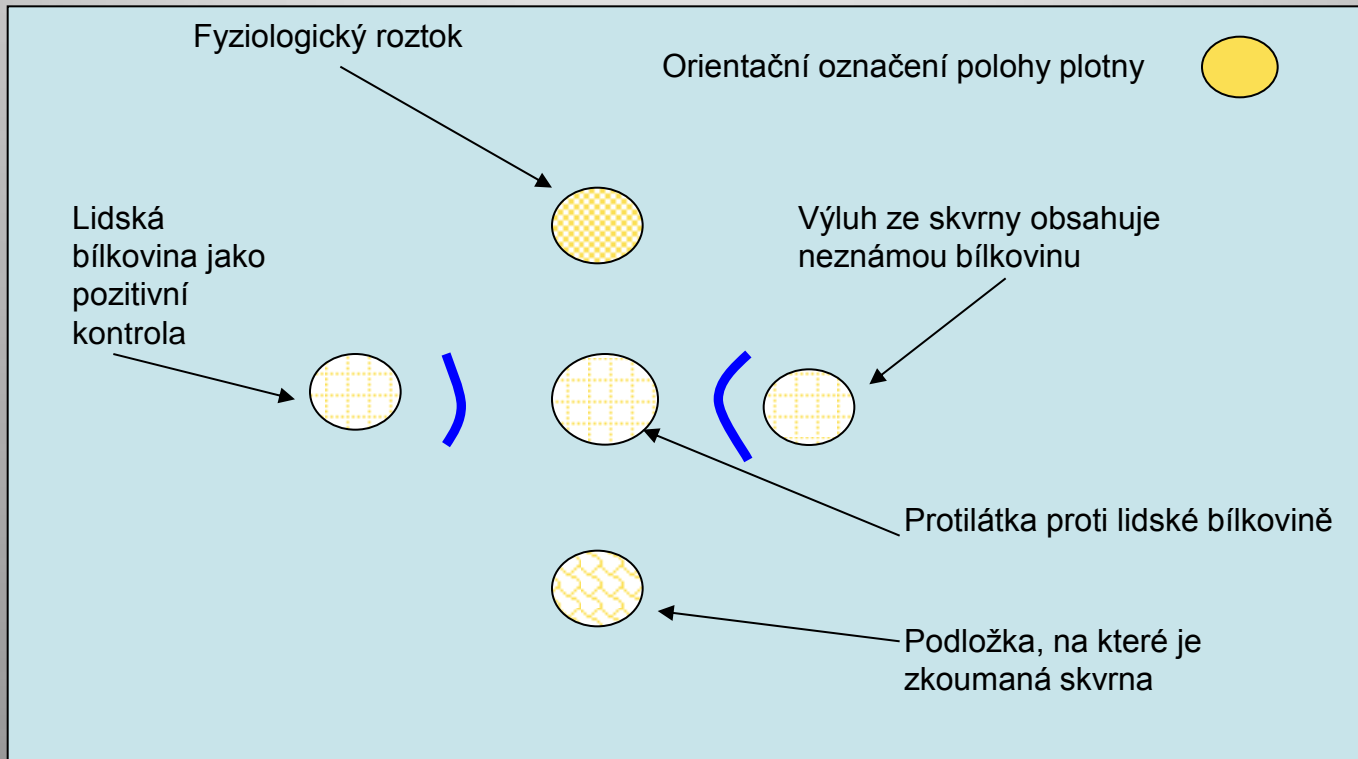


Spektroskopická metoda: spektrální čára hemoglobinu

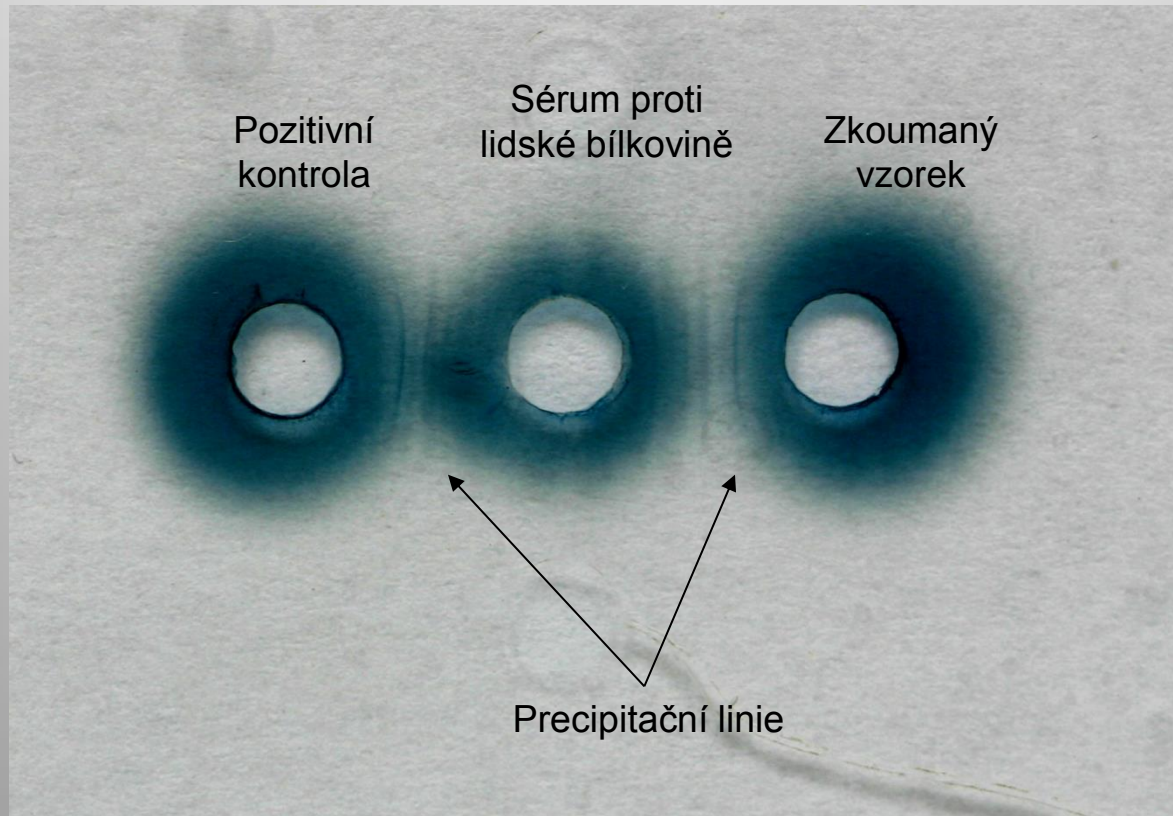


# Důkaz lidské bílkoviny

- Imunodifuze (Ouchterlony) na agaru



# Důkaz lidské bílkoviny



Barvení amidočerní.



# Krevní skupiny

Na membránách erytrocytů jsou aglutinogeny:

- 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.\*

*\* Lépe řečeno - netvoří se aglutinogen (antigen) A nebo B. Nalézt zde však můžeme tzv antigen H, což je vlastně prekursor pro antigen A i B. V některých textech je proto skupina 0 nazývána skupinou H.*

V krevní plazmě jsou naopak obsaženy bílkovinné protilátky zvané aglutininy (anti-A, anti-B).

- 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 (tj. anti-A i anti-B).

# Krevní skupiny

- Aglutinace na destičce:

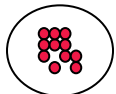
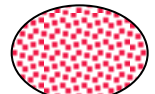
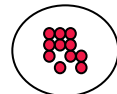
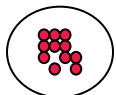
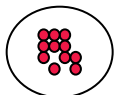
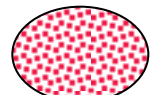
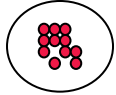
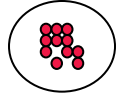
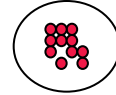
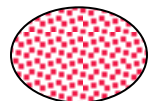
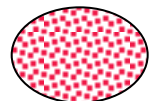
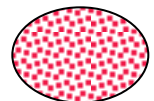
Plná krev – princip:

reakce neznámého  
antigenu se známým  
aglutininem

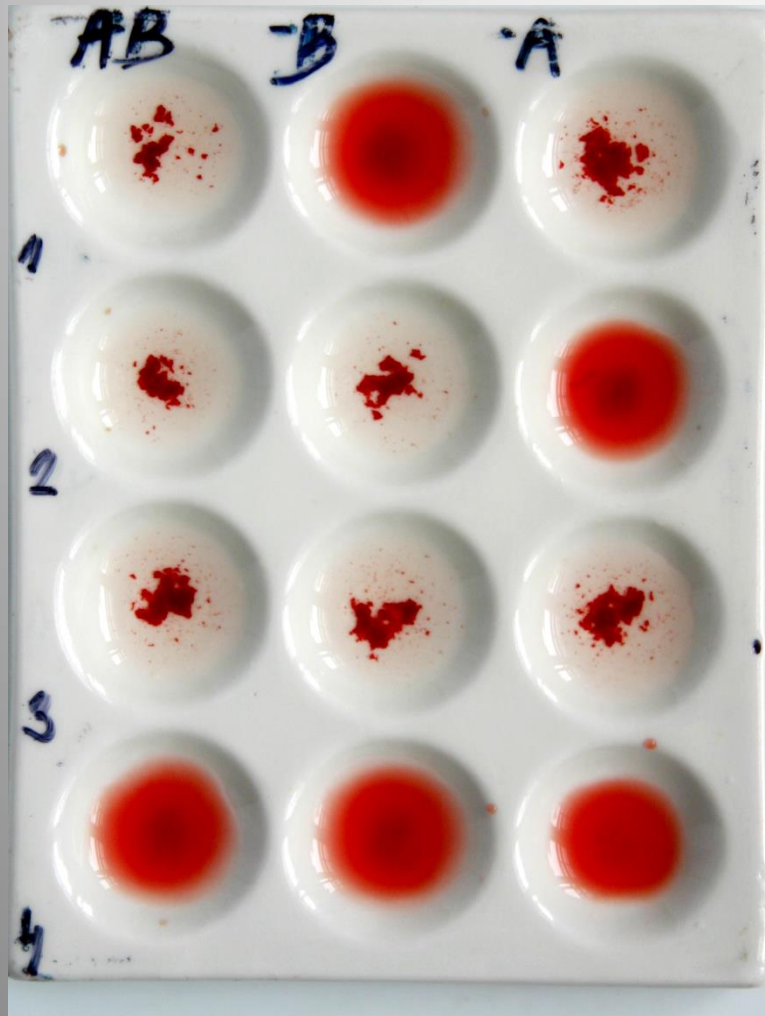
K několika kapkám plné krve (tj. neznámé krevní skupiny) přidáme malé množství známého antiséra.

Výsledek: vznikne-li aglutinát

v jamce s příslušným anitsérem, je prokázána krevní skupina odpovídající antiséru tj. krvinky neznámé krve jsou shlukovány (aglutinovány) známými protilátkami.

aglutinace			výsledek
AB	B	A	
			A
			B
			AB
			0

# Aglutinace na destičce:



Výsledek

A

B

AB

0

# Určení krevní skupiny ve zkumavce

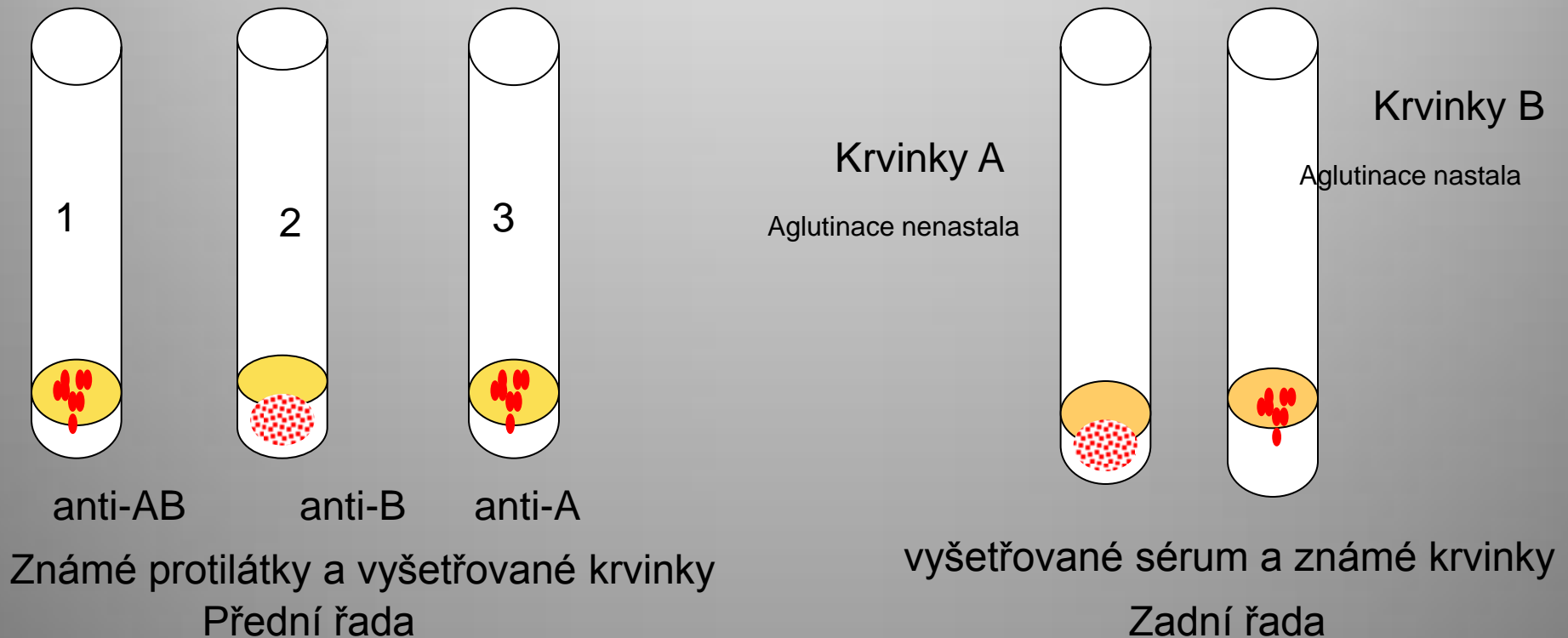
Princip: vyšetřovaná krev se centrifigací rozdělí na sérum a krvinky. Jedná se o reakci známé protilátky proti neznámému krvinkovému antigenu.

Vyšetření vzorku provádíme v tzv. přední a zadní řadě zkumavek:

Přední řada obsahuje obsahuje známé protilátky (z kitu) a vyšetřované krvinky.

Zadní řada obsahuje vyšetřované sérum a známé krvinky (např. hematologické laboratoře).

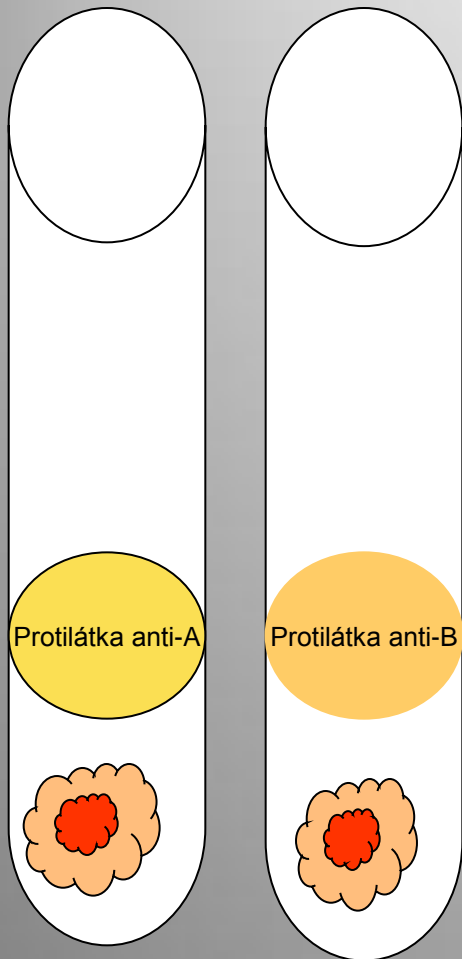
## Příklad průkazu krevní skupiny A



# Vyšetření krevních skvrn

- Pro vyšetřování krevních skvrn se používají:
- metoda vysycovací dle Therkelsena
- metoda absorpčně-eluční
- metoda smíšené aglutinace (užívaná pouze ve speciálních případech, když je velmi málo materiálu)

# Vyšetření krevních skvrn metodou vysycovací



1. Podložku se skvrnou je třeba rozdělit na dvě části.
2. Převrstvení skvrny protilátkou o známém titru (stanoví se v laboratoři před vyšetřením).
3. Inkubace – čas závisí na povaze vyšetřovaného materiálu (nejčastěji přes noc při pokojové teplotě).

## **Princip:**

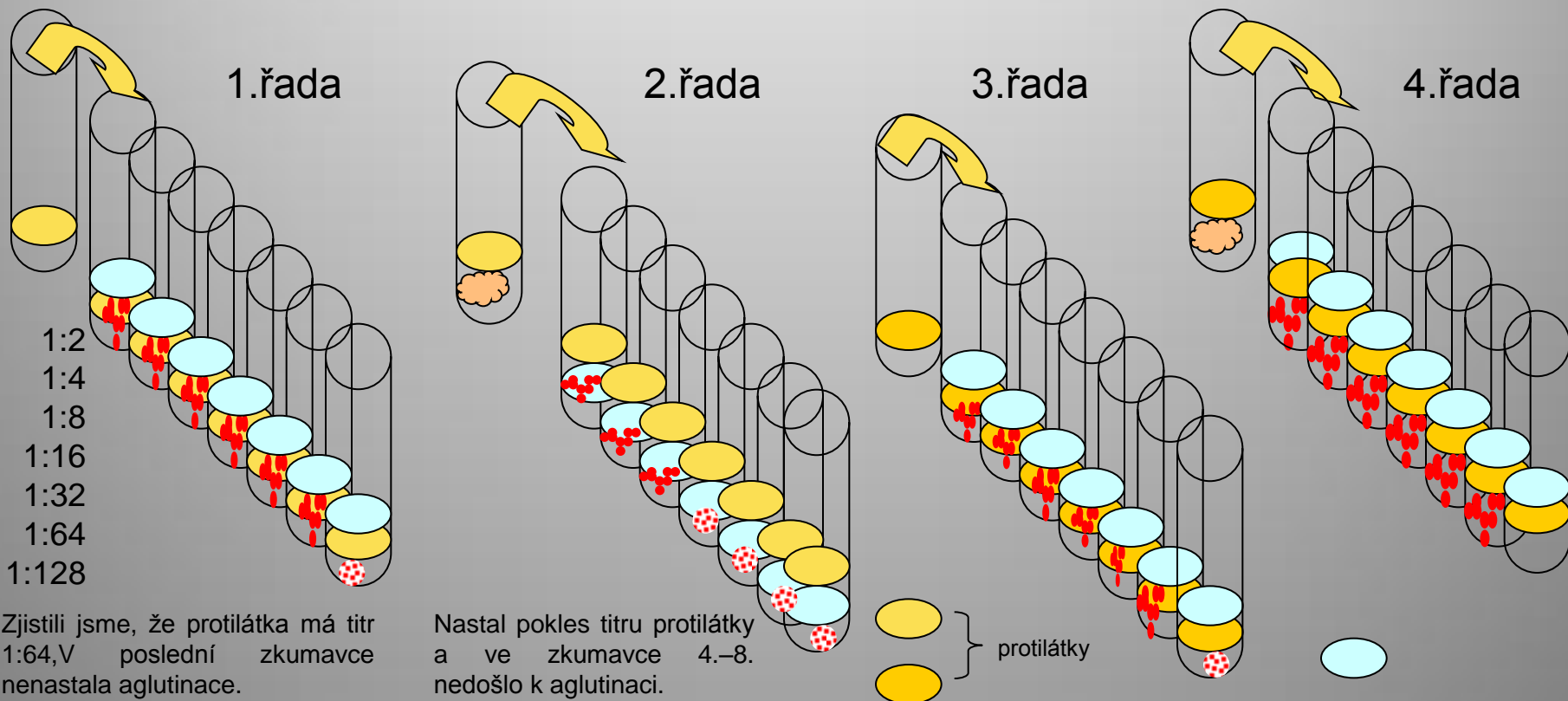
**Reakcí antigen-protilátka se sníží koncentrace protilátky.**

**První řada:** 1. zkumavka obsahuje pouze protilátku (anti-A). 2. – 8. zk. obsahuje 0,1 ml F roztoku. V prvním kroku přeneseme 0,1 ml protilátky anti-A do zkumavky č. 2, a v dalších krocích odbereme postupně 0,1 ml a přeneseme do dalších zkumavek. Po roztitrování přidáme 0,1 ml příslušných krvinek (v tomto případě A). Zjistili jsme, že protilátka má titer 1:64, V poslední zkumavce nenastala aglutinace.

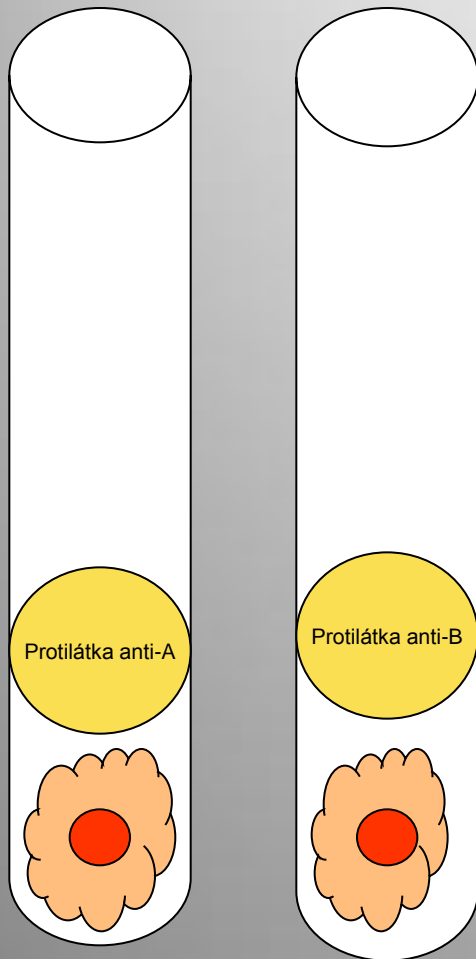
V **druhé řadě** postupujeme obdobně jako v první, s tím rozdílem že v první zkumavce je vyšetřovaná skvrna, převrstvená protilátkou anti-A. Pokud skvrna obsahuje antigen A, dojde k vysycení příslušné protilátky. Vzhledem k tomu, že v druhé řadě došlo k poklesu titru o tři zkumavky, došlo k vysycení příslušné protilátky anti-A a jedná se tedy o skupinovou vlastnost A.

**Třetí řada:** 1. zkumavka obsahuje pouze protilátku anti-B. 2. – 8. zk. obsahuje 0,1 ml F roztoku. V prvním kroku přeneseme 0,1 ml protilátky anti-B do zkumavky č. 2, a v dalších krocích odbereme postupně 0,1 ml a přeneseme do dalších zkumavek. Po roztitrování přidáme 0,1 ml příslušných krvinek tj. B. Zjistili jsme, že protilátka má titer 1:64, V poslední zkumavce nenastala aglutinace.

Ve **čtvrté řadě** postupujeme obdobně jako v třetí s tím rozdílem, že v první zkumavce je vyšetřovaná skvrna, převrstvená protilátkou anti-B. Pokud skvrna obsahuje antigen A, nedojde k vysycení příslušné protilátky. Vzhledem k tomu, že ve čtvrté řadě nedošlo k poklesu protilátky anti-B, lze z toho usuzovat, že se skupinu B nejedná.



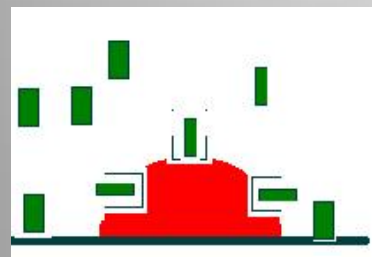
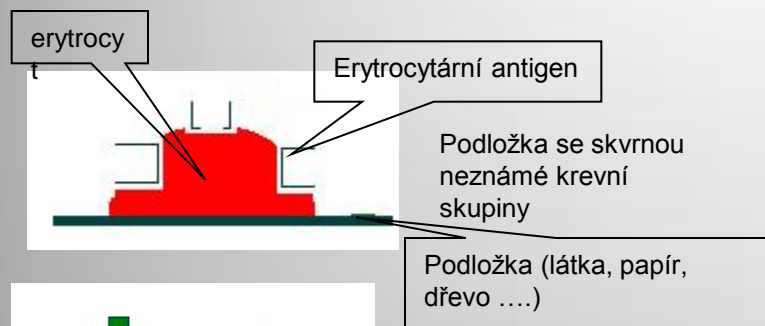
# Vyšetření krevních skvrn metodou absorpčně-eluční



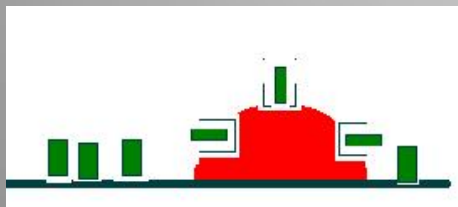
1. Před započítáním práce je třeba podložku se skvrnou rozdělit na dvě části. Převrstvení skvrny protilátkou o známém titru (stanoví se v laboratoři před vyšetřením).
2. Inkubace – čas závisí na povaze vyšetřovaného materiálu (nejčastěji přes noc při pokojové teplotě).
3. Ve třetím kroku odsajeme protilátku a skvrnu opakovaně propíráme ledovým fyziologickým roztokem. Tím skvrnu zbavíme protilátek navázaných na podložce (např. látce).
4. Po promytí a inkubaci při 56°C (tzv. eluce – teplená fáze) dojde k uvolnění specificky navázaných protilátek, které po přidání příslušných krvinek vedou v pozitivním případě k aglutinaci.



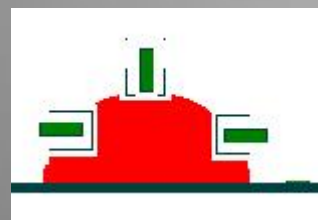
# Princip absorpčně-eluční metody



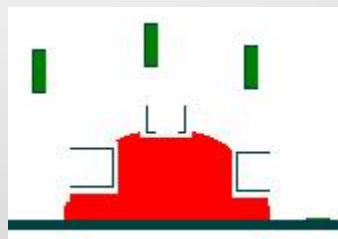
1. Skvrna na podložce se převrství známou protilátkou (např. **anti-A**) a inkubuje se obvykle přes noc.



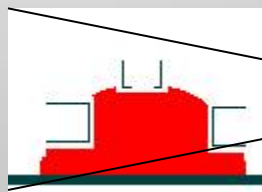
2. Dojde k reakci antigen-protilátka. Po inkubaci se odstraní přebytek protilátky. Na podložce však zůstává protilátka nenavázaná („vsáknutá“) do podložky.



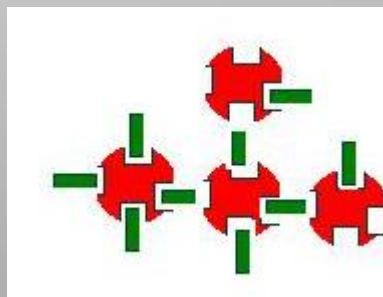
3. Opakovaným promytím ledovým roztokem fyz. roztoku se odstraní protilátka z podložky. Zůstává pouze specificky navázaná protilátka na antigen.



4. Vzorek se převrství minimálním množstvím množství fyziologického roztoku. Zahřátím vzorku v termostatu při 56°C se uvolní vazba antigen-protilátka a protilátky přejdou do fyz. roztoku, který odsajeme a převedeme do zkumavky. .



5. Zůstane podložka s navázaným antigenem, se kterou již **nepracujeme**.

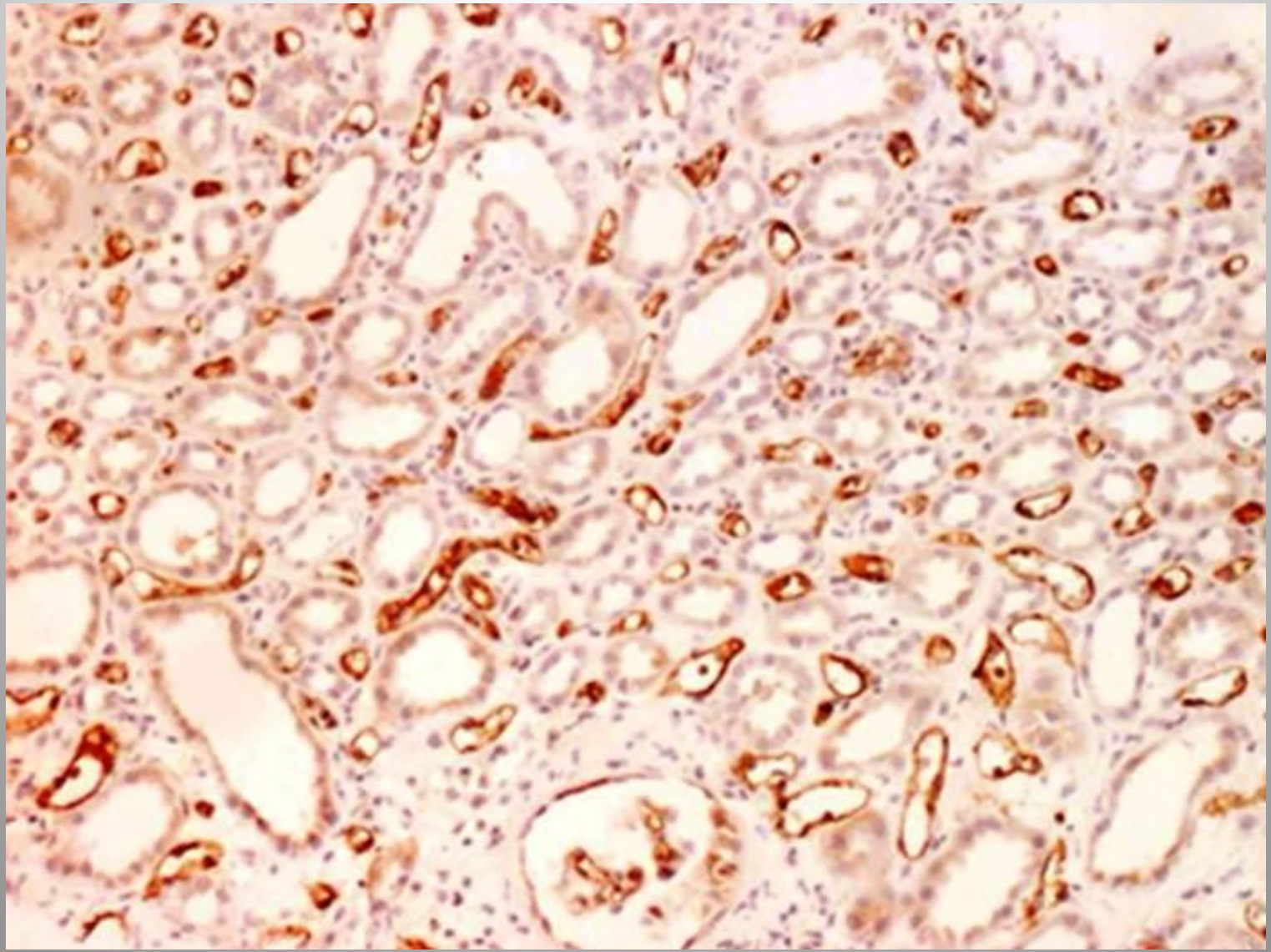


6. Do zkumavky s fyz. roztokem s uvolněnými protilátkami (v tomto případě anti-A) přidáme krvinky se skupinovou vlastností A. Nastane aglutinace a tím bylo prokázáno, že skvrna na podložce má skupinovou vlastnost **A**.

# Vyšetření krevní skupiny imunohistochemicky - histotest

V případech kdy nelze odebrat krev  
(rozsáhlá traumatická devastace nebo  
hnilobná dekompozice)

Aglutinogeny přítomny též na endotelu



# Menstruační krev

- Průkaz lze provést mikroskopicky
- Barvením glykogenu obsaženého v poševních buňkách
- Stanovením fibrinolyzinu

# Těhotenská krev

- Těhotenské testy (imunoanalýza s využitím specifických protilátek)
- Jde o kvalitativní detekci lidského choriogonadotropinu
- Též pro stanovení těhotenské moči

# Krev plodová, novorozenecká, kojenecká

- Detekce alfa-1-fetoproteinů (koncentrace dosahuje maxima mezi 11.-14. týdnem nitroděložního života, nevyskytuje se u dětí starších 6-7 měsíců)
- Vyšetření fetálního hemoglobinu, který se vyznačuje výraznou alkalirezistencí

# Skvrny od spermatu

- **Přímý průkaz** – pátráme po spermiích pod mikroskopem
- **Nepřímý průkaz** – detekujeme látky obsažené v seminální plazmě

# Přímý Průkaz - spermií morfologicky

Prokazujeme celé spermie ve skvrnách nebo stěrech z pochvy, popř. jiných tělních otvorů.

Centrifugát z vyluhované skvrny dáme na podložní sklíčko, fixujeme nad plamenem a pak polijeme hematoxylin-eozinem nebo karbolfuchsinem. Prohlížíme pod mikroskopem.

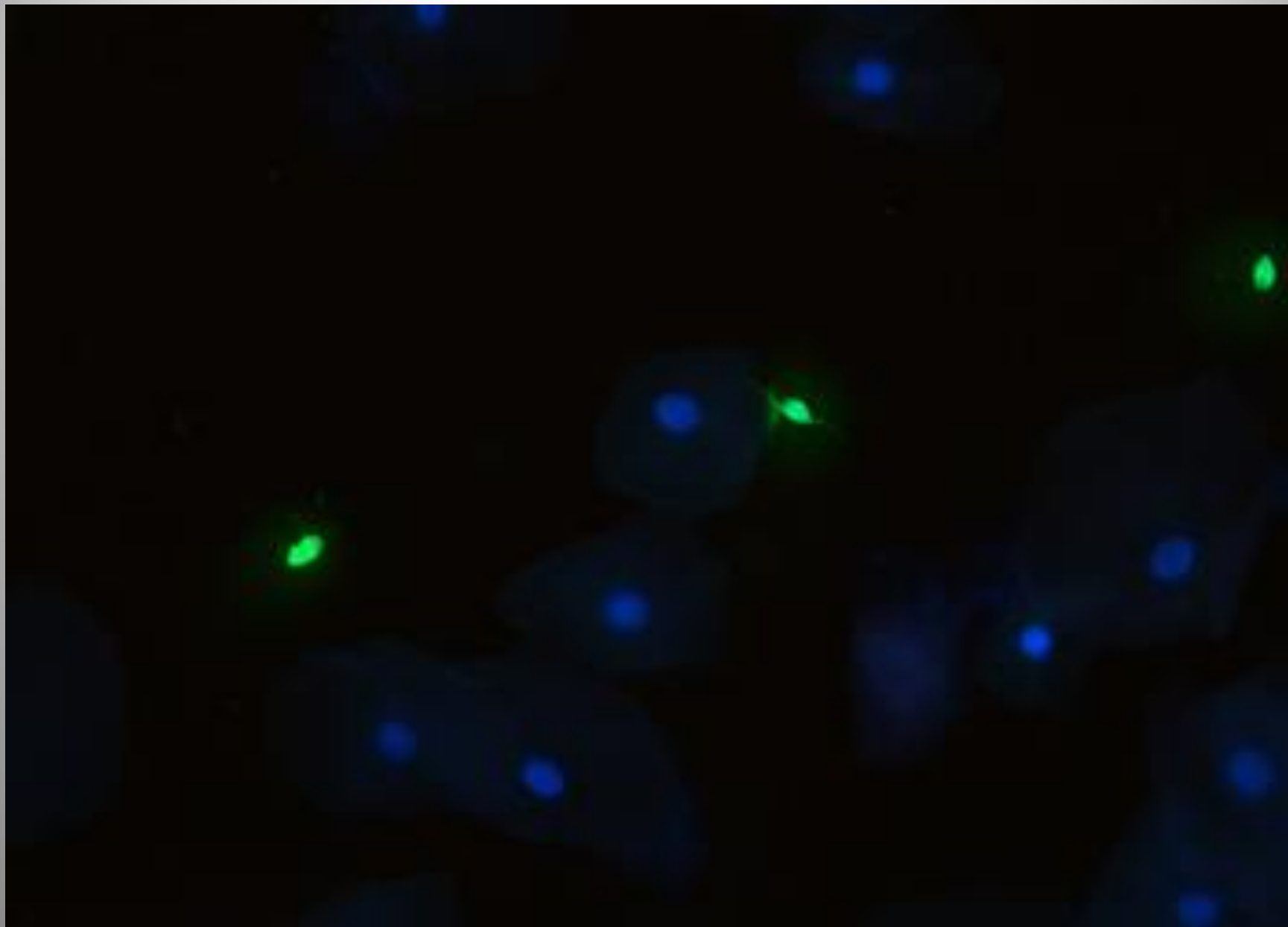
Pozitivní výsledek : Nález alespoň 1 celé spermie (sestavající se z hlavičky, krčku a bičíku).





# Průkaz lidského spermatu metodou SPERM HY-LITER™

- Spermie ve skvrnách jsou s přibývajícím časem degradovány činností mikroorganismů
- Tato metoda je založena na detekci hlaviček lidských spermií
- Pozitivní výsledek je prezentován fluorescenčním zbarvením hlavičky spermie (hlavička v mikroskopu „svítí“)
- Test reaguje pozitivně pouze se spermiemi, nikoli s vaginálními buňkami apod.



# NEPŘÍMÝ PRŮKAZ - LÁTEK OBSAŽENÝCH VE SPERMATU (ACIDFOSFATÁZY)

- Pokud v preparátu (viz přímý průkaz) nelze nalézt ani jednu celou spermii, prokážeme ve skvrnách nebo stěrech látky, které se zde nacházejí. Sperma obsahuje velké množství acidfosfatáz (podstatně větší než v jiných tělních tekutinách).
- Část skvrny ponoříme do lázně obsahující roztok chloridu sodného s octanem sodným a kyselinou octovou ledovou a pak přidáme suspenzi antrachinon-1-diazoniumchlorid a dinatrium-1-alfanaftylfosfát. Jde-li o skvrnu od spermatu, pak přítomná acidfosfatáza uvolní alfanaftol, který reaguje ihned s antrachinon-1-diazonium chloridem a vytvoří nerozpustný červenohnědý pigment
- Při pozitivním výsledku vznikne červenohnědý pigment. Zkouška dává dobré výsledky a je pozitivní, i když jde o azoospermii. Při izolovaném průkazu acidfosfatázy je nutná opatrnost při posuzování, protože acidfosfatáza může být endogenního původu.



Při pozitivním výsledku vznikne červenohnědý pigment.



Negativní výsledek - nevznikne červenohnědý pigment.

# NEPŘÍMÝ PRŮKAZ - LÁTEK OBSAŽENÝCH VE SPERMATU (SPERMINU)

Sperma dále obsahuje velké množství sperminu. Prokazujeme ho chromatograficky.

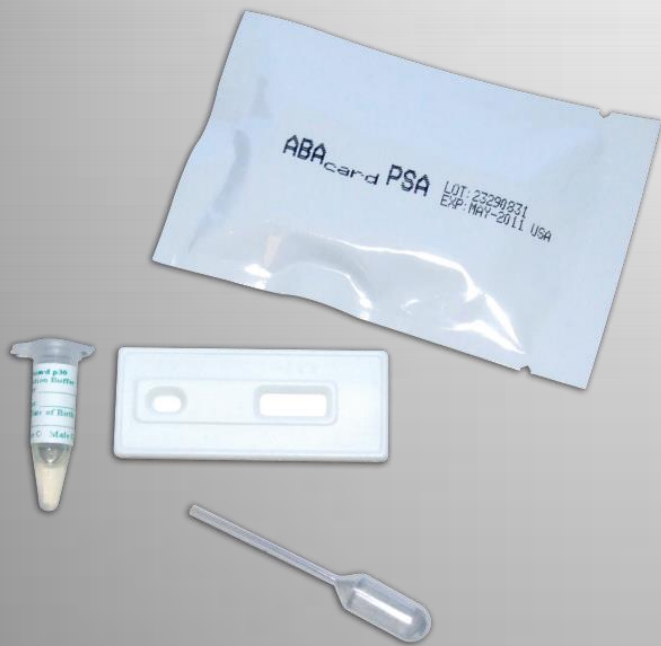
Skvrnu vyluhujeme v 50% etanolu (dle stáří skvrny 24 – 48 hodin). Výluh nanášíme na chromatografický papír tak, aby průměr naneseného vzorku nebyl větší než  $\frac{3}{4}$  cm, poněvadž spermin zůstává blíže startu. Vyvíjení trvá asi 7 hodin. Po vyvíjení papír osušíme a postříkáme lehce detekčním roztokem ninhydrinu.

Při pozitivním výsledku vznikne modravé zbarvení. Vždy srovnáváme se standardem (sperminu).

# STANOVENÍ specifického prostatického antigenu (PSA)

- PSA je glykoprotein produkovaný téměř výhradně epitelovými buňkami prostaty
- Metody jsou založeny na imunitní reakci se specifickou protilátkou (např. Imunochromatografický test Seratec PSA)
- PSA je stabilní – v pochvě lze prokázat až 27 hodin po styku, ve skvrnách měsíce až roky

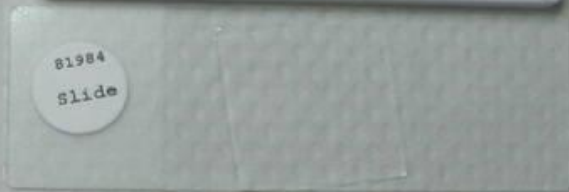
# Průkaz PSA (specifického prostatického antigenu)





PSA81984

One Day Semen/Sperm/Saliva Detection



# SLINY

- Průkaz slin je založen na enzymatické aktivitě alfa-amylázy – hydrolyticky štěpící polysacharidy

## **Jodoškrobová reakce (průkaz přítomnosti alfa-amylázy)**

- K vyšetřovanému vzorku slin přidáme škrobový substrát
- Rozštěpení škrob. substrátu se prokazuje jodoškrobovou reakcí (Lugolovým roztokem)
- Při pozitivním výsledku nedojde k barevné změně
- Specifičnost je v tomto případě omezena výskytem menšího množství alfa-amylázy v krevním séru, spermatu a moči

# Specifický průkaz lidských slin (RSID-saliva test)

- Principem testu je reakce 2 monoklonálních protilátek proti lidské alfa-amyláze
- Test je založen na množství tohoto enzymu, nikoli na jeho aktivitě
- Nedochozí ke křížovým reakcím s jinými tělními tekutinami ani bakteriální či houbovou alfa-amylázou



Human specific  
no cross reactions



Human specific  
Confirmatory  
no cross reactions



Human specific  
Confirmatory  
no cross reactions



no cross reactions  
with other human  
body fluids

## RSID Color Code

- specific labelling on each cassette
- ISO compliance

# MOČ (specifický průkaz)

- Chromatograficky - stanovení 3 hlavních složek moči (močoviny, kreatininu a kyseliny hippurové)
- Imunochromatograficky (RSID-urine test) – stanovení THP (Tamm-Horsfall glycoprotein) – jde o glykoprotein produkovaný v ledvinách – test nevykazuje křížové reakce s jinými tělními tekutinami ani s močí zvířat

# Stolice

- Průkaz sterkobilinu roztokem sublimátu, po jehož přidání nastane cihlově červené zbarvení skvrny
- Sterkobilin možno detekovat též chromatograficky

# Plodová voda

- Mikroskopicky – buňky sýrového mazu, mekoniová tělíška, lanugové vlásky

(mikroskopický obraz je většinou málo průkazný)

- Průkaz placentární alkalifosfatázy

(Placentární alkalifosfatáza je termostabilní, prokazujeme ji po inhibici termolabilní alkalifosfatázy, za použití kupř. alfa-naftylfosfátu a diazoniové soli Fast blue B)

# Skupinové vlastnosti A,B,H v sekretech - vylučovatelství

- Vylučovatel (sekretor) má ve svých sekretech (sliny, pot, sperma, apod.) obsaženy A,B,H – substance ve formě glykopeptidů
- V populaci je cca 80 % vylučovatelů
- Stanovení skupinových vlastností systému AB0 v sekretech může mít zásadní význam při dokazování závažných trestných činů