

Uporabnost forenzičnega BlueStar® Forensic testa pri latentnih krvnih sledih

Gordana Grofelnik¹, Katja Drobnič²

S študijo, izvedeno v Centru za forenzične preiskave (CFP), smo dokazali, da BlueStar® Forensic test daje pričakovane rezultate in da je za preiskavo latentnih krvnih sledi primernejši kot klasični luminolni test, ki ga uporabljajo forenzični strokovnjaki s CFP. V validacijski študiji smo preverili občutljivost, ponovljivost, stabilnost in robustnost BlueStar® Forensic testa. Za ugotavljanje občutljivosti smo uporabili različno razredčeno človeško kri. Robustnost smo preverili pri različnih načinih odstranjevanja oz. zakrivanja krvnih sledi. Krvne madeže na ivernih ploščah smo spirali do nevidnosti z uporabo vode, detergenta in detergenta z belilom. S tkanine smo jih spirali s pranjem pri 40 °C v pralnem stroju. Na lesu in pivniku smo jih zakrili z barvami za beljenje. Intenzivnost svetlenja BlueStar® Forensic testa je višja kot pri luminolnem testu, čas kemiluminiscence (svetenja) je daljši, za zaznavo kemiluminiscence ni potrebna popolna tema, test ne vpliva na DNK in je stabilnejši kot luminolni test. BlueStar® Forensic test ne reagira z uporabljenimi čistili in barvami za beljenje, medtem ko luminolni test reagira z Jupolovo belo notranjo bravo za beljenje in detergentom, ki vsebuje belilo. Stabilen je do 72 ur in deluje ob večkratnem pršenju na vzorce, pri čimer intenziteta kemiluminiscence narašča premo sorazmerno s pršenjem. Vzorcem smo uspešno določili celoten profil STR z uporabo komercialnega kompleta AmpFISTR SGMPlus.

Ključne besede:

UDK: 343.352 + 343.983.4 : 543.8

Uvod

Potreba po odkrivanju latentnih (zabrisanih) krvnih sledi pri preiskavah kaznivih dejanj sega že v začetke prejšnjega stoletja. V tem obdobju so bili razviti različni testi za dokazovanje zabrisanih krvi. Večina od njih temelji na katalitični aktivnosti hemoglobina, ki je sestavni del eritrocitov v človeški krvi. Testi niso človeško specifični, saj je hemoglobin mogoče najti v krvi vseh vretenčarjev – rib, plazilcev, dvoživk, ptičev in sesalcev, določenih kolobarnikov – črvov, glist ter še pri nižjih živalskih vrstah (komar, klop). Osnova testov je oksidoredukcijska reakcija, v kateri hemoglobin katalizira oksidacijo spojin, ki v reakciji sodelujejo kot reagenti. Značilnost pozitivne reakcije je sprememba v barvi reagenta ali sevanje v določeni svetlobi (kemiluminiscenca). Najpogosteje uporabljen reagent za dokazovanje zabrisanih krvnih sledi je hidrazid 3-aminofthalne kisline ali bolj znan pod imenom luminol. Ker testi temeljijo na oksidoredukcijski reakciji, lahko ob stiku s spojinami, ki vsebujejo hemov obroč, kot so encimi peroksidaze, ali v prisotnosti oksidirajočih agensov, pride do napačno pozitivnih rezultatov. Vkljub tej slabosti predstavljajo izredno pomemb-

no orodje za preliminarno ugotavljanje prisotnosti krvi v zabrisanih madežih pri preiskovanju krajev kaznivih dejanj. Pomembno je, da forenzični strokovnjak pri interpretaciji rezultatov upošteva to slabost.

Prvi eksperimenti, pri katerem so uporabili luminol za preliminarno testiranje prisotnosti krvi v latentnih krvnih sledih, so bili opravljeni že leta 1937. Izvedel jih je Walter Specht z Inštituta za sodno medicino in kriminalistiko v Jeni (Nemčija). Na različne podlage, kot so trata, opeke ali kamni, je pljuskal kri. Prisotnost krvi pa je dokazoval z luminolom (Thorwald, 1966). Test je od takrat doživel nekaj manjših modifikacij. Grodsky je leta 1951 pripravil mešanico pudra, ki je vsebovala luminol, natrijev karbonat in natrijev perborat. Mešanico je bilo potrebno raztopiti v destilirani vodi. Raztopina je postala najpogosteje uporabljen test za preiskavo krajev kaznivih dejanj z domnevno zabrisanimi krvnimi madeži. Vendar pa uporaba natrijevega karbonata ni bila najboljša, saj je bila reakcija zelo počasna in kratkotrajna. Raztopina je bila zelo neobstojna in strupena. Leta 1966 je Weber naredil novo testno raztopino, ki jo sestavljajo luminol, natrijev ali kalijev hidroksid in vodikov peroksid (Weber, 1966). Tako pripravljeno raztopino je bilo potrebno hraniti v hladnem prostoru, odmaknjeno od direktne svetlobe, njena obstojnost pa je bila zelo kratkotrajna (8 ur). Webrovo kombinacijo spojin danes poimenujemo klasični luminolni test. Če popršimo latentne krvne sledi, na-

¹ Gordana Grofelnik, Študentka Fakultete za varnostne vede – specialistični program.

² Katja Drobnič, dr. znanosti, Center za forenzične preiskave in izredna profesorica na Fakulteti za varnostne vede.

stane modrozeleno sevanje. Pojav imenujemo kemiluminiscenca. Kemiluminiscenca je proces, pri katerem se s pomočjo kemične reakcije brez toplote proizvede svetloba. S kemično reakcijo se oblikuje vzbujen delec, ki zgubi svojo energijo s proizvodnjo majhne količine svetlobe. Najpomembneje je to, da svetloba, ki se ob tem tvori, ne oddaja toplote. Povedano drugače, kemiluminiscenca se pojavi, kadar je vzbujena molekula dvignjena na vzpodbujen nivo med kemično reakcijo. Ob vzpostavljanju prvotnega stanja molekula oddaja energijo v obliki svetlobe. Luminol sodi med tiste spojine, ki oddajo zadovoljivo količino svetlobe.

V svetu pa klasičen luminolni test zaradi slabosti, kot so toksičnost, nestabilnost, zamudna priprava, napačno pozitivna reakcija na detergente z belilom (vodikov peroksid), kratek čas svetlenja (kemiluminiscenca) in popolna zatemnitev prostorov pri izvajanju testa, izpodrivajo novejši testi. Ti testi temeljijo na izboljšanih reagentih, katerih osnova je prav tako luminol, vendar pa je kemijsko spremenjen, formule so patentno zaščitene. Med najbolj poznanimi testi je BlueStar® Forensic test (Budowle, Leggitt, Defenbaugh, Keys, Malkiewicz, 2000), ki ga prodajajo v obliki tablet ali raztopin. Izumitelj novega testa je Loic Blumu z Univerze Claude Bernard v Lyonu (Francija) (http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/Watkins_Brown_luminol_BS.pdf). BlueStar® Forensic test je namenjen odkrivanju spranih, očiščenih in prostemu očesu nevidnih krvnih sledi. BlueStar® Forensic test ne vpliva na DNK, saj jo lahko uporabimo za nadaljnje forenzične preiskave. Prav tako test ni toksičen v primerjavi s klasičnim luminolnim testom in pozitivno vpliva na določevanje krvnih skupin (http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/SERI_ABO_analytical_report.pdf).

Opravljenih je bilo že nekaj validacijskih študij, s katerimi so dokazali prednosti uporabe BlueStar® Forensic testa v primerjavi s klasičnim luminolnim testom. Večina teh validacij sodi med razvojne validacijske študije, ki jih je nujno potrebno izvesti v času razvoja testa. Na Genetic Prints Functional Unit of the Nantes University Hospital (CHU) v Franciji so dokazali, da se v razredčitvi krvne sledi 1: 1000 še nahaja zadostna količina DNK, ki ji lahko določimo koncentracijo, da je intenzivnost kemiluminiscence veliko višja in traja dlje časa kot pri klasičnem luminolu ter da lahko napačno pozitivno reakcijo hitro opazimo, ali je reakcija BlueStar® Forensic testa potekla s krvno sledjo ali s katero drugo snovjo (http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/chu_nantes_study.pdf). V »Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmérie Nationale« (IRCGN) na francoskem nacionalnem obrambnem ministrstvu so izvedli drugo validacijsko študijo, s katero so dokazali, da se v razredčitvi krvne sledi 1: 1000 še nahaja zadostna količina DNK, ki jo lahko tipiziramo, kljub temu da je bila krvna sled v 30. dneh večkrat napršena z BlueStar® Forensic testom (http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/IRCGN_DNA_Bluestar.pdf).

V Saint Louisu na Metropolitan Police Departement pa so izvedli primerjalno študijo med BlueStar® Forensic testom in luminolnim testom. Hoteli so dokazati, kako starost krvne sledi in temperatura vplivata na potek reakcije ter kako se testa odzoveta, če je krvna sled obdelana z belilom (http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/St_Louis_comparison_study.pdf). Budowle s sodelavci (2000) iz FBI (Quantico, ZDA) je dokazal, da BlueStar® Forensic test ne vpliva na profiliranje DNK.

Namen prikazane validacijske študije je bil dokazati, da BlueStar® Forensic test v Centru za forenzične preiskave (Policija, MNZ) da pričakovane rezultate. Validacija metode je namreč postopek dokazovanja karakteristik zmogljivosti in omejitev metode ter ugotovitev vplivov, ki spreminjajo te karakteristike (SIST 17025, 1999; Mednarodni slovar osnovnih in splošnih izrazov, 1999). Validacija metode je postopek preverjanja, da je metoda (test) primerna za reševanje določenega analiznega problema. V prikazani validacijski študiji smo preverjali občutljivost, ponovljivost, stabilnost in robustnost BlueStar® Forensic testa in delno tudi klasičnega luminolnega testa. Na podlagi rezultatov študije smo ugotavljali prednosti in slabosti BlueStar® Forensic testa v primerjavi s klasičnim luminolnim testom. Preverjali smo tudi vpliv BlueStar® Forensic testa na DNK in ali je bolj stabilen kot luminolni test. Pri pršenju raztopin na vzorce smo uporabljali »BlueStar® Forensic mini kit«, »BlueStar® Forensic Tablets« in »BlueStar® Forensic Magnum« ter klasični luminolni test, ki ga uporabljajo strokovnjaki v Centru za forenzične preiskave (Policija, MNZ). Za podlago krvnih sledi smo izbrali papir – pivniki favini, iverne plošče z zaključnim slojem, smrekov les, namenjen za pod, in belo ter temno bombažno tkanino. Pri občutljivosti smo testirali samo BlueStar® Forensic test, saj smo validacijsko študijo o občutljivosti klasičnega luminolnega testa izvedli že leta 2005 (Grofelnik, 2005).

Občutljivost BlueStar® Forensic testa

Priprava vzorcev

Iz pivnikov debeline 0,5 mm smo izrezali petnajst enakih trakov (dolžine 21 cm in širine 3 cm). Na vsakega smo na sredino v enakomernih razmakih nakapljali 10 µl raztopine iz 8 različnih vzorcev. Vzorci so bili pripravljeni na naslednji način:

- [1] polna kri z antikoagulansom EDTA,
- [2] razredčitev 1 : 2 = 500 µl H_2O : 500 µl krvi,
- [3] razredčitev 1 : 5 = 800 µl H_2O : 200 µl krvi,
- [4] razredčitev 1 : 10 = 900 µl H_2O : 100 µl krvi,
- [5] razredčitev 1 : 100 = 990 µl H_2O : 10 µl krvi,
- [6] razredčitev 1 : 1.000 = 990 µl H_2O : 10 µl krvi iz vzorca 4,

[7] razredčitev $1 : 10.000 = 990 \mu\text{l } H_2O : 10 \mu\text{l}$ krvi iz vzorca 5,

[8] čista voda (negativna kontrola).

Iz pivnikov smo prav tako pripravili dvanajst krajših trakov. Na sredino vsakega smo v razmaku dveh cm nakapljali po dva vzorca, in sicer $10 \mu\text{l}$ raztopine iz vzorca 2 in $10 \mu\text{l}$ raztopine iz vzorca 6. Tako pripravljene vzorce smo pustili, da so se čez noč posušili.

Priprava forenzičnega BlueStar® testa

Forenzični BlueStar® test je na voljo v več izvedbah. Pri študiji smo uporabljali »BlueStar® Forensic mini kit«, »BlueStar® Forensic Tablets« in »BlueStar® Forensic Magnum«.

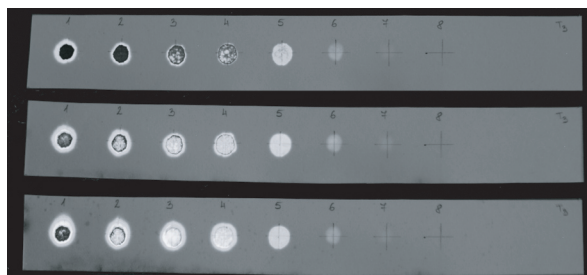
»BlueStar® Forensic mini kit« (BlueStar® Forensic mini kit, 2006) vsebuje dve plastenki s pršilko, vsaka vsebuje 125 ml destilirane vode in dva para tablet. Kemijska sestava tablet je patentno zaščitena. Tableti v parih se razlikujeta po kemijski sestavi. Priprava testa je zelo enostavna in preprosta. Tableti (eno belo in eno bež barve) smo raztopili v destilirani vodi, kar traja približno 3 minute, in BlueStar® Forensic test je bil pripravljen za uporabo. Test (125 ml) zadošča za preiskavo 25 kvadratnih metrov.

»BlueStar® Forensic Tablets« (BlueStar® Forensic Tablets, 2006) vsebuje dve tubi, v vsaki 8 tablet. Tablete v eni tubi se po kemijski sestavi razlikujejo od tablet v drugi tubi. Dve tableti (ena bela in ena bež) zadostujeta za 125 ml destilirane vode. Priprava in čas pa sta povsem enaka kot pri »BlueStar® Forensic mini kit«.

»BlueStar® Forensic Magnum« (BlueStar® Forensic Magnum, 2006) vsebuje patentno zaščiteno raztopino in tri vrste tablet. Test smo pripravili tako, da smo raztopino prelili v plastično plastenko s pršilko in dodali vse tri tablete, ki smo jih dobili v kompletu. Po približno štirih minutah je bil »BlueStar® Forensic Magnum« pripravljen za uporabo.

Preskus

Z raztopino »BlueStar® Forensic mini kit« smo pršli pet trakov, na katere smo nakapljali 8 različnih vzorcev. Priprava vzorcev je opisana v točki »priprava vzorcev«. Vsak trak smo pršli trikrat zapored in ugotovili, da ob vsakem pršenju sveti dovolj intenzivno. Svetenje (kemiluminiscenca) vsakič traja približno 5 min. Zanimivo je, da je ob drugem in tretjem pršenju reakcija oddala še intenzivnejšo svetlobo kot pri prvem (Slika 1). BlueStar® Forensic test je pozitivno reagiral s krvno sledjo tudi še v razredčitvi $1:10.000$ (vzorec pod številko 7 na sliki 1).



Slika 1: Trikratno pršenje traku z BlueStar® Forensic testom. Pod številkami 1–7 so nakapljani različno razredčeni krvni vzorci, pod številko 8 pa voda. Zgornji trak je fotografiran ob prvem pršenju, srednji trak ob drugem in spodnji trak je fotografiran ob tretjem pršenju. (Opozorilo: zaradi črno-belega tiska smo na vseh fotografijah svetenje naredili vidno v beli barvi, medtem ko je v realnosti vidno v modri barvi.)

Test smo ponovili z raztopino »BlueStar® Forensic Magnum« na petih novih trakovih. Vsak trak smo prav tako pršli trikrat zapored. Ugotovili smo, da je intenziteta kemiluminiscence višja kot pri uporabi »BlueStar® Forensic mini kita« in čas sevanja daljši. Kemiluminiscenca traja približno 8 min. Tudi v tem primeru se je pokazalo, da je ob drugem in tretjem pršenju reakcija oddala še intenzivnejšo svetlobo kot pri prvem. Pri pršenju »BlueStar® Forensic Magnum« na vzorce je test prav tako reagiral s krvno sledjo v razredčitvi $1:10.000$.

Naredili smo tudi primerjavo v intenzivnosti oddane svetlobe reakcije s tem, da smo pet krajših trakov, na katere smo nakapljali dva različno razredčena krvna vzorca, pršli in fotografirali v zatemnjenem prostoru, ostalih pet trakov pa v temnici (popolna tema). V obeh primerih so bili trakovi pršeni z »BlueStar® Forensic mini kit«. V tem primeru do razlik v intenziteti med vzorci, obdelanimi v zatemnjenem prostoru, in tistimi vzorci, ki so bili obdelani v popolni temi, skoraj ni. Prav tako smo dobro videli obe razredčitvi ($1:2$ in $1:1000$) (slike niso prikazane).

Stabilnost testa »BlueStar® Forensic Magnum«, za katerega proizvajalec trdi, da je možno še porabiti po 24. urah, smo testirali na petih trakovih z 8 vzorci. Trakove smo pršli z raztopino »BlueStar® Forensic Magnum«, ki je stal 23 ur, vendar shranjen v temnem prostoru. Intenziteta sevanja je ostala enaka kot prejšnji dan, ko smo uporabi sveže pripravljen test. Zaradi ugotovitev pri testiranjih, da krvni madeži sevajo vkljub večkratnemu pršenju, smo dva izmed trakov pršli dvakrat in merili čas sevanja. Ugotovili smo, da je sevanje trajalo približno 17 min. Pri tem, da je bila intenziteta žarenja ob drugem pršenju večja kot pri prvem.

Proizvajalec v navodilih navaja, da je raztopina »BlueStar® Forensic mini kit« stabilna do 3 ure po pripravi (BlueStar®

Forensic mini kit, 2006). Zaradi izredno dobrih rezultatov smo se odločili preveriti še stabilnost raztopine »BlueStar® Forensic mini kit« v daljšem časovnem intervalu. Dva trakova, ki sta že bila pršena z »BlueStar® Forensic mini kit«, vendar madeži niso več svetili, smo pršili z »BlueStar® Forensic mini kit«, starim 23 ur. Raztopina je bila v tem času shranjena v temnem prostoru. Ugotovili smo, da test še deluje. Trakova sta po drugem pršenju svetila približno 10 min, reakcija pa je potekla s krvno sledjo v razredčitvi 1:10.000.

Zaradi izredno dobrega rezultata smo štiri trakove pivnikov z 8 vzorci, na katere smo že pršili, vendar sevanja ni bilo več opaziti, ponovno pršili z raztopinama »BlueStar® Forensic mini kit« in »BlueStar® Forensic Magnum«, ki sta stali v popolni temi 72 ur. Na naše presenečenje so se krvne sledi ponovno zasvetile. Testi dokazujejo izredno stabilnost raztopin BlueStar® Forensic testov.

Zaznava spranih krvnih sledi z BlueStar® Forensic testom in primerjava s klasičnim luminolnim testom

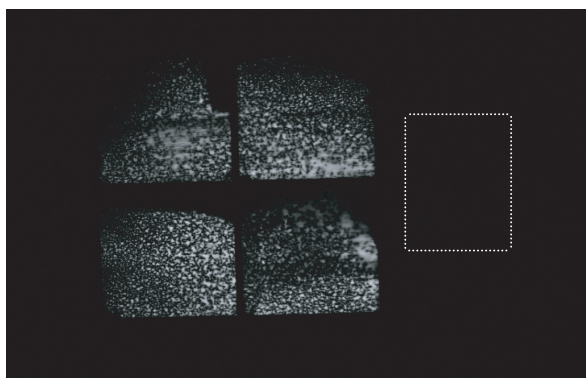
Na vsako od 12 ivernih plošč smo skoraj po vsej površini razmazali 40 µl krvi. Posušene krvne madeže smo s štirih plošč spirali z vodo, z naslednjih štirih z detergentom znamke BRIAL TOP Henkel ECOLAB in z zadnjih štirih z detergentom znamke ZLATOSAN DOMAL, ki vsebuje belilo. Plošče smo sprali, vse dokler krvne sledi niso postale na oko nevidne (slika 2). Kontrolne plošče (ne vsebujejo krvnih madežev) smo sprali na enak način. Za vsak eksperiment smo pripravili po eno kontrolno ploščo (slika 2). Plošče smo sušili čez noč.



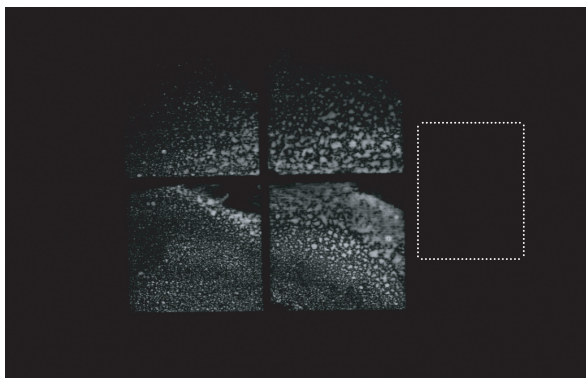
Slika 2: Iverne plošče, sprane z detergentom znamke BRIAL TOP Henkel ECOLAB. S plošč, označenih z D_1 , D_2 , D_3 in D_4 , smo sprali posušene krvne madeže. D_5 označuje kontrolno ploščo, na kateri ni bilo krvi.

Naslednji dan smo suhe plošče pršili z BlueStar® testom, ki smo ga pripravili na osnovi »BlueStar® Forensic Tablets«,

kot je opisano v točki »priprava forenzičnih testov BlueStar®«. Slika 3 prikazuje svetenje (kemiluminiscenca) latentnih krvnih madežev na ivernih ploščah, spranih z vodo. Slika 4 prikazuje svetenje latentnih krvnih madežev na ivernih ploščah, spranih z detergentom in slika 5 prikazuje svetenje latentnih krvnih madežev na ivernih ploščah, spranih z detergentom, ki vsebuje belilo. Vsi kontrolni vzorci so bili negativni (slike 3, 4 in 5).



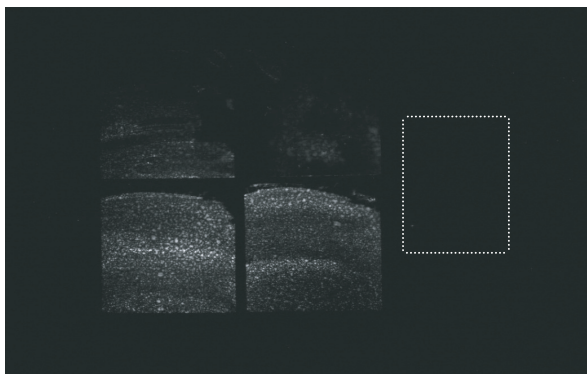
Slika 3: Z vodo sprane iverne plošče in pršene z BlueStar® forensic testom. Mesto kontrolne plošče smo zaradi lažje predstave na sliki označili s kvadratom. (Opozorilo: zaradi črno-belega tiska smo na vseh fotografijah svetenje naredili vidno v beli barvi, medtem ko je v realnosti vidno v modri barvi.)



Slika 4: Z detergentom sprane iverne plošče in pršene z BlueStar® forensic testom. Mesto kontrolne plošče smo zaradi lažje predstave na sliki označili s kvadratom. (Opozorilo: zaradi črno-belega tiska smo na vseh fotografijah svetenje naredili vidno v beli barvi, medtem ko je v realnosti vidno v modri barvi.)

Drugo serijo latentnih krvnih madežev na ivernih ploščah smo pripravili po enakem postopku kot za zgoraj opisani BlueStar® forenzični test, le da smo jih pršili tudi s klasično luminolno raztopino. Na enak način so bile pripravljene tudi kontrolne plošče. Kemiluminiscenca latentnih krvnih madežev je bila precej šibkejša in čas precej krajši kot pri uporabi BlueStar® testa. Ugotovili smo tudi, da je bila reakcija na luminolni test pozitivna na kontrolni plošči, ki je bila sprana z

detergentom, ki vsebuje belilo (napačno pozitivna reakcija). Reakcija je bila vidna prostemu očesu približno 2 sekundi.



Slika 5: Z detergentom, ki vsebuje belilo, sprane iverne plošče in pršene z BlueStar® forensic testom. Mesto kontrolne plošče smo zaradi lažje predstave na sliki označili s kvadratom. (Opozorilo: zaradi črno-belega tiska smo na vseh fotografijah svetenje naredili vidno v beli barvi, medtem ko je v realnosti vidno v modri barvi.)

Zaznava prekritih krvnih sledi z BlueStar® Forensic testom in primerjava s klasičnim luminolnim testom

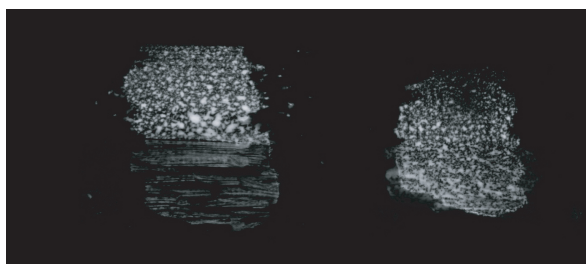
S tem preizkusom smo preverjali možnost zaznavanja krvnih sledi z uporabo BlueStar® Forensic testa, pripravljenega iz »BlueStar® Forensic Tablets« in luminolnega testa, kljub prekrivanju krvne sledi z barvo za beljenje. Za podlago smo si izbrali pivnike in smrekov les, ki ni lakiran in je namenjen za pokrivanje talnih površin. Na štiri pivnike smo z nastavkom za pipeto razmazali dvakrat po 200 μ l vzorca (50 μ l krvi:150 μ l H₂O) v razdalji 3 cm. Kontrolni pivniki niso vsebovali krvi. Na štiri plošče iz smrekovega lesa smo prav tako razmazali dvakrat po 200 μ l vzorca, pripravljenega iz 50 μ l krvi:950 μ l H₂O. Kontrolne smrekove plošče so bile brez krvi. Posušene



Slika 6: Krvna vzorca na pivniku sta na spodnji polovici prebeljena s koncentratom Jupolove visoko pokrivne bele barve in pršena z BlueStar® forensic testom. (Opozorilo: zaradi črno-belega tiska smo na vseh fotografijah svetenje naredili vidno v beli barvi, medtem ko je v realnosti vidno v modri barvi.)

krvne sledi smo do sredine (od spodaj navzgor) prebelili z barvo za beljenje. Pri beljenju smo uporabili dve vrsti barv: Jupol notranja bela barva in koncentrat Jupolove visoko pokrivne bele notranje barve. Kontrolne pivnike in kontrolne smrekove plošče smo prebelili z istima barvama. Dva pivnika (slika 6) in dve smrekovi plošči (slika 7) smo pršili z BlueStar® Forensic testom. Druge pa s klasičnim luminolnim testom.

Kontrolni pivnik, prebeljen z Jupolovo notranjo belo barvo, je pozitivno reagiral z luminolnim testom. Reakcija je bila vidna približno 2 sekundi. V tem primeru lahko zatrdimo, da luminolni test reagira z Jupolovo notranjo barvo za beljenje. Vse kontrole, beljene z Jupolovima barvama in pršene z BlueStar® Forensic testom, so bile negativne.



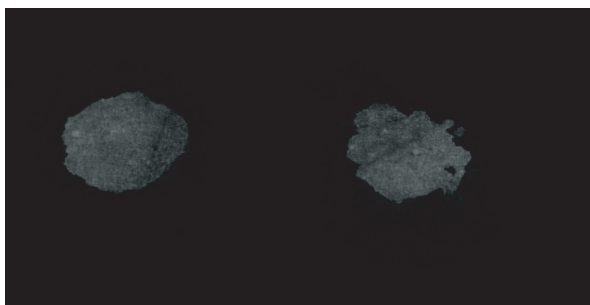
Slika 7: Krvna vzorca na smrekovem lesu sta na spodnji polovici prebeljena z obema Jupolovima barvama in pršena z BlueStar® forensic testom. (levo je visoko pokrivna, desno pa notranja barva) (Opozorilo: zaradi črno-belega tiska smo na vseh fotografijah svetenje naredili vidno v beli barvi, medtem ko je v realnosti vidno v modri barvi.)

Zaznava spranih krvnih madežev z BlueStar® Forensic testom in primerjava s klasičnim luminolnim testom

Izvedli smo tudi primerjavo med BlueStar® Forensic testom, pripravljenim iz »BlueStar® Forensic Tablets« in luminolnim testom za krvne madeže, sprane s tkanine. Pripravili smo 6 krpic v velikosti 10 x 10 cm iz belega 100-odstotnega bombaža in 6 krpic v velikosti 10 x 10 cm iz temnega 100-odstotnega bombaža. Na vsak vzorec smo razmazali 400 μ l vzorca (100 μ l krvi:300 μ l H₂O) v velikosti 3 x 4 cm. Vzorce smo prali na 40 °C, razen tistih, ki so nam služili za kontrolo. Kontrolni vzorci so tokrat vsebovali kri, saj smo preverjali, ali testa sploh delujeta na tkanini. Krvne sledi na beli podlagi so bile po pršenju dobro vidne pri obeh testih, medtem ko je bila intenziteta svetljenja pri krvnih sledeh na temni podlagi pri luminolnem testu zelo šibka. Kemiluminiscenca krvnega madeža na temni tkanini je po pršenju z BlueStar® Forensic testom precej šibkejša od kemiluminiscence krvnega madeža na beli tkanini.

Po pranju so bili rezultati enaki. Svetenje spranih krvnih madežev na beli tkanini je bilo vidno tako pri uporabi

BlueStar® Forensic testa kot pri klasičnem luminolnem testu. Slika 8 prikazuje svetenje latentnih krvnih madežev na oprani beli tkanini, ki je bila pršena z BlueStar® Forensic testom. Z luminolnim testom in BlueStar® Forensic testom smo pršli tudi sprane krvne madeže na temnem blagu. Kemiluminiscenca pa je bila vidna le nekaj sekund. S tem, da je bilo na vzorcih, ki so bili pršeni z BlueStar® Forensic testom, žarenje intenzivnejše in je trajalo približno pet sekund, na vzorcih, ki so bili pršeni z luminolnim testom, pa je žarenje trajalo približno dve sekundi.



Slika 8: Belo oprano blago, pršeno z BlueStar® Forensic testom. (Opozorilo: zaradi črno-belega tiska smo na vseh fotografijah svetenje naredili vidno v beli barvi, medtem ko je v realnosti vidno v modri barvi.)

Vzrok za razliko v intenziteti kemiluminiscence krvnih sledi na beli in temni podlagi je v večji absorpciji svetlobe pri temni podlagi kot pri svetli. Pri uporabi BlueStar® Forensic testa in luminolnega testa na beli in temni tkanini smo ugotovili, da BlueStar® Forensic test v vseh primerih daje boljše rezultate kot luminolni test.

Zaključek

BlueStar® Forensic test reagira s krvjo, razredčeno z vodo vse do razredčitve 1:10.000. Ob vsakem pršenju BlueStar® Forensic testa smo merili čas kemiluminiscence (svetenja ali žarjenja). Ugotovili smo, da je kemiluminiscenca krvnih madežev ob vsakem pršenju z BlueStar® Forensic testom zelo intenzivna in traja v povprečju od 5 do 8 minut. V primeru, ko je »BlueStar® Forensic Magnum« stal 23 ur, pa je bila po drugem pršenju vidna še 17 minut. Dokazali smo, da »BlueStar® Forensic mini kit«, ki stoji 23 ur, še vedno deluje, kemiluminiscenca pa traja po drugem pršenju približno 10 minut. Pri preizkusu, pri katerem smo na že testirane trakove pivnikov ponovno pršli z »BlueStar® Forensic mini kit« in »BlueStar® Forensic Magnum«, ki sta stala v popolni temi 72 ur, je reakcija v obeh primerih uspešno potekla. Prav tako smo dokazali, da za uporabo BlueStar® Forensic testa ni potrebna popolna tema.

BlueStar® Forensic test in klasični luminolni test smo testirali na ivernih ploščah z zaključnim slojem, na katere smo

nanesli krvne sledi. Krvne sledi smo s plošč sprali z vodo, z detergentom ali z detergentom, ki vsebuje belilo. Pri uporabi BlueStar® Forensic testa smo dokazali, da test ne reagira z nobenim od detergentov. V primeru, ko pa smo uporabili klasični luminolni test, smo pri kontrolnih ploščah videli, da klasični luminolni test reagira z detergentom, ki vsebuje belilo.

Želeli smo preveriti, ali je možno z BlueStar® Forensic testom ali luminolnim testom zaznati krvne sledi, ki so prebeljene z barvo za beljenje. Dokazali smo, da prekrivanje krvne sledi z barvo za beljenje ne vpliva na to, da reakcija s krvno sledjo ne bi potekla. Odstopanja lahko opazimo le v intenziteti kemiluminiscence (svetenja), ki je pri uporabi BlueStar® Forensic testa višja kot pri uporabi luminolnega testa. Prav tako pa smo ugotovili, da klasični luminolni test reagira z Jupolovo notranjo belo barvo brez prisotnosti krvi.

Primerjavo med BlueStar® Forensic testom in luminolnim testom smo naredili tudi na tkanini. Na temni tkanini je bila kemiluminiscenca komaj vidna in je trajala le nekaj sekund. Ugotovili smo, da je bila kemiluminiscenca spranih krvnih madežev na temni tkanini, ki so bili pršeni z BlueStar® Forensic testom, intenzivnejša in je trajala približno pet sekund, medtem ko je kemiluminiscenca pri spranih krvnih madežih, ki so bili pršeni z luminolnim testom, trajala približno dve sekundi.

Iz nekaterih vzorcev (24 vzorcev, izrezanih iz trakov z 8. vzorci in 3. vzorci, odvzetih z vatirano paličico z ivernih plošč, spranih z vodo), ki so bili pršeni z BlueStar® Forensic testom, smo izolirali DNK in jo kvantificirali. Količina DNK je bila v vzorcih v skladu s pričakovanji. Iz treh vzorcev smo izolirano DNK vzeli še v profiliranje DNK. Vsem trem vzorcem smo z uporabo komercialnega kompleta AmpFISTR SGM Plus, proizvajalca Applied BioSystems, lahko določili celoten profil STR. Tako smo dokazali, da BlueStar® Forensic test ne razgrajuje DNK, enako pomembno pa je, da ne vpliva na nadaljnje preiskave DNK.

S študijo smo potrdili, da BlueStar® Forensic test še reagira s krvjo, razredčeno z vodo, vse do razredčitve 1:10.000. Tudi klasični luminolni test še reagira pri tej razredčitvi. Dokazali smo, da je intenzivnost BlueStar® Forensic testa višja kot pri luminolnem testu; da je kemiluminiscenca z uporabo BlueStar® Forensic testa precej daljša (od 5 do 17 minut) kot pri luminolnem testu, ki traja le približno 8 sekund (Grofelnik, 2005); da za zaznavo kemiluminiscence pri BlueStar® Forensic testu ni potrebna popolna tema; da BlueStar® Forensic test ne vpliva na DNK; da je BlueStar® Forensic test stabilnejši (do 72 ur) kot luminolni test (potrebno ga je uporabiti v 8. urah) in da BlueStar® Forensic test ni reagiral s čistili in barvami za beljenje, ki smo jih uporabljali, medtem pa je luminolni test reagiral z Jupolovo belo notranjo barvo za beljenje in detergentom, ki vsebuje belilo.

Občutljivost BlueStar® Forensic testa in luminolnega testa (Grofelnik, 2005) je podobna, saj sta oba reagirala pri razredčitvi krvnih madežev 1:10.000. Razlika je le v tem, da je kemi-luminiscenca pri BlueStar® Forensic testu intenzivnejša kot pri luminolnem testu.

Pomembna prednost je tudi ta, da pri BlueStar® Forensic testu ni potrebno predhodno v laboratoriju pripravljati raztopine, ki zahtevajo tehtanje in merilne bučke, kajti BlueStar® Forensic test enostavno pripravimo tako, da tablete raztopimo v destilirani vodi in raztopina je pripravljena za uporabo.

Seveda pa se ob uvedbi vsake novosti pojavlja tudi vprašanje ekonomičnosti. Iz kompleta »BlueStar® Forensic Tablets«, ki vsebuje 8 parov tablet (za 125 ml raztopine potrebuješ 1 par) in stane 98 dolarjev (http://www.crimescene.com/store/index.php?mainpage=product_info&products_id=130), lahko pripravimo dva litra raztopine. To zadostuje za preiskavo 200 m² površin. Paket luminolnega prahu, s katerim lahko pripravimo pol litra luminolne raztopine, stane 15 dolarjev (http://www.crimescene.com/store/index.php?mainpage=product_info&products_id=49). Dvolitrska luminolna raztopina torej stane 60 dolarjev. Zaradi vseh dokazanih prednosti, ki nam jih ponuja BlueStar® Forensic test, je razlika v ceni zanemarljiva.

Na podlagi opravljene študije lahko trdimo, da bi uporaba BlueStar® Forensic testa v slovenskem forenzičnem prostoru pripomogla k uspešnejšemu, učinkovitejšemu, lažjemu, bolj razbremenjenemu in zaradi načina uporabe BlueStar® Forensic testa bolj poenostavljenemu delu pri preiskovanju krajev kaznivih dejanj z zabrisanimi krvnimi sledmi.

Literatura

1. **Analytical Report. Serological Research Institute.** Članek je dobljen 17.12.2007 na [www: http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/SERI_ABO_analytical_report.pdf](http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/SERI_ABO_analytical_report.pdf).
2. BlueStar® Forensic. Latent bloodstain reagent (2006). **BlueStar® Forensic Magnum.** User's Manual.
3. BlueStar® Forensic. Latent bloodstain reagent (2006). **BlueStar® Forensic mini kit.** User's Manual.
4. BlueStar® Forensic. Latent bloodstain reagent (2006). **BlueStar® Forensic Tablets.** Technical Application Note, User's Manual.
5. **BlueStar® Forensic Validation Study.** Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Operation Unit for Genetic Imprinting. Članek je dobljen 17.12.2007 na [www: http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/chu_nantes_study.pdf](http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/chu_nantes_study.pdf).
6. Budowle, B.; Leggett J.L.; Defenbaugh D.A.; Keys K.M.; Malkiewicz S.F. (2000). The presumptive Reagent Fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR Typing of recovered DNA. **Journal of Forensic Sciences**, 45/5, s. 1090-1092.
7. **Crimescene Store.** Članek je dobljen 10.12.2007 na [www: http://www.crimescene.com/store/index.php?main_page=product_info&products_id=130](http://www.crimescene.com/store/index.php?main_page=product_info&products_id=130)
8. **Crimescene Store.** Članek je dobljen 10.12.2007 na [www: http://www.crimescene.com/store/index.php?main_page=product_info&products_id=49](http://www.crimescene.com/store/index.php?main_page=product_info&products_id=49)
9. Grofelnik, G. (2005). **Vpliv luminola na izolacijo DNK iz krvnih madežev.** Diplomska naloga, Ljubljana, Fakulteta za policijsko-varnostne vede.
10. **Mednarodni slovar osnovnih in splošnih izrazov s področja meroslovja**, BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1993; prevod: USM, 1999.
11. SIST EN ISO/IEC 17025: 1999: Splošne zahteve za usposobljenost preiskovalnih in kalibracijskih laboratorijev.
12. **The Effect of the BlueStar™ blood reagent on DNA typing.** French Defense Departement, Gendermerie Nationale Criminal Research Institute, Biology Departement. Članek je dobljen 19.12.2007 na [www: http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/IRCGN_DNA_Bluestar.pdf](http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/IRCGN_DNA_Bluestar.pdf).
13. Thorwald, J. (1966). **Crime and Science: The New Frontier in Criminology.** 2nd ed. A Harvest Book Harcourt, Brace & World, Inc., New York. S.82
14. Watkins, M. D.; Brown, K. C. **Blood detection. A Comparison of Visual Enhancement Chemicals for the Recovery of Possible Blood Stains at the Crime Scene. Luminol vs. BlueStar.** Članek je dobljen 10.7.2007 na WWW: http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/Watkins_Brown_luminol_BS.pdf
15. Webb, S. K. **Luminol vs. BlueStar®: A Comparison Study Of Latent Blood Regents.** Članek je dobljen 20.12.2007 na [www: http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/St_Louis_comparison_study.pdf](http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/St_Louis_comparison_study.pdf).
16. Weber, K. (1966). Die Anwendung der Chemil.Dtseh Z **Gesamte Gericht Med.** 57, s. 410-423.

Applicability of the forensic BlueStar® forensic test to latent blood traces

Katja Drobnič, Associate at the Centre for Forensic Investigations and
Associate Professor at the Faculty of Criminal Justice and Security

Gordana Grofelnik, Student at the Faculty of Criminal Justice and Security

A study performed at the Forensic Science Laboratory (CFP) proved that the BlueStar® forensic test gives the expected results and is more appropriate in detecting latent traces of blood than the classical luminol test that is used in the CFP. A validation study verified the sensitivity, repeatability, reliability and robustness of the BlueStar® forensic test. Human blood diluted in different ratios was used for sensitivity assessment. Robustness was checked with various eliminations and concealments. Splinter plates were washed with water, household detergent and with detergent which contained bleach until no blood stain was visible. Blood stains were washed from woven fabric in a washing machine at 40°C. On wood and blotting paper, blood stains were whitewashed. The brightness intensity of the BlueStar® forensic test is higher than the luminol test, chemoluminescence is longer, total darkness is not needed, it has no affect on DNA and it is more reliable. The BlueStar® forensic test does not react with the detergents and whitewash colors used, in contrast with luminol test, which reacts with Jupol white indoor color and detergent containing bleach. The BlueStar® forensic test is stable for 72 hours and is still effective after several sprayings on samples. The chemoluminescence intensity expansion is proportional with spraying. A complete STR profile was successfully defined with all samples by using a commercial AmpFISTR SGMPlus kit.

Key words : criminalistics, forensic sciences, blood stains, latent bloodstain reagents, detection of bloodstains

UDC : 343.352 + 343.983.4 : 543.8