

Sylvia Łuczak, Marcin Woźniak, Marta Papuga, Katarzyna Stopińska, Karol Śliwka

Porównanie efektywności odczynnika Bluestar® i luminolu w wykrywaniu śladów krwawych

A comparison of the Bluestar® and luminol effectiveness in bloodstain detection

Z Katedry Medycyny Sądowej i Zakładu Genetyki Molekularnej i Sądowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Celem niniejszego eksperymentu było porównanie skuteczności luminolu i odczynnika Bluestar® w wykrywaniu śladów krwawych. Zbadano czułość i trwałość obu odczynników oraz wpływ ich zastosowania na wyniki amplifikacji DNA. Stwierdzono, że luminol i Bluestar® charakteryzują się podobną czułością wykrywania śladów krwawych, lecz preparat luminolu jest mniej trwały i traci użyteczność po 24 godzinach od przygotowania podczas gdy odczynnik Bluestar® zachowuje aktywność przez co najmniej tydzień. Stwierdzono również zdolność obu odczynników do wykrywania starych śladów krwi. Wykazano, że skuteczność wykrywania plam przygotowanych z rozcieńczonej krwi zależy od podłoża, na którym się znajdują. Stwierdzono również, możliwość amplifikacji materiału genetycznego otrzymanego z plam poddanych działaniu obu odczynników.

The objective of the present study was to compare the effectiveness of two chemical agents - Bluestar® and luminol - in detection of bloodstains. The experiments were performed to test for bloodstain detection sensitivity, chemical stability and to investigate the effect of both reagents on DNA typing. During this study, the authors prepared serial dilutions (1:2 to 1:10 000 000) of fresh blood, as well as dilutions of 25-year old blood on Whatman 3MM blotting paper. Additional dilutions of fresh blood were spotted on a glass surface. The experiments showed very similar results for both investigated reagents, although the Bluestar® solution proved to be more stable (at least 7 days after the preparation) as compared to luminol (stable for not more than 24 hours). Both reagents showed a higher

sensitivity for diluted bloodstains on a glass surface than for similar stains on filter paper. The investigators also demonstrated that multiplex amplification of DNA was feasible after Bluestar® or luminol treatment, although the detected bloodstains might be too diluted to allow for effective DNA extraction and amplification.

Słowa kluczowe: ślady krwawe, Bluestar®, luminol, porównanie

Key words: bloody traces, Bluestar®, luminol, comparison

WPROWADZENIE

Przestępstwom, w czasie których doszło do uszkodzenia ciała i przerwania ciągłości tkanek zewnętrznych, często towarzyszy obecność śladów krwawych. Mogą one znajdować się na miejscu zbrodni, na przedmiotach związanych ze zdarzeniem bądź na narzędziu, którym zadano ranę oraz mogą być przenoszone przez osoby, które miały styczność z ofiarą. Ujawnianie krwawych śladów zwykle jest w różnym stopniu utrudnione, zależy od wielkości plamy, ilości krwi i działania czynników zewnętrznych, a także od typu powierzchni, na której znajdują się ślady. Często zdarza się, że osoby, które popełniły czyn przestępczy związany z uszkodzeniem ciała usiłują usunąć pozostawione plamy krwi, co może prowadzić do rozcieńczenia śladów

krwi lub całkowitego zniknięcia (zatarcia) plam. W trakcie oględzin miejsca przestępstwa dokonuje się, więc często ujawnienia niewidocznych śladów krwawych za pomocą środków chemicznych reagujących z substancjami zawartymi we krwi w sposób pozwalający na ujawnienie nawet minimalnych ilości krwi [1]. W materiale dowodowym takie ślady często stanowią główny element obciążający, zwłaszcza, gdy z ujawnionych plam możliwa jest izolacja DNA i określenie profilu genetycznego.

Jednym z najczęściej używanych odczynników do wizualizacji plam krwawych, szczególnie w przypadkach, gdy istnieje podejrzenie, że ślady były usuwane lub nie są widoczne nieuzbrojonym okiem, jest luminol (hydrazyd 3-aminoftalowy), który został po raz pierwszy zastosowany do wykrywania śladów krwi przez Waltera Spechta w 1937 roku [2] i od tego czasu używany jest przez specjalistów z dziedziny kryminalistyki i medycyny sądowej. Roztwór luminolu w zetknięciu z hemoglobina (jak również innymi substancjami posiadającymi właściwości utleniające, zawierające grupę hemową lub jonami metali) wykazuje właściwości chemiluminescencyjne, emitując światło o długości fali 441-452 nm [3, 4]. Chemiluminescencja związana jest z utlenianiem luminolu w środowisku zasadowym, w obecności utleniacza i aktywatora, któremu towarzyszy uwalnianie wolnego azotu i energii w formie światła. Główną wadą stosowanego najczęściej roztworu luminolu jest stosunkowo krótki czas jego przydatności. Fakt ten powoduje konieczność przygotowywania roztworu luminolu tuż przed planowanymi oględzinami, co może stanowić pewne utrudnienie w jego zastosowaniu. Ponadto w środowisku genetyków sądowych istnieją obawy, iż obecność luminolu może ujemnie wpływać na możliwość amplifikacji DNA, choć ostatnie doniesienia zdają się temu twierdzeniu przeczyć [3, 5-7]. Luminol używany jest obecnie równolegle z innymi testami wykrywającymi obecność krwi, takimi jak test fluoresceinowy [5], benzydynamowy [1], tetrametylobenzydynamowy (TMB) [6], fenoloftaleinowy (PT) [6] czy test z wykorzystaniem zieleni malachitowej [1]. Na rynku dostępny jest obecnie również inny odczynnik, działający podobnie do luminolu, noszący nazwę handlową Bluestar®. Odczynnik ten, jak podaje producent, został przygotowany na bazie luminolu z wykluczeniem jego wad. Zasada detekcji plam krwawych z zastosowaniem tego odczynnika jest identyczna jak w przypadku luminolu, jednak według danych producenta preparat ten jest znacznie trwalszy i pozostaje aktywny przez kilka dni po przygotowaniu.

Celem niniejszej pracy jest porównanie efektywności wykrywania plam krwawych przy zastosowa-

niu luminolu oraz odczynnika Bluestar® oraz ocena trwałości obu odczynników.

MATERIAŁ I METODY

Standardowy roztwór luminolu przygotowano poprzez rozpuszczenie 0,5 g luminolu (Fluka, Seelze), 25 g węglanu sodu (POCH S.A., Gliwice) oraz 3,5 g nadboranu sodu (Aldrich, Steinheim) w 500 ml wody destylowanej [1]. Roztwór Bluestar® przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta (Bluestar Forensic, Monte-Carlo). Przygotowane roztwory umieszczano w rozpylaczach z tworzywa sztucznego a następnie наносzono równomiernie na badane plamy krwawe z odległości ok. 5-10 cm. W trakcie wykonywania zdjęć z długim czasem ekspozycji spryskiwanie powtarzano w momencie zaniku fluorescencji ujawnianych śladów.

W celu przetestowania zakresu czułości obu odczynników na podłożu absorbującym przygotowano serię plam krwi w postaci rozcieńczeń próbek krwi od trzech osób, pobranych na 3,8 % roztwór cytrynianu sodu. Krew rozcieńczano w stosunku 1:2, 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10 000, 1:20 000, 1:50 000 i 1:100 000 używając roztworu soli fizjologicznej, a następnie 40 µl roztworu z każdego rozcieńczenia наносzono na bibułę Whatman 3MM i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Dla każdej próbki krwi przygotowano po trzy plamy z każdego z rozcieńczeń.

W celu zbadania wpływu podłoża nieabsorbującego na czułość reakcji luminolu i odczynnika Bluestar®, przygotowano na płytkach szklanych serie rozcieńczeń wybranych próbek krwi w stosunku: 1:2, 1:10, 1:1000, 1:10 000, 1:20 000, 1:50 000, 1:1 000 000 i 1:10 000 000, wykorzystując do rozcieńczania roztwór soli fizjologicznej.

Dla dokonania oceny trwałości luminolu i Bluestar®, przygotowano po 10 fragmentów bibuły Whatman 3MM dla każdego z odczynników, na które naniesiono po 40 µl rozcieńczonej w stosunku 1:500 krwi. Do przygotowania plam wykorzystano próbki krwi pochodzące od czterech różnych osób. Plamy te spryskiwano roztworami luminolu i Bluestar® po 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 i 168 godzinach od przygotowania roztworów.

W celu przetestowania reakcji luminolu i odczynnika Bluestar® ze starymi śladami krwawymi sporządzono wyciągi z 0,3 g zeskrobin z trzech różnych zasuszonych 25-letnich krwi przez umieszczenie ich w 1 ml roztworu soli fizjologicznej i wytrząsanie przez dwie doby. Otrzymane wyciągi odpowiadały barwą roztworowi zawierającemu świeżą krew w stosunku 1:1000.

Obecność chemiluminescencji dokumentowano z wykorzystaniem cyfrowego aparatu fotograficznego Canon PowerShot G2, przy następujących ustawieniach ekspozycji: czas naświetlania $t = 15$ s, przesłona $F = 2,0$, czułość matrycy $ISO = 400$.

W celu porównania wpływu luminolu i Bluestar® na wyniki amplifikacji DNA, przygotowano równolegle na bibule Whatman 3MM, dwie serie plam z rozcieńczonej w stosunku 1:0, 1:1, 1:10, 1:100 i 1:1000 krwi, które spryskano osobno roztworami luminolu lub Bluestar®. Materiał genetyczny izolowano metodą organiczną, połączoną z oczyszczaniem na kolumnkach Microcon 100 (Millipore, Billerica). Amplifikację przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu PowerPlex16™ (Promega, Madison) w termocyklerze GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City) zgodnie z zaleceni-

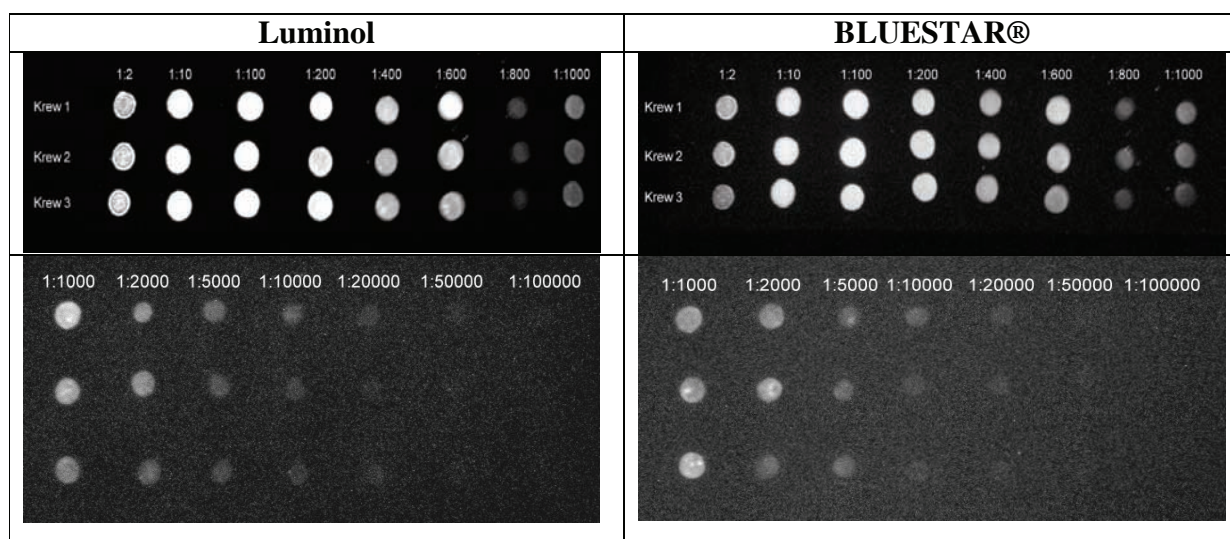
mi producenta, używając 8 ml DNA matrycowego. Rozdział elektroforetyczny prowadzono na sekwencjatorze DNA ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, Foster City), zgodnie z zaleceniami producenta zestawu PowerPlex16™.

WYNIKI I DYSKUSJA

Testy przeprowadzone w ramach niniejszego eksperymentu wykazały, że zarówno luminol jak i Bluestar® charakteryzują się zbliżoną czułością wykrywania śladów krwawych. Wartością graniczną dla obu odczynników na podłożu absorbującym było rozcieńczenie 1:10 000, podczas gdy ślady krwi rozcieńczonej w stosunku powyżej 1:20 000 były praktycznie niewykrywalne (ryc. 1).

Ryc. 1. Porównanie intensywności chemiluminescencji luminolu i odczynnika BLUESTAR® w zetknięciu z plamami krwi przygotowanymi z rozcieńczonej krwi w stosunku od 1:2 do 1:100 000. Ilustracja przedstawia plamy wykonane z trzech różnych próbek krwi rozcieńczanych roztworem soli fizjologicznej.

Fig. 1. The comparison of the intensity of chemiluminescence of luminol and BLUESTAR® detecting stains of blood diluted from 1:2 to 1:100 000. The figure presents chemiluminescence of the stains prepared from three different samples of blood diluted with 0,9% NaCl.



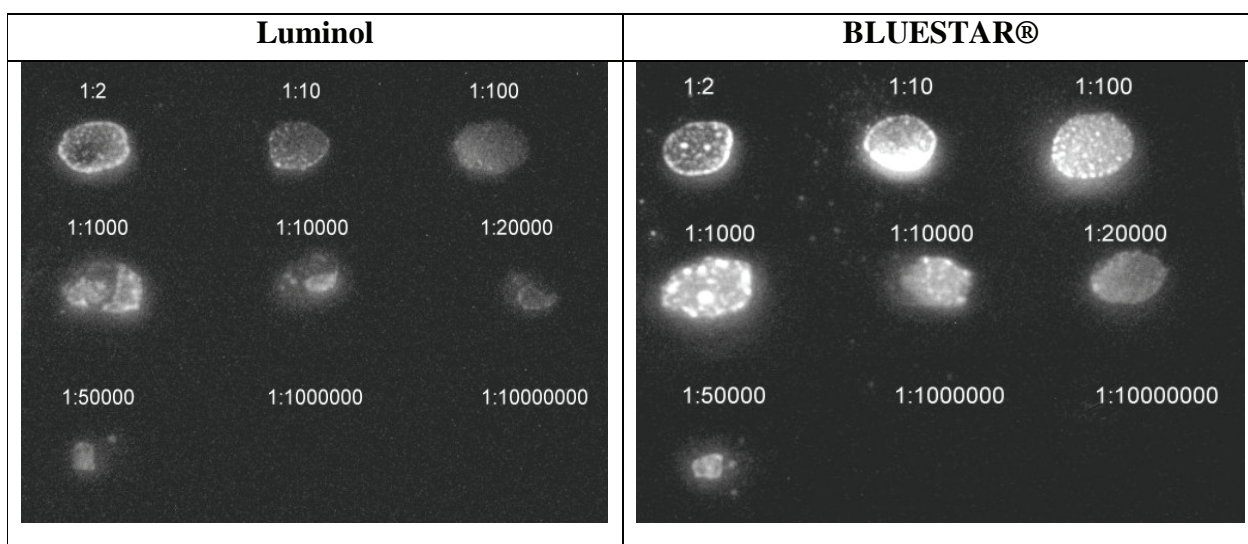
Natomiast na podłożu nieabsorbującym (szkło) wartością graniczną dla obu odczynników było rozcieńczenie 1:50 000 (ryc. 4). Dane uzyskane przez innych autorów świadczą, że z użyciem luminolu możliwe jest wykrywanie śladów krwi rozcieńczonej nawet w stosunku 1:10 000 000 [7], podczas gdy w przypadku odczynnika Bluestar® maksymalnym wykrywanym rozcieńczeniem krwi jest 1:1 000 000 [4]. Niektórzy autorzy wskazują jednak również, że podłożo, na które naniesione są plamy wpływa na możliwość ich uwidocznienia, przy czym plamy krwi

na powierzchniach nieabsorbujących wykrywane są w rozcieńczeniu o trzy rzędy wielkości wyższym niż na powierzchniach absorbujących [5]. Dla potrzeb niniejszego eksperymentu przygotowano plamy na podłożu absorbującym (bibuła Whatman 3MM), co może tłumaczyć niższą niż maksymalna czułość stosowanych metod podawana w piśmiennictwie [4, 5, 7, 8].

Istotnym czynnikiem warunkującym wysoką skuteczność oględzin miejsca przestępstwa pod kątem obecności śladów krwi jest stabilność stosowanych

Ryc. 4. Porównanie intensywności chemiluminescencji luminolu i odczynnika BLUESTAR® w styczności z plamami krwi przygotowanymi z rozcieńczonej krwi w stosunku od 1:2 do 1:100 000 000. Ilustracja przedstawia plamy wykonane z jednej próbki krwi rozcieńczonej roztworem soli fizjologicznej i naniesione na podłoże nieabsorbujące (płytkę szklaną).

Fig. 4. The comparison of chemiluminescence intensity of luminol and BLUESTAR® in reaction with blood stains diluted from 1:2 to 1:100 000 000. Figure presents stains from one blood sample diluted with 0.9% NaCl and placed on non-absorbing surface (glass plate).



odczynników. Zbadano możliwość uwidocznienia plam krwawych odczynnikami luminol i Bluestar® w różnych odstępach czasu po ich sporządzeniu. Luminol po 24 godzinach od przygotowania roztworu praktycznie stracił zdolność chemiluminescencji w kontakcie z krwią, podczas gdy odczynnik Bluestar® wykazywał intensywność luminescencji zbliżoną do wyjściowej po 48 godzinach od przygotowania (ryc. 2) a nawet, jak wykazały dalsze eksperymenty, po 168 godzinach (7 dobach).

Dane opublikowane w światowym piśmiennictwie wskazują, że zarówno luminol jak i Bluestar® znalazły zastosowanie w oględzinach miejsc przestępstw popełnionych przed wielu laty [4, 8]. Eksperymenty na śladach krwawych wykonanych z wyciągów z 25-letnich zeszkrobów zasuszonej krwi, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wykazały zdolność obu badanych odczynników do reakcji ze starymi śladami krwi. Ponadto w czasie doświadczenia zaobserwowano, iż chemiluminescencja odczynnika Bluestar® w zetknięciu z plamami starej krwi była intensywniejsza niż chemiluminescencja wzbudzona przez luminol (ryc. 3).

Użyteczność śladu ujawnionego na miejscu przestępstwa znacznie wzrasta, gdy możliwe jest określenie jego profilu genetycznego, a co za tym idzie, ustalenie jego pochodzenia od konkretnej osoby. Istotnym ograniczeniem stosowania danej metody wizualizacji śladów krwi jest zatem jej ewen-

tualny wpływ na dalszą analizę śladów, w tym na analizę genetyczną. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy eksperymenty wykazały, że skuteczna amplifikacja i określenie genotypu próbki DNA otrzymanej z plamy krwi poddanej działaniu luminolu lub odczynnika Bluestar® były możliwe w przypadku próbek pochodzących ze śladów krwi rozcieńczonych w stosunku, co najwyżej 1:10, jednak amplifikując próbki o takim rozcieńczeniu obserwowano często występowanie profili częściowych oraz zjawisko „wypadania” alleli (*ang.* „allelic drop-out”), szczególnie w przypadku amplifikacji dłuższych fragmentów DNA. Amplifikacja preparatów DNA uzyskanych z plam krwawych rozcieńczonych w stosunku 1:100 i wyższym często dawała profile szczątkowe lub w ogóle nie dawała rezultatów.

Uzyskane wyniki nie są w pełni zgodne z otrzymanymi przez innych autorów danymi, według których obecność luminolu lub odczynnika Bluestar® nie ma wpływu na możliwość amplifikacji DNA nawet w śladach krwawych rozcieńczonych w stosunku 1:1000 [3-7]. Należy jednak podkreślić, że według niektórych autorów efektywność takiej amplifikacji zależy od podłoża, na którym ślad się znajduje i jest wyższa dla podłoży nieabsorbujących niż dla absorbujących [5]. Przyczyny obserwowanej rozbieżności nie są w chwili obecnej jasne i wymagają dalszych eksperymentów. Nie można wykluczyć, że wpływ na skuteczność am-

Ryc. 2. Porównanie trwałości luminolu i odczynnika BLUESTAR® w ciągu 48 godzin od momentu przygotowania. Ilustracja przedstawia plamy krwi przygotowane z czterech różnych próbek krwi rozcieńczonych roztworem soli fizjologicznej w stosunku 1:500. „h” – czas, w godzinach, od momentu przygotowania odczynnika do jego użycia.
 Fig. 2. Test of luminol and BLUESTAR® stability during 48 hours from preparation. Figure presents blood stains prepared from four different blood samples, diluted 1:500 with 0.9% NaCl. „h” – time between reagent preparation and its use in hours.

h	Luminol	BLUESTAR®	h	Luminol	BLUESTAR®
1			10		
2			12		
4			24		
6			36		
8			48		

Ryc. 3. Porównanie chemiluminescencji luminolu i roztworu BLUESTAR® w zetknięciu z plamami otrzymanymi z wyciągów z 25-letnich zeszkobin z trzech różnych próbek krwi.
 Fig. 3. Comparison of action luminol and BLUESTAR® solution on old blood stains. Figure represent blood stains prepared from three different 25 years old bloods by dilution in solution physiological salt.

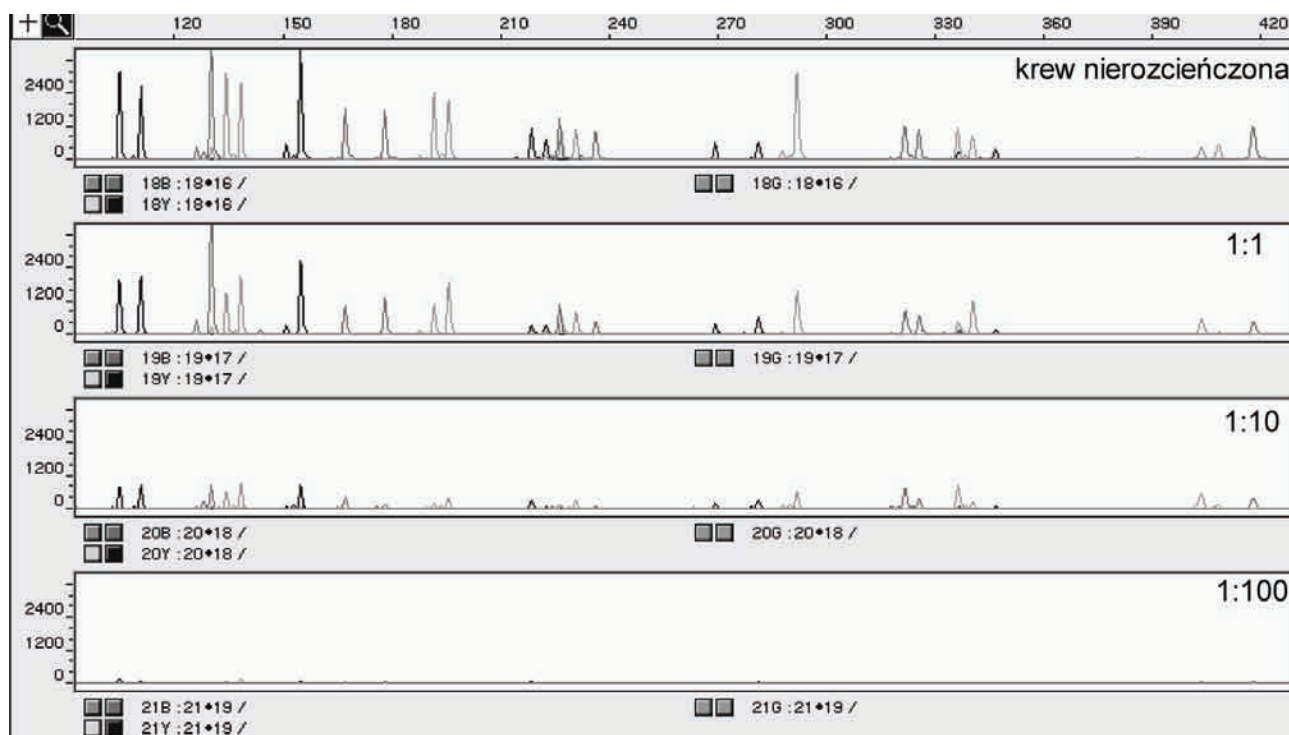
Luminol	BLUESTAR®

plifikacji DNA z plam poddanych działaniu luminolu lub odczynnika Bluestar® mają takie czynniki jak stosowana metoda izolacji i oczyszczania DNA, stosowany system amplifikacji multipleksowej, ilość odczynnika zużytego do spryskania danego śladu, czas po jakim pobrano próbkę do izolacji DNA itp.

Biorąc pod uwagę całokształt danych otrzymanych w toku eksperymentów przeprowadzonych dla potrzeb niniejszej pracy można stwierdzić, że zarówno luminol jak i odczynnik Bluestar® charakteryzują się bardzo podobnymi właściwościami jako reagenty wykorzystywane we wstępnych testach obecności krwi. Wydłużona w stosunku do lumino-

Ryc. 5. Przykładowe wyniki amplifikacji 8 μ l roztworu DNA otrzymanego z plam przygotowanych z krwi o różnym stopniu rozcieńczenia i spryskanych odczynnikiem Bluestar®. Strzałki wskazują fragmenty DNA, które amplifikują się z obniżoną wydajnością, prowadząc do „wypadnięcia” allelu z profilu genetycznego (ang. „allelic drop-out”). W przypadku plam krwi spryskanych roztworem luminolu obserwowano podobny efekt.

Fig. 5. Example of amplification of 8 μ l of DNA solution obtained from bloodstains made of diluted blood and treated with Bluestar® reagent. Arrows show DNA fragments that amplify with lower efficiency („allelic drop-out” phenomenon). Similar results were obtained when luminol solution was used.



Iu trwałość odczynnika Bluestar® może w niektórych sytuacjach stanowić istotny argument przemawiający za jego zastosowaniem, jednak oba odczynniki, prawidłowo przygotowane i użyte, charakteryzują się bardzo podobną, wysoką czułością wykrywania plam krwi przygotowanych z bardzo rozcieńczonej krwi. Należy również zauważyć, że zgodnie z danymi uzyskanymi przez innych autorów oraz wynikami przeprowadzonych eksperymentów w ramach niniejszej pracy, otrzymanie ilości DNA wystarczającej do amplifikacji jest możliwe w przypadku plam zawierających krew rozcieńczoną co najwyżej w stosunku 1:1000, podczas gdy zastosowanie luminolu bądź odczynnika Bluestar® pozwala wykryć ślady krwi w rozcieńczeniu 1:50 000 lub wyższym. Nie można zatem wykluczyć, że przypisywana luminolowi zdolność blokowania reakcji amplifikacji wynika w rzeczywistości z faktu, że ślady krwawe poddawane amplifikacji po ujawnieniu za pomocą luminolu w rzeczywistości nie zawierają ilości DNA wystarczającej do otrzymania profilu genetycznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Sutton T. P.: Presumptive testing for blood w „Scientific and Legal Applications of Bloodstain Pattern Interpretation” pod red. S. H. James, CRC Press LLC 1999, Boca Raton, 47-70
2. Quickenden T. I., Ennis C. P., Creamer J. I.: The forensic use of luminol chemiluminescence to detect traces of blood inside motor vehicles, *Luminescence* 2004; 19:271-277.
3. Manna A. D., Montpetit S.: A novel approach to obtaining reliable PCR results from luminol treated bloodstains, *J Forensic Sci* 2000; 45(4):886-890.
4. www.bluestar-forensic.com/gb/download.php
5. Budowle B., Leggitt J. L., Defenbaugh D. A., Keys K. M., Malkiewicz S. F.: The presumptive reagent fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA, *J Forensic Sci* 2000; 45(5):1090-1092.
6. Gross A. M., Harris K. A., Kaldun G. L.: The effect of luminol on presumptive tests and DNA ana-

lysis using the polymerase chain reaction, *J Forensic Sci* 1999; 44(4):837-840.

7. Garofano L., Pizzamiglio M., Marino A., Brighenti A., Romani F.: A comparative study of the sensitivity and specificity of luminol and fluorescein on diluted and aged bloodstains and subsequent STRs typing, *International Congress Series* 2006; 1288:657-659

8. Barbaro A., Cormaci P., Teatino A., Barbaro A.: Validation of forensic DNA analysis from blood-

stains treated by presumptive test reagents, *International Congress Series* 2004; 1261:631-633

Adres do korespondencji:

Sylvia Łuczak, CM Bydgoszcz UMK Toruń

Katedra Medycyny Sądowej

tel. +48 52 585 3552

e-mail: kizmedsad@cm.umk.pl