

Mladen MILOSAVLJEVIĆ

LUMINOLSKI TEST – FORENZIČKI ASPEKT

1. UVOD

Oblast ekspertiza tragova krvi predstavlja izuzetno složen segment u dijelu ispitivanja tragova biološkog porijekla. Generalno posmatrano ekspertize tragova krvi odvijaju se u tri nivoa: 1) identifikacija tragova krvi, 2) određivanje porijekla tragova krvi i 3) određivanje krvne grupe (izvan ovog sistema je određivanje individualizirajućih segmenata traga krvi kroz oblast ekspertiza DNA analiza). U tom smislu, u ovom radu obradićemo samo jedan od testova iz kategorije presumptivnih – luminolski test, a vezano za identifikaciju tragova krvi (testovi za identifikaciju tragova krvi dijele se na presumptivne i nedvojbene).

1.1. Identifikacija tragova krvi (da li trag potječe od krvi)

Uzorci dostavljeni na ispitivanje uvijek se podvrgavaju identifikacijskom testu kao prvom stupnju u seriji forenzičnih seroloških ispitivanja. Svi testovi za identifikaciju prisustva krvi baziraju se na detekciji hemoglobina. Hemoglobin sadrži dva dijela: hem-dio koji je povezan sa globin proteinskim dijelom. Ovi testovi su utemeljeni na detekciji hem dijela ili hemo derivata (modificirani hem koji je kemijski različit od onog u svježoj krvi). Hemo derivati mogu biti prisutni u uzorku kao prirodan rezultat sušenja i starenja krvi ili mogu biti pripremljeni namjerno kao temelj za primjenu testa. Ovi identifikacijski testovi općenito se dijele na vjerojatne (presumptivne) i potvrdne (nedvojbene) koji se razlikuju u ovisnosti od toga da li je test potpuno specifičan za hem ili za hemoglobin.

1.1.1. Presumptivni (vjerojatni) testovi identifikacije tragova krvi

Svi presumptivni testovi koji se obično koriste su karakteristični testovi, što potječe od činjenice da se svi utemeljuju na katalitičkoj aktivnosti hema u hemoglobinu. Sam hemoglobin nije biološki katalizator (enzim) u organizmu, ali molekula ima određeni peroksidazni aktivitet koji se može demonstrirati u test tubi koristeći različite oksidirajuće supstrate. "Supstrat" je neka organska molekula koja se može podvrći kemij-skoj reakciji koja može biti katalizirana (ubrzana) sa nekim enzimatskim katalizatorom. Supstrati korišteni u ovim testovima mogu se podvrći oksidacijskoj reakciji sa vodik peroksidom. "Peroksidaza" je enzim (proteinski katalizator) koji može ubrzati ovu oksidacijsku reakciju, a hem dio hemoglobina djeluje slično "peroksidazi" u ovim testovima. Samo reakcija kataliziranja "peroksidazom" može se općenito napisati kao: $AH_2 + H_2O_2 = A + 2H_2O$, gdje je AH_2 neki oksidirajući supstrat, a "A" njegov oksidirani oblik. H_2O_2 je vodik peroksid, a H_2O voda. Mnoštvo različitih supstancija je korišteno kao supstrat za katalitički test. Neki od tih testova su nazvani po supstratu, a neko po pronalazaču. Presumptivni testovi su pravljani kao brzi i priručni, a tako da su supstrati izabrani na način da su komponente "AH₂" i "A" bezbojne i obojene respektivno ili da su različite boje. Upravo radi toga, promjene boje ili pojava obojenih produkata, označuje pozitivan rezultat. Katalitičnu (sličnu peroksidazi) aktivnost krvi otkrio je Schonbein 1857. godine koristeći gvajak kao oksidirajući supstrat.

Tijekom vremena, mnoge supstancije su korištene za identifikaciju krvi, a najvažnije od njih su date u tabeli 1.

Katalitični testovi su veoma osjetljivi. Neki od njih su u mogućnosti da detektiraju krv u razblaženju sa vodom 1:1.000.000. Međutim, bitno je napomenuti da oni nisu sasvim specifični za krv. Postoje dvije veće skupine materija koje mogu dati lažno pozitivne rezultate sa ovim testovima (jaki oksidansi i biljne peroksidaze).

Prisustvo pomenutih materija može se otkriti dodavanjem prvo test reagensa u odsustvu peroksida. Pozitivan rezultat u ovom dijelu postupka je dobar pokazatelj da je prisutan jak oksidans. Biljne peroksidaze su toplotno labilne, dok uporedna katalitična aktivnost hema nije. U situaciji ako uzorak daje pozitivnu reakciju, on se može zagrijati i nakon toga ponovo testirati. Postojanost pozitivne reakcije je indikativna za krv.

Reagens i/ili naziv testa	Autor i godina
Guaiacum (Van Deen – ov, Day – ov test)	Van Deen (1862), Day (1867)
Aloin	Klunge (1882)
Phenolphthalein (Kastle – Mayer – ov test)	Kastle i Sheed (1901) Mayer (1903)
Benzidin (Adler – ov test)	Adler i Adler (1904)
Leucomalachitgreen	Adler i Adler (1904)
O – Tolidin	Ruttan i Heredisty (1912)
O – Toluidin	Gershenfeld (1939)
O – Dianisidin	Owen i dr. (1958)
Tetramethylbenzidin	Garner i dr. (1967)
Luminol	Specht (1937)
Fluorescein	Le i dr. (1979)

Tabela 1 : Katalitički reagensi

1.1.1.1. Luminolski test – Analiza rezultata

Jedan od reagenasa koji se može koristiti za potrebe presumptivnih proba, je luminol (3 - aminoftalhidrazid). Bitno je istaći da luminol ne reagira kao ostali reagensi dati u tabeli 1. Bez obzira na određene razlike (mehanizam reakcije) treba primijeniti iste obzire kod testiranja luminolom kao i kod katalitičnog testa. Pod izvjesnim uslovima luminol je kemiluminiscentan kada se podvrgava oksidaciji u alkalnoj otopini.

Ovaj fenomen je prvi zapazio Lommel, mada to nije publicirao. Albrecht je prvi proučio reakciju u detalje, a 1937. godine je Specht napravio sudsko - medicinski identifikacijski test za krv sa luminalom. Ove autore i ove datume (uz neke druge detalje) potrebno je dodatno elaborirati. Spojevi 3 aminoftalhidrazid (5-amino 2,3 - dihidroftalazin 1,4 - dijon) prvi je sintetizirao Schmitz¹ 1902. godine. Za vrijeme sinteze primjetio je jaku fluorescenciju plave boje u rastvorima kiselina. Lommel je, 1927. godine, po prvi put primjetio plavu luminiscenciju nakon oksidacije ovog spoja u

¹ Schmitz, A (1902): Über das hydrazid der trimensinsäure und der hemimellitsäure, Inaug. Dissertation Heidelberg cited in Curtis T. and Simper A. (1913): Ber. Btsch. Chem. Ges. 46 : 1162.

alkalnim rastvorima. Njegov rad nije nikada objavljen, ali je Albrecht² (jedan od njegovih saradnika) 1928. godine, potvrdio i objavio Lommelovo otkriće. Albrecht je također istakao da krv i svjež paradajz sok izazivaju da hemikalije proizvode jaku luminiscenciju u prisustvu hidrogen peroksida (H₂O₂). Huntress³ je 1934. godine nazvao spoj luminola proizvođačem svjetla.

Gleu i Pftannstiel⁴ su 1936. godine potvrdili Albrecht – ovu teoriju o luminolu i krvi. Oni su naveli da luminol neće davati luminiscenciju u prisustvu prokuhanih biljnih peroksida, a da luminol pomiješan sa čistim hematinom daje najsjajniju plavu luminiscenciju.

Razvoj kriminogenih aktivnosti kroz različite vidove organiziranog kriminala uzrokovao je sve veći broj slučajeva u kojima se koristi luminol. Tako se sve više pojavljuju slučajevi kada se brojni tragovi tretiraju reagensom luminola na mjestu izvršenja krivičnog djela, a nakon toga se odnose u laboratoriju na dalja ispitivanja. Tada se od vještaka u laboratoriji traži da izvrši kompletnu serološku analizu spornog uzorka. Na ovom mjestu je važno napomenuti da se neinformisano osoblje službi kriminalističke tehnike koje radi na licu mjesta ponekad opire upotrebi luminol testa kao poželjnijeg testa za analizu krvi na terenu. Ovaj njihov stav u budućnosti se treba promijeniti. Ovo tim prije što su reagensi dostupni na tržištu, a i dolaze u neserima. Upravo zbog toga može se očekivati da luminol test bude pogrešno primjenjen od strane neobučениh policajaca (baš zbog toga treba težiti kontinuiranoj edukaciji onih službenika koji u svom poslu mogu očekivati primjenu ovog reagensa). U narednom dijelu navešćemo niz zanimljivih informacija o efektima luminolskih sprejeva koji se koriste u serološkoj analizi čistih sasušениh mrlja krvi. Osim toga dodatno će biti navedene prednosti i mane luminolskih testova kao i prijedlozi koji se tiču adekvatne aplikacije luminolskih testova na mjestu izvršenja krivičnog djela. Rezultati ovih studija demonstriraju da luminol denaturira većinu enzima krvi u kratkom vremenu.

² Albrecht, H. O. (1928): *Über die chemilumineszenz des aminophthalsäurehydrazid, Z. Physiol. Chem.* 136 : 321.

³ Huntress, E. Stanley, L. and Parker, A. (1934): *The preparation of 3 aminophthalhydrazid for use in the demonstration of chemiluminescence; J. Am. Chem. Soc.* 56: 241 – 242.

⁴ Gleu, K. and Pftannstiel, K. (1936): *Über 3 – aminophthalsäurehydrazid, J. Prakt. Chem.* 146 : 137.

Korištenje luminola kao preliminarnog testa na krv prvi je predložio Specht⁵, 1937. godine. On je naspregao krv na grmlju, kamenu, zidu, hrđavoj željeznoj ogradi, namještaju, kamenim stepenicama i bašti. Onda je pustio da krv bude izložena različitim atmosferskim uticajima u trajanju od četrnaest dana nakon čega je na nju nanio luminolsku smjesu i fotografisao rezultate. Smjesa je bila spravljena od 0,1% luminola u 5% vodenom rastvoru natrijum karbonata (Na_2CO_3) i 15% rastvora H_2O_2 koji se dodaje odmah prije samog nanošenja smjese. Krv se mogla odrediti i u vodi, sapunskom vodenom rastvoru i vodi u kanalizaciji.

Luminolski test se pokazao kao dobar i kod svježih i kod odstajalih mrlja krvi; u suštini, što je starija mrlja to je pozitivna reakcija jača.

Proescher i Moody⁶ su 1939. godine potvrdili Specht – ovu teoriju koristeći Specht – ovu smjesu. Oni su otkrili mrlje krvi na papiru, vlaknima, željeznim cijevima nakon što su ove stvari bile izložene uticajima atmosferilija u trajanju od tri godine. Dakle, došlo je do pojave luminiscencije na mrljama krvi starim 3 godine. Dodatno su ustanovili da osušena i raspadnuta krv daje jaču luminolsku reakciju od svježeg krvi. Kada luminiscencija prestane ona se može ponovno izazvati nanošenjem svježeg luminola. Sasušene mrlje krvi mogu proizvesti luminiscenciju mnogo puta. Svježeg sasušene mrlje krvi mogu dati bolju luminiscenciju, ako se prije nanošenja luminola na njih aplicira 1 do 2% rastvor hlorovodonične kiseline. Luminolska reakcija je izazvana i kod krvi ljudskog i životinjskog porijekla.

Hematin je otkriven i kod razblaženja od 1 : 10^8 . Najvažniju izjavu su dali Proescher i Moody⁷ (1939) koja se tiče aplikacije luminola u forenzičkoj serologiji: "Luminol ne smeta spektroskopskim, hemijskim ili precipitatnim testovima koji se koriste za konačnu identifikaciju krvi. Kristali hematina i hemohromogena u sasušenoj mrlji krvi se dobijaju nakon više puta ponovljenog tretiranja krvi sa luminolom. Precipitatni test se može primjeniti ako nije došlo do razlaganja krvi".

⁵ Specht, W. (1937): Die chemiluminescenz des Hamins ein hilfsmittel zur auffinding und erkennung forensissch wichtiger lutsuren, Angew. Chemie 50 : 155 – 157.

⁶ Proescher, F. and Moody, A. M. (1939): detection of bloody means of chemiluminescence, J. Lab. Clin. Med. 24 : 1183 – 1189.

⁷ Isto.

Lytle i Hedgecock⁸ (1978) su eksperimentisali sa efektima smjese luminola i natrijum perborata (NaBO_2) na krv. tada su zaključili: "...luminol je relativno nedestruktivan na okruženje (nije korozivan i ne ostavlja mrlje) a nakon nanošenja na krv (ne sprječava dalje identifikacione testove ili analize za utvrđivanje krvnih grupa, ali ipak ometa elektroforenzičku analizu eritrocita sa fosfataznom kiselinom i fosfoglukomutazom)".

Oni su preporučili luminol kao "dobar terenski test" koji je osjetljiv i dovoljno specifičan na krv".

Luminolski test je poznat kao izuzetno osjetljiv na krv. Thornton⁹ je, 1986. godine, izjavio da se golim okom može vidjeti plava luminiscencija luminola sa krvi razblaženja $1 : 10^4$. Sa korištenjem infracrvenog svjetla luminiscencija se može vidjeti i kod razblaženja krvi od $1 : 10^5$ do $5 : 10^6$.

U literaturi o luminolu (Gundermann¹⁰ 1965; Schneider¹¹ 1970; Gaennsslen¹² 1983; Kraul i Meyer¹³ 1941; Wei i White¹⁴ 1971; Roswell i White¹⁵ 1978) istraživači su naveli i lažne pozitivne rezultate (kod luminiscencije luminola u odsustvu krvi) kod alkalnog luminola u prisustvu željeza, bakra, hipohlorida, mangan peroksida i fericijanida. Lažni negativni rezultati (kada postoji prisustvo krvi) dobijaju se kod nanošenja luminola na materijale presvučene kadmijumom. Kadmijum se koristi kao zaštitni materijal pošto je otporan na koroziju.

Hemijski mehanizam luminolskih reakcija se treba proučiti u cilju boljeg razumijevanja samih rezultata. Hemijska luminiscencija se definiše kao dobijanje svjetla pomoću hemijskih sredstava. Nastaje kada se elektroni iz

⁸ Lytle, L. and Hedgecock, D. G. (1978): Chemiluminescence in the visualization of forensic bloodstains, *J. Forensic Sci.* 25 : 550 – 562.

⁹ Thornton, J. I., Guariono, K., Rios, F. G. and Cashman, P. J. (1986): Enhancement of the luminal test by means of light amplification, *J. Forensic Sci.* 31 : 254 – 257.

¹⁰ Gundermann, K. D. (1965): Chemiluminescence in organic compounds, *Angew. Chemie (international edition)* 4: 566 – 573.

¹¹ Schneider, H. W. (1970): A new long lasting luminal chemiluminescent cold light, *J. Chem. Educ.* 47 : 519 – 522.

¹² Gaennsslen, R. (1983): Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. United States department of Justice, Washington, D. C.

¹³ Kraul, R. and Meyer, H. (1941): Ist der Nachweis von blutspuren durch 3 aminophthalsäurehydrazid ein kennzeichnendes verfahren? *Angew. Chemie* 54 : 213 – 215.

¹⁴ Wei, C. and White, E. H. (1971): An efficient chemiluminescent hydrazide: benzo (ghi) perylene – 1, 2 – dicarboxylic acid hydrazide, *tetrahedron letters* 39 : 3559 – 3562.

¹⁵ Roswell, D. F. and White, E. H. (1978): The chemiluminescence of luminal and related hydrazides, *methods Enzymol.* 57 : 409 – 499.

pobuđenog stanja vraćaju u nepobuđeno stanje. Elektroni dolaze u pobuđeno stanje putem hemijske energije. To zahtijeva primjenu hemijske reakcije koja će dati najmanje 40 do 70 kcal/mol energije kao što je slučaj kod reakcija slobodnih radikala. Ovdje nije potrebna energija zračenja kao što je to slučaj kod fluorescencije (Wildes i White¹⁶ 1973.).

Osnova kod luminolnog testa je reakcija oksidacije. Alkalni rastvor luminola će oksidirati u prisustvu H₂O₂ i kristaliziranih hematin – peroksidnih sistema. Rezultirajuća reakcija oksidacije vidljiva je u obliku plave hemijske luminiscencije.

Thornton i Maloney¹⁷ su, 1985. godine, proučavali hemijske mehanizme luminolskih reakcija. Slika koju je prezentirao Thornton predstavlja rad mnogih istraživača na mehanizmu reakcije oksidacije luminola. Mnogi od koraka reakcije oksidacije nisu ni do danas razjašnjeni.

Može se konstatovati da su za navedenu reakciju najvažnije stavke:

- 1) Potreban je oksigen.
- 2) Anionski oblik luminola je reaktivan.
- 3) Slobodni radikali su uključeni u reakciju što daje hemijsku energiju od 40 do 70 kcal/mol koliko je potrebno za hemijsku luminiscenciju (Brundrett¹⁸, 1972.).
- 4) Nitrogen je produkt reakcije.
- 5) Sam mehanizam pretvorbe je potpuno nepoznat.

¹⁶ Wildes, P. D. and White, E. H. (1973): Differences between excited states produced chemically and photochemically. Ion pairs of excited states derived from luminal, J. Am. Chem. Soc. 95 : 2610 – 2617.

¹⁷ Thornton, J. I. and Maloney, R. S. (1985): The chemistry of the luminal reaction – where to from here? CAC Newsletter, September, pp. 9 – 17.

¹⁸ Brundrett, R. B., Roswell, D. F. and White, E. H. (1972): Yields of chemically produced excited states, J. Am. Chem. Soc. 94 : 7536 – 7541.

Materijali i metode - luminolskog testa

Najčešće se navodi da kod luminola u korištenju dominiraju dvije odvojene smjese koje se sastoje od sljedećeg (vidjećemo da postoje i izuzeci):

Luminolska smjesa 1 (Specht, 1973)

Prvi dio – 0,1 gr luminola i 5,0 gr Na₂CO₃ se rastvori u 50 ml destilovane vode.

Drugi dio – 0,7 gr NaBO₂ se rastvori u 50 ml 95% etanola.

Luminolska smjesa 2 (modifikovana)

Prvi dio – 0,1 gr luminola i 5,0 gr Na₂CO₃ se rastvori u 90 ml destilovane vode.

Drugi dio – 10 ml 3% H₂O₂.

Važno je napomenuti da se dijelovi uvijek pripremaju odvojeno i unaprijed, a pomiješaju se prije same upotrebe. Apliciranje na spornu mrlju/trag vrši se pomoću spreja u obliku aerosola ili indirektno kapaljkom u destilovanu vodu u koju je umočen tampon sa prethodno uzetim spornim uzorkom. Luminolska smjesa u spreju nanosi se u potpuno mračnoj i dobro prozračnoj prostoriji. Kontrolori (kontrolni uzorci) za pozitivnu i negativnu reakciju moraju se uvijek primijeniti kod svakog testiranja – a to su nesporni uzorak humane krvi, bakreni novčić, sterilni tamponi i čiste pamučne krpe.

U eksperimentalnim radovima testirane su šezdeset i dvije sasušene mrlje krvi kako bi se utvrdila osjetljivost kod rada u laboratoriji. Testirane mrlje krvne grupe A su išle od 100 mikrolitara u seriji razblaženja od 1 : 10 do 1 : 10⁸. Mrlje su bile na čistim pamučnim krpama, a korištene su Whatnman 1 filter papiri i staklene mikroskopske pločice. Sve mrlje su sasušene na zraku u digestorima.

Četrdeset pet sasušenih mrlja nerazblažene krvi u količini od 100 mikrolitara grupe A, AB i O (za svaku krvnu grupu po 15 uzoraka) bilo je nanešeno na ista vlakna, isti papir i staklo. Ove mrlje su bile izložene i luminolskoj smjesi 1 i 2. Uzeto je i osamdeset briseva tamponom. Uzorci su onda serološki analizirani u sljedećim koracima:

1) *Preliminarni test na krv sa fenolftaleinom*

Po Kastle – Meyer metodi (Kastle¹⁹ 1909; Kastle i Shedd²⁰ 1901), redukovani oblik fenolftaleina se stavlja na bris koji je uzet sa sporne mrlje; onda se 3% rastvor H₂O₂ nanosi na bris pomoću kapaljke. Pozitivna reakcija je kada se boja uzorka na tamponu promjeni iz bezbojne u ljubičastu/crvenu.

2) *Hemohromogen test na krv*

Formiranje kristala hemohromogena se promatra pod mikroskopom, a procjena se vrši nakon aplikacije Takayama reagensa i toplotne energije na mrlje tretirane i netretirane luminolom (Takayama²¹ 1912).

3) *Utvrđivanje porijekla krvi*

Antihumani serum se počeo proizvoditi iz zečeva, Proom – ovom²² metodom (1943). Ekstrakt pufera salina i luminola i nenasprejane mrlje krvi će reagovati sa pripremljenim zečijim serumom u skladu sa Uchterlony^{23, 24, 25, 26, 27} metodom (1948; 1949a; 1949b; 1949c; 1968). Identične precipitativne veze se kreiraju što je znak pozitivne reakcije (pogledati naredno).

4) *ABO sistem krvnih grupa*

¹⁹ Kastle, J. H. (1909): Chemical tests for Blood. United States hygienic laboratory Bulletin 51. United States Public Health and Marine Hospital Service, U. S. Government Printing Service, Washington D.C.

²⁰ Kastle, J. and Shedd, O. (1901): Phenolphthalein as a reagent for the oxidizing ferments, Am. Chem. J. 26 : 526 – 539.

²¹ Takayama, M. (1912): A method for identifying blood by hemochromogen crystallization, Kokubyo Gakkai Zasshi 306 : 463 – 481.

²² Proom, H. (1943): The preparation of precipitating sera for the identification of animal species, J. pathol. Bacteriol. 55 : 419 – 426.

²³ Uchterlony, O. (1948): Antigen – antibody reaction in gels, Arkh. Kemi. Mineral. Geol. 26B : 14.

²⁴ Uchterlony, O. (1949a): Antigen – antibody reactions in gels, Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 26 : 507 – 515.

²⁵ Uchterlony, O. (1949b): Antigen – antibody reactions in gels II. Factors determining the site of the precipitate, Arkh. Kemi. 1: 43 – 48.

²⁶ Uchterlony, O. (1948c): Antigen – antibody reactions in gels III. The time factor, Arkh. Kemi 1 : 55 – 59.

²⁷ Uchterlony, O. (1968): Handbook of Immunodiffusion and Immunological Elektrophoresis. Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan.

Testiranje ABO antigena se vršilo putem tehnike apsorpcije – elucije (Kind 1960a; 1960b²⁸; Outteridge 1962²⁹; 1965a³⁰; 1965b³¹). Reverzibilno testiranje ABO antitijela je postignuto Latter metodom (Latter 1927; 1928). Sigurna identifikacija je samo ako se dobije pozitivna reakcija kod oba testa. Obje metode se oslanjaju na mikroskopsko procjenjivanje zgrušavanja, a stepen zgrušanosti se određuje po sljedećim kriterijumima:

- + 4 – jedna čvrsta skupina – kao nakupljanje eritrocita,
- + 3 – nekoliko većih skupina,
- + 2 – nakupljenja srednje veličine na jasnoj podlozi,
- + 1 – mala nakupljanja (tripleći i dubletićelija),
- 0 – nema nakupljanja.

5) *Analiza polimorfnih enzima krvi (Wraxal³², 1978)*

Fosfoglukomutaza (PGM) – Izoelektrično fokusiranje (IEF) podtipova (Budowle 1984a³³; 1985³⁴; 1986³⁵).

Eritrocit fosfatazne kiseline (EAP) – IEF (Budowle 1984b³⁶).

Esteraze D/Gluksolaze I (EsD/GLO) – elektroforeza sa agarom (Budowle 1984a; 1985; Budowle i Gambel³⁷ 1988).

²⁸ Kind, S. (1960b): Absorption – elution grouping of dried bloodstains on fabrics, *Nature* 187 : 789 – 790.

²⁹ Outteridge, R. A. (1962): Apsoption – elution method of grouping bloodstains, *Nature* 195 : 818 – 819.

³⁰ Outteridge, R. A. (1965a): The biological individuality of dried human bloodstains, *J. Forensic Sci. Soc.* 5 : 22 – 51.

³¹ Outteridge, R. A. (1965b): Recent Advances in the Grouping of Dried Blood and secretion Stains.

³² Wraxall, B., Bordeaux, J. and Harmor, G. (1978): Final report – Bloodstains Analysis System. Aerospace Corporation Sub Contract#67854.

³³ Budowle, B. (1984a): Phosphoglucomutase – 1 subtyping of human bloodstains on ultrathin layer polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 5 : 165 – 167.

³⁴ Budowle, B. (1985): An agarose gel method for typing phosphoglucomutase – 1, esterase D or glyoxalase, I, *J. Forensic Sci.* 30 : 1216 – 1220.

³⁵ Budowle, B., Murch, R. S., Davidson, L. C., Gambel, A. M. and Kearney, J. J. (1986): Subtyping phosphoglucomutase – 1 in semen stains and bloodstains: A report on the method, *J. Forensic Sci.* 31 : 1314 – 1348.

³⁶ Budowle, B. (1948b): Rapid electrofocusing of erythrocytes acid phosphatase, *Electrophoresis*.

³⁷ Budowle, B. and Gambel, A. M. (1988): A hybrid amphlyte focusing technique for esterase D subtyping of evidentiary material, *J. Forensic Sci.* 33 : 738 – 743.

Peptidaza A – elektroforeza sa agarom (Parkin³⁸ 1978) Adenozin diaminaza/adenilat kinaza (ADA/AK) – elektroforeza sa agarom (Murch³⁹ 1986).

6) *Serumski proteini*

Haptoglobin (HP) – poliakrilamid gel, elektroforeza (Budowle i Chow⁴⁰ 1985).

Specifične komponente grupe (Gc) i transferin (Tf) – Imunofiksacija (Apler i Johnson⁴¹ 1969).

Rađeni su dupli setovi, 15 iz svake grupe, iz krvne grupe A (čista i do razblaženja 10^{-8}), zatim nerazblažena krv mrlja grupe AB i O koja se nalazi na pamučnim krpama, papiru i staklu što se čuva na sobnoj temperaturi u trajanju od dva mjeseca. Za ovu studiju, dakle, trebale su starije mrlje krvi. One se tretiraju na isti način kao i svježiji uzorci krvi. Interesantno je papomenuti da je krv koja se koristila u ovoj studiji prikupljena od volontera uposlenih u FBI laboratoriji, a uzeta je iz prsta.

2. REZULTATI

2.1. Procjenjivane osjetljivosti

Korištene su tri različite skupine kod testiranja osjetljivosti luminola. Sasušene mrlje krvi grupe A i nekoliko mrlja različitog razblaženja i to su:

- 1) sprej luminolske smjese 1 ili 2 u obliku aerosola direktno se nanosi;
- 2) protrlja se sa tamponom namočenim u destilovanu vodu (tampon na koji je nanosena mrlja nasprejan je sa luminolskom smjesom 1 ili 2) ili

³⁸ Parkin, B. H. (1978): The typing of peptidase A in bloodstains, J. Forensic Sci. Soc. 18 : 65 – 67.

³⁹ Murch, R. S., gambel, A. M. and Kearny, J. J. (1986): A double origin electrophoretic method for the simultaneous separation of adenosine deaminase, adenylate kinase and carbonic anhydrase II, J. Forensic Sci. 31 : 1349 – 1356.

⁴⁰ Budowle, B. and Chow, G. H. (1985): Discontinuous polyacryamide gel electrophoresis for typing haptoglobin in bloodstains, J. Forensic Sci. 30 : 893 – 897.

⁴¹ Alper, C. and Johnson. A. (1969): Immunofixation electrophoresis – A technique for the study of protein polymorphisms, Vox. Sang. 17 : 445 – 452.

- 3) se uzorak uzima sa čistim tamponom kao u drugom slučaju, izuzev što se luminolska smjesa nanosi putem kapaljke.

Rezultati eksperimenata o osjetljivosti luminola navedeni su u tabeli 2.

Tabela 2 - procjena osjetljivosti							
Razblaženja Krv	Lum 1 sprej	Lum 2 Sprej	Lum 1 kapaljka	Lum 2 kapaljka	pH	Lum 1 sprej+pH	Lum 2 sprej+pH
Čista	pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv
10^{-1}	pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv
10^{-2}	pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv
10^{-3}	wk	Pozitiv	Wk	pozitiv	pozitiv	pozitiv	pozitiv
10^{-4}	wk	Wk	Negativ	pozitiv	negativ	negativ	negativ
10^{-5}	negativ	Negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
10^{-6}	negativ	Negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
10^{-7}	negativ	Negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
10^{-8}	negativ	Negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ

Obje luminolske smjese su dale rezultate približno jednake osjetljivosti. Obje su otkrile prisustvo krvne grupe A u čistom stanju i do razblaženja od 10^{-4} . Način nanošenja luminola (direktno sprejem na mrlju ili indirektno putem kapaljke na uzeti uzorak mrlje) nema uticaja na osjetljivost otkrivanja prisustva krvi kod svježih mrlja. Rezultati su bili isti nezavisno na koji je materijal mrlja bila nanešena, platno, papir ili staklo. Drugi skup svježih mrlja krvi je također bio testiran sa fenolftaleinom koji se nanosio kapaljkom. Fenolftalein je potvrdio prisustvo krvi od čiste krvi do razblaženja od 10^{-3} , ali ne i razblaženjima većim od 10^{-3} . Ovi rezultati su bili isti na sva tri materijala na koja se mrlja nanosila. Pošto su mrlje naspregnute sa luminolskim smjesama također su testirane i sa fenolftaleinskom metodom. U ovim slučajevima fenolftalein je potvrdio prisustvo krvi samo do razblaženja od 10^{-2} . U skladu s tim, mrlje krvi koje su bile tretirane luminolom na terenu umanjuju naknadnu mogućnost potvrđivanja sa fenolftaleinom.

Serološka analiza:

Niti jedna luminolska smjesa nema utjecaja na formiranje hemohromogenih kristala u sasušanim mrljama krvi, a to je dovoljno jak indikator za prisustvo krvi. Nezavisno o testovima za utvrđivanje porijekla krvi, niti jedna luminolska smjesa nema utjecaja na formiranje precipitatne veze između zečijeg antihumanog seruma i ekstrakta tretirane sasušene humane krvi u mrljama kada se poredi sa onima koje nisu tretirane.

Rezultati eksperimenata koji su se bavili efektima luminola kod testiranja ABO krvne grupe u sasušanim mrljama krvi navedeni su u tabeli 3.

Koristeći se apsorpciono – elucionom metodom određivanja ABO krvnih grupa u sasušanim mrljama krvi sljedeći eritrociti antigena mogu se otkriti:

Mrlja A grupe – A i H eritrocitni antigen,
 Mrlja B grupe – B i H eritrocitni antigen,
 Mrlja AB grupe – A, B i H eritrocitni antigeni i
 Mrlja O grupe – H eritrocitni antigen.

Tabela 3

ABO napredno određivanje antigena			ABO reverzibilno određivanje antigena			
	A	B	H	A	B	O
A	+4	0	+4	0	+4	0
AL1	+2	0	+4	0	+4	0
AL2	+1	0	+4	0	+4	0
AB	+4	+4	+4	0	0	0
ABL1	+4	+2	+2	0	0	0
ABL2	+4	+2	+2	0	0	0
O	0	0	+4	+4	+3	0
OL1	0	0	+4	+4	+3	0
OL2	0	0	+4	+4	+3	0

L1=luminolska smjesa 1
 L2=luminolska smjesa 2

Tretiranje nerazblaženih sasušanih mrlja krvi grupe A, AB i O sa bilo kojom luminolskom smjesom ne može u potpunosti odrediti prisustvo odgovarajućih antigena eritrocita. I pored toga, bilo bi netačno reći da su antigeni eritrocita potpuno nereaktivni sa luminolom. Kada se luminolska smjesa nanese na nerazblaženu sasušenu mrlju krvi grupe A veoma je mala vjerovatnoća da se otkriju antigeni eritrocita grupe A u poređenju sa netretiranim uzorcima. Luminol/perborat (smjesa 1) omogućava otkrivanje

H i A antigena eritrocita iz mrlja krvne grupe A; ali ipak reakcija zgrušavanja A antigena eritrocita je znatno manje intenzivna nego kod uzoraka koji nisu tretirani (+4 je rezultat zgrušavanja kod netretiranog uzorka, a +2 za zgrušavanje kod tretiranog). Luminol/peroksid (smjesa 2) također može otkriti A i H antigene eritrocita u mrljama krvi grupe A; ali ipak reakcija zgrušavanja A antigena eritrocita je manje intenzivna nego nakon tretmana sa luminol/perborat smjesom (+2 je rezultat za zgrušavanje kod upotrebe smjese 1, a +1 kod upotrebe smjese 2). Reakcija zgrušavanja za H antigene eritrocita je jednaka kod obje smjese, a jednaka je reakciji kod netretiranih uzoraka (+4 rezultat zgrušavanja).

Slični rezultati u otkrivanju antigena eritrocita su također dobiveni kod analize nerazblaženih mrlja krvi grupe AB sa luminolom. Prisustvo A, B i H antigena eritrocita je otkriveno u svim tretiranim uzorcima. Obje luminolske smjese otkrivaju A, B i H antigene eritrocita; ali zgrušavanje B i H antigena je bilo znatno manjeg intenziteta kod tretiranih uzoraka u poređenju sa netretiranim (rezultat zgrušavanja je +4 kod netretiranih uzoraka a +2 kod uzoraka tretiranih luminolskim smjesama). Zgrušavanje A antigena eritrocita je nepromijenjeno neovisno od toga da li je uzorak tretiran luminolom ili ne (rezultat zgrušavanja +4).

Mogućnost da se u potpunosti otkrije prisustvo H antigena eritrocita u sasušanim mrljama krvi grupe O nisu podložne uticaju luminolskih smjesa u poređenju sa netretiranim uzorcima (rezultat zgrušavanja je +4).

Kod primjene Lattes metode u sasušanim mrljama krvi, mogu se otkriti sljedeća antitijela:

Mrlja krvi grupe A – anti – B antitijelo,
mrlja krvi grupe B – anti – A antitijelo,
Mrlja krvi grupe AB – nema ABO antitijela,
Mrlja krvi grupe O – anti – A i anti – B antitijela.

Tretiranje nerazblaženih sasušanih mrlja krvi grupa A, AB i O sa luminolom nema nikakav uticaj na otkrivanje antitijela seruma. Reakcije zgrušavanja su identične kod tretiranih i netretiranih uzoraka.

2.2. Analiza polimorfizma enzima krvi

2.2.1. PGM podgrupa:

Netretirana mrlja krvi grupe A je identifikovana kao PGM podtip 2 – 2+, dok su netretirane mrlje krvi grupa AB i O identifikovane kao PGM podtipovi 1+2+. Nakon tretmana sa bilo kojom od luminolskih smjesa 2-2+ veze su još uvijek vidljive, ali je njihov intenzitet umanjen u poređenju sa netretiranim kontrolnim uzorkom. Neke nove veze ili neobjašnjena aktivnost enzima nije primjećena prilikom mjerenja na elektroforezi.

Veze 1+2+ kod PGM podtipa u drugim mrljama su bile jedva vidljive nakon tretiranja sa luminol/perboratnom smjesom.

Neke nove veze ili neobjašnjen aktivnost enzima nije primjećena. Kod tretiranja sa luminol/peroksidnom smjesom kod očitavanja PGM aktiviteta u AB i O uzorcima je nemoguća.

2.2.2. EAP:

Netretirane mrlje krvne grupe A identificirane su kao EAP tip B, a AB mrlje kao tip EAP tip A i O mrlje kao EAP tip BA. Svi uzorci koji su bili tretirani luminolom dali su intenzivnu fluorescenciju pod uticajem UV svjetlosti u blizini anode bez zabilježene migracije ka katodi. Zbog toga rezultati ovog testiranja smatrali su se nedovoljno jasnim.

2.2.3. Ostali enzimi krvi:

Enzimska aktivnost slijedećih enzimskih sistema nije otkrivena nakon tretmana sa bilo kojom luminolskom smjesom:

EsD/GLO Peptidaza A ADA/AK

2.3. Analiza proteina krvi:

2.3.1. HP:

Netretirana mrlja krvi grupe A je identifikovana kao HP tip 2-1, mrlja krvi AB kao tip 2, a mrlja krvi grupe O kao HP tip 1. Nakon tretmana sa obje luminolske smijese primjećene su tamnosmeđe pruge na poliakrilamidnom gelu.

Neke nove veze nisu primjećene kod uzoraka tretiranih luminolom. Te smeđe pruge nisu uticale na ispravnost očitovanja heptoglobinskih tipova.

2.3.2. Gc i Tf:

Svi tipovi su određeni kao Gc tip 1. Netretirane mrlje krvi grupe A i O su identificirane kao Tf tip C dok su netretirane mrlje krvi grupe AB identificirane kao tip Tf tip CD. Kod Gc sistema svi uzorci tretirani luminolom su čitljivi, a primjećene su i diskretne svijetleće veze. U Tf sistemu svi uzorci tretirani luminolom su čitljivi, ali su preovladavale pruge na gelu. Veze su mnogo svijetlije nego kod uzoraka koji su netretirani. Neke nove veze ili neobjašnjene aktivnosti nisu primjećene nakon luminolskog tretiranja ni kod Gc ni Tf sistema.

2.4. Stare mrlje

Dupli broj mrlja je pušten da odstoji na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 mjeseca kako bi se mogli simulirati testovi na starim mrljama krvi. Ove mrlje su bile podvrgnute istim serološkim metodama sa svježim uzorcima prethodno navedenim. Rezultati ovih eksperimenata su dati u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Procjena osjetljivosti starih mrlja			
	Lum 1 Sprej	Lum 2 sprej	pH
nerastvor	Pozitiv	pozitiv	Pozitiv
10 ⁻¹	Pozitiv	pozitiv	Pozitiv
10 ⁻²	Pozitiv	pozitiv	Pozitiv
10 ⁻³	Pozitiv	wk	Wk
10 ⁻⁴	Wk	wk	Wk
10 ⁻⁵ - 10 ⁻⁸	Negativ	negativ	negativ
wk = slaba pozitivna reakcija (slabiji intenzitet svjetlosti od pozitivne reakcije) pH = preliminarni test fenolftaleinom			

Tabela 5. Stare mrlje

	ABO određivanje antigena			ABO reverzibilno određivanje antitijela		
	A	B	H	A	B	O
A	+4	0	+4	0	+4	0
AL1	+2	0	+4	0	+4	0
AL2	+2	0	0	0	+4	0
AB	+4	+4	+4	0	0	0
ABL1	+4	+4	0	0	0	0
ABL2	+4	+4	0	0	0	0
O	0	0	+4	+4	+4	0
OL1	0	0	+4	+4	+4	0
OL2	0	0	+4	+4	+4	0

L1 = Luminolska smjesa 1
L2 = Luminolska smjesa 2

Starenje ne smanjuje osjetljivost niti jednog luminolskog preparata. Niti jedna luminolska smjesa ne utiče na formiranje kristala hemohromogena i antihumanu precipitaciju seruma.

Kod korištenja metode ABO apsorpcione elucije pronađeno je dosta sličnosti sa efektima koje luminol ima na stare mrlje krvi u poređenju sa svježim. Primjećena je umanjena sposobnost otkrivanja A antigena erotricita nakon tretiranja uzorka luminolom datih mrlja krvi grupe A (+4 zgrušavanje netretiranih starih mrlja krvi, a tretiranih luminolom +2).

Kao što je ranije opisano slični rezultati su dobijeni nakon tretiranja svježih mrlja krvi luminolom.

Tretiranje starih mrlja krvi grupa A i AB luminolom, je rezultiralo umanjeno mogućnošću da se otkrije H antigen eritrocita. U starim mrljama krvi grupe A, luminol/perborat, smjesa 1, nije imala utjecaj na otkrivanje H antigen eritrocita (+4 zgrušavanje). U istoj staroj mrlji krvi grupe A, luminol/peroksid, smjesa 2, je učinila da je H antigen eritrocita nemoguć za otkriti (nije primjećeno zgrušavanje). Otkrivanje H antigen eritrocita sa obje luminolske smjese u staroj mrlji krvi grupe AB je nemoguće (nije primjećeno zgrušavanje). Kod luminolom tretiranih starih mrlja krvi grupe O otkrivanje H antigena eritrocita je moguće (+4 rezultat zgrušavanja).

Otkrivanje ABO antitijela u starim mrljama krvi Lattes – ovom metodom je potpuno neovisno o tome da li je uzorak tretiran luminolom ili ne. Glavna

razlika između starih i svježih mrlja krvi tretiranih luminolom je u PGM enzimu krvi. Iako se određivanje PGM podtipova može uraditi na svježim mrljama krvi tretiranih luminolom kod starijih je to neizvodivo. Kao i kod svježih mrlja tretiranih luminolom, i kod starih mrlja tretiranih luminolom, nije zabilježena PGM enzimska aktivnost u sljedećim sistemima: EsD, GLO, ADA, AK i peptidaza A. U EAP sistemu rezultat se ne može tumačiti zbog odsustva migracije. Što se tiče serumskih proteina, HP tip 2 – 1 se može tumačiti kod starih tretiranih mrlja; ali ipak HP tip2 i HP tip 1 ne može zbog prisustva intenzivnih smeđih pruga u gelu. Nije primjećena proteinska aktivnost kod starijih uzoraka tretiranih luminolom u Gc/Tf sistemima. Ovi sistemi su određivi kod svježih mrlja tretiranih luminolom.

2.5. Dodatne informacije o luminolskom testu

Interesantno je istaći da slabiju luminiscenciju mogu dati i jedinjenja olova, fericijanidi, čađ, klorid zlata, klorofil i dr.

Za izvođenje luminolske probe moguće je napraviti i sljedeći reagens (potvrda da postoji više od dvije ranije predložene varijante; očito je da eksperti i analitičari sami biraju različite kombinacije sastojaka za luminolski test):

1. 0, 1 gr luminola (3-aminofthalhidrazid)
2. 5, 0 gr NaHCO₃
3. 15 ml 30% vodik peroksida
4. 100 ml destilovane vode

Otopinu luminola treba držati u tamnim bocama (i u mraku), a obavezno je izvršiti i kontrolu prije svake probe. Najbolje je da se otopina napravi neposredno prije analize. Po nekim autorima dobre osobine ove metode su i u tome što se krv ne uništava⁴² (mada ima i drugačijih mišljenja o kojima smo pisali u ranijem dijelu), tako da se nakon izvršene luminolske probe mogu vršiti i druga ispitivanja.

Luminolska proba primjenjuje se kod ispitivanja većih površina (zemljište, zidovi, zavjese, prekrivači, podovi i dr.) sa kojih su tragovi krvi isprani kišom, vodom ili su premazani zidnom bojom. Proba se izvodi tako da se luminolska otopina rasprši po sumnjivim mjestima. Ograničavajući faktor je to što se proba mora obaviti u mraku (ili u zamračenoj prostoriji) odnosno

⁴² Lukić, M., Pejaković, S. : Sudska medicina, Privredno finansijski vodić, Beograd.

noću, jer luminol u prisustvu tragova krvi svijetli (pojava hemiluminiscencije). Često se luminolom mogu dokazati sasvim nevidljivi tragovi krvi, a osim toga i utvrditi njihova lokalizacija, rasprostranjenost i oblik. Najoptimalnije vrijeme reakcije je 15 minuta nakon nanošenja reagensa. Zapaženo je da se dobri rezultati postižu i sa do 1 godine starim mrljama. Po mišljenju nekih eksperata luminolska proba predstavlja najosjetljiviju reakciju za detekciju mikrotragova krvi (jedan prema milion).⁴³ Nešto starije informacije i autori su navodili da je ovo veoma osjetljiva metoda i da se javlja i kod odnosa 1 : 500 000, što praktično znači da se može utvrditi kap krvi u dvije stotine litara vode.⁴⁴

3. ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije nam pokazuju da bi forenzički serolozi kao i osoblje koje se bavi obradom mjesta izvršenja krivičnog djela trebali razmisliti o korištenju luminolskih reagenasa kao testova za utvrđivanje prisustva krvi.

Jednostavna primjena luminolskih testova kao i rezultirajuća hemijska luminiscencija sasušeni mrlja krvi čine luminol izuzetno upotrebljivim za osoblje koje radi na obradi mjesta izvršenja krivičnog djela. Potrebno je zapamtiti da nepravilna upotreba luminola može negativno uticati na istragu kao i što može poboljšati rad kada se pravilno upotrebljava.

U prošlosti, namjena luminola je bila da se koristi kao test za utvrđivanje prisustva krvi u slučajevima kada je postojala sumnja za njeno prisustvo, a nije bila vidljiva golim okom.

Tipična primjena luminola je u obliku spreja, iako je na analitičaru da odluči u kojem će obliku primijeniti luminol. Alkalna otopina luminola spremljena u tamne boce relativno dugo vremena hemijski je stabilna i samim tim upotrebljiva. Kada se alkalni luminol pomiješa sa izvorom hidroksil jona, upotrebljivost ove smjese je u trajanju od 1 sat. Zbog toga se preporučuje da u nesereru za obrađivanje mjesta izvršenja krivičnog djela budu razdvojene komponente luminolskog reagensa za svježije spravljanje prije same upotrebe.

U nizu urađenih eksperimenata utvrđeno je da su NaBO_2 i H_2O_2 , najbolji izvori za hidroksilne jone. NaBO_2 , nakon miješanja sa alkalnim luminolskim

⁴³ Simonović, B. (2004): Kriminalistika, Pravni fakultet u Kragujevcu.

⁴⁴ Marković, T. (1972): Savremena tehnika istraživanja krivičnih djela (kriminalistika), Zagreb.

reagensom često zna začepiti sprej bocu. H_2O_2 je mnogo lakše pomiješati sa alkalnim luminolom i pokazao se kao mnogo primjenjiviji.

Kao što je prethodno naglašeno, luminol se može primijeniti direktno iz spreja ili indirektno na tampon pomoću kapaljke gdje se ni u jednoj metodi ne gubi na osjetljivosti. Ako se primjenjuje u obliku spreja predlažu se sljedeći koraci:

- 1) Luminolska smjesa bi se trebala nanositi u tamnom i prozračnom prostoru. Za luminol se pokazalo da je i osrednje toksičan za jetru i bubrege (Schneider 1970); zbog toga bi se ljudi trebali manje izlagati ovom spreju.
- 2) Nesporni uzorci krvi i bakarni novčići bi se trebali uključiti u test kao pozitivni kontrolori pri korištenju luminolskih sprejeva kao indikatori uspješnosti i stepena relativnosti intenziteta reakcije hemijske luminiscencije.
- 3) Lažni pozitivni rezultati se mogu dobiti luminolom. Stabilni metali ili zadržala unutrašnjost vozila će sijati nakon tretiranja sa luminolom čime se simulira pozitivna test reakcija luminola.
- 4) Fotografski aparat bi trebao biti na raspolaganju ako se uoči bilo kakva luminiscencija. Ponovno nanošenje luminolskog spreja pojačat će blijedi sjaj (Thornton i Murdock⁴⁵ 1966; Zweidinger⁴⁶ 1973).

Ako se koristi tampon, prvo se treba umočiti u spornu mrlju, a zatim se taj tampon tretira luminolom. Bilo koje područje tampona koje sija, odnosno daje reakciju hemijske luminiscencije trebalo bi označiti i očuvati radi dalje analize gdje će se koristiti standardne metode.

Rezultati ove studije su pokazali da luminol denaturira većinu enzima krvi nakon što se oni izlože njemu u nerazblaženom stanju. Samo se ograničeni broj proteina može odrediti tretiranjem uzoraka luminola. Mogućnost određivanja potpunog biohemijskog profila uzorka krvi je krajnji i ultimativni cilj forenzičke serologije. Luminol ozbiljno ugrožava ovu mogućnost i umanjuje mogućnost profiliranja uzorka. Još jednom napominjemo da postoje i drugačija mišljenja.

Dakle, ovaj rad je samo jedan u nizu koraka koji pokušavaju objasniti mogući uticaj luminola na neke druge – naredne analize koje sljede nakon

⁴⁵ Thornton, J. I. and Murdock, J. E. (1966): Photography of the luminal reaction in crime scenes, *Criminologist* 10 : 15 – 19.

⁴⁶ Zweidinger, R. A., Lytle, L. T. and Pitt, C. G. (1973): Photography of bloodstains visualized by luminal, *J. Forensic Sci.* 18 : 296 – 302.

identifikacije krvi. Sva šarolikost dobijenih rezultata (iako preovladava stav o njegovom uticaju na određene analize) pokazuje svu složenost problema. Tek će vrijeme pred nama, i nadam se budući eksperimenti u potpunosti riješiti neke od prisutnih dilema.

Vrlo je važno shvatiti da je luminol preliminarni test za određivanje mogućeg prisustva krvi i da kao sam nije dovoljan. Način upotrebe luminola na mjestu izvršenja krivičnog djela se procjenjuje zasebno za svaki slučaj. Ako se preliminarni testovi moraju uraditi na licu mjesta, trebalo bi poduzeti sljedeće: kod vidljive krvi očuvati mrlju, odgovarajuće je upakovati i poslati u kriminalističku laboratoriju na analizu. Ako nema vidljive krvi, onda razmotrite primjenu luminola.

LITERATURA

1. Albrecht, H. O. (1928): Uber die chemiluminescenz des aminophthalsurehydrazid, *Z. Physiol. Chem.* 136 : 321.
2. Aleksić, Ž. (1972): Naučno otkrivanje zločina, Beograd.
3. Alper, C. and Johnson, A. (1969): Immunofixation electrophoresis – A technique for the study of protein polymorphisms, *Vox. Sang.* 17 : 445 – 452.
4. Alter, A., Aron, A., Richard, R. (1964): *Blood*, 5, 600.
5. Brundrett, R. B., Roswell, D. F. and White, E. H. (1972): Yields of chemically produced excited states, *J. Am. Chem. Soc.* 94 : 7536 – 7541.
6. Budowle, B. (1948b): Rapid electrofocusing of erythrocytes acid phosphatase, *Electrophoresis*.
7. Budowle, B. (1984a): Phosphoglucomutase – 1 subtyping of human bloodstains on ultrathin layer polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 5 : 165 – 167.
8. Budowle, B. (1985): An agarose gel method for typing phosphoglucomutase – 1, esterase D or glyoxalase, I, *J. Forensic Sci.* 30 : 1216 – 1220.
9. Budowle, B. and Chow, G. H. (1985): Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis for typing haptoglobin in bloodstains, *J. Forensic Sci.* 30 : 893 – 897.
10. Budowle, B. and Gambel, A. M. (1988): A hybrid amphlyte focusing technique for esterase D subtyping of evidentiary material, *J. Forensic Sci.* 33 : 738 – 743.
11. Budowle, B., Murch, R. S., Davidson, L. C., Gambel, A. M. and Kearney, J. J. (1986): Subtyping phosphoglucomutase – 1 in semen stains and bloodstains: A report on the method, *J. Forensic Sci.* 31 : 1314 – 1348.
12. Connor, J. M., and Ferguson – Smith, M. A. (1984): *Essential Medical Genetics*, Blackwel, Sc. Publ. Oxford.
13. Douglas, R. (1983): A study of the errors produced when weak antibodies are tested by indirect antiglobulin method, *Pathology*, 15 : 183.
14. Dunsford, I., Bowley, C. (1955): *Techniques in Blood Grouping*, London, Oliver and Bond Edinburg.
15. Gaennsslen, R. (1983): *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry*. United States department of Justice, Washington, D. C.

16. Giblett, E. R. (1977): Blood group alloantibodies: an assesment of some laboratory practice, transfusion, 17 : 298.
17. Gleu, K. and Pfannstiel, K. (1936): Uber 3 – aminophthalsauurehydra-zid, J. Prakt. Chem. 146 : 137.
18. Goldstein, J. (1984): Biochemical manipulation of blood groups. Clin. Immunol. Aller. 4 : 489.
19. Gorkić, S. (1972): O tragovima biološkog porijekla u kriminalističkoj obradi, Beograd.
20. Grouchy, J. De and Turleau, C., (1977): Clinical Atlas of Human Chromosomes. Wiley Medical Publication, new York, 256 – 260.
21. Gundermann, K. D. (1965): Cheminiluminiscence in organic compo-unnds, Angew. Chemie (international edition) 4: 566 – 573.
22. Hakomori, S. (1981): Blood groups ABH and antigens of human erythrocyte: chemistry, polymorphism and their developmental change, Sem. Hematol. 18 : 39.
23. Heisto, H. (1979): Pretransfusion blood group serology, transfusion, 19 : 761.
24. <http://www.forenzika.com>, dostupan septembra 2006.
25. Huntress, E. Stanley, L. and Parker, A. (1934): The preparation of 3 aminophthalhydrazid for use in the demonstration of chemilumini-scence; J. Am. Chem. Soc. 56: 241 – 242.
26. Inhulsen, D. (2001): Kriminaltechnik auf neuen Wegen? Kriminalis-tik, 667 – 669..
27. James, S. H., Nordby, J. J. (2007): Forensic Science, Taylor&Francis Group.
28. Janssen, H. (1999): The DNA database in The netherlands, 1st IN-TERNATIONAL DNA USER'S CONFERENCE 24tf – 26th November 1999. in Lyons.
29. Jovanović, K. (1973): Kriminalistička tehnika, VŠUP Srbije, Beograd.
30. Kastle, J. and Shedd, O. (1901): Phenolphthalein as a reagent for the oxidizing ferments, Am. Chem. J. 26 : 526 – 539.
31. Keith, S. (1967): Modern trends in forensic, Butterwort, London.
32. Kestle, J. H. (1909): Chemical tests for Blood. United States hygienic laboratory Bulletin 51. United States Public Health and Marine Hos-pital Service, U. S. Government Printing Service, Washington D.C.
33. Kind, S. (1960b): Absorption – elution grouping of dried bloodstains on fabrics, Nature 187 : 789 – 790.
34. Koning, J. (1999): Das DNA – Identitatsfestellungsgesetz (DNA – IdFG), Kriminalistik, 3, 325 – 327.

35. Kraul, R. and Meyer, H. (1941): Ist der Nachweis von blutspuren durch 3 aminophthalsäurehydrazid ein kennzeichnendes verfahren? *Angew. Chemie* 54 : 213 – 215.
36. Ladd i ostali (1999): A Systematic Analysis of secondary DNA transfer, *Journal of Forensic Science*, 6, 1270 – 1272.
37. Lee, H. (1998): Materijalni tragovi, Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske, Zagreb.
38. Lessin, L. S., Bessis, M., u Williams, W. J. i sar. (1977): *Hematology*. McGraw - Hill, New York, 103.
39. Lukić, M., Pejaković, S. (1975): *Sudska medicina*, PFV, Beograd, 269 - 293.
40. Lytle, L. and Hedgecock, D. G. (1978): Chemiluminescence in the visualization of forensic bloodstains, *J. Forensic Sci.* 25 : 550 – 562.
41. Mac Vie, S. I., Morton, J. A., Pickles, M. M. (1967): The reactions and inheritance of a new blood group antigen, Sd^a. *Vox. Sang.* 13 : 485 - 492.
42. Maksimović, R. (2000): *Kriminalistika – tehnika*, Policijska akademija, Beograd.
43. Marković, T. (1972): *Savremena tehnika istraživanja krivičnih djela (kriminalistika)*, Zagreb.
44. May, J. (1941): Beziehungen zwischen Kohlenxydkonzentration der luft und Kohlenoxydhamoglobingehalt des Blutes, *Arch. Gewebepath.* 10 : 97.
45. Milosavljević M.(2000): *Osnovi forenzičke biologije*, Udruženje građana «Obrazovanje gradi BiH», Sarajevo.
46. Murch, R. S., gambel, A. M. and Kearny, J. J. (1986): A double origin electrophoretic method for the simultaneous separation of adenosine deaminase, adenylate kinase and carbonic anhydrase II, *J. Forensic Sci.* 31 : 1349 – 1356.
47. Nekahata, T i sar. (1982): *Blood*, 59 - 857.
48. Ouchterlony, O. (1948c): Antigen – antibody reactions in gels III. The time factor, *Arkh. Kemi* 1 : 55 – 59.
49. Ouchterlony, O. (1949a): Antigen – antibody reactions in gels, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 26 : 507 – 515.
50. Ouchterlony, O. (1949b): Antigen – antibody reactions in gels II. Factors determining the site of the precipitate, *Arkh. Kemi.* 1: 43 – 48.
51. Ouchterlony, O. (1968): *Handbook of Immunodiffusion and Immunological Elektrophoresis*. Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan.

52. Outteridge, R. A. (1965a): The biological individuality of dried human bloodstains, *J. Forensic Sci. Soc.* 5 : 22 – 51.
53. Outteridge, R. A. (1965b): Recent Advances in the Grouping of Dried Blood and secretion Stains.
54. Outteridge, R. A. (1962): Adsorption – elution method of grouping bloodstains, *Nature* 195 : 818 – 819.
55. Parkin, B. H. (1978): The typing of peptidase A in bloodstains, *J. Forensic Sci. Soc.* 18 : 65 – 67.
56. Parks, D. E., Chisari, F. W. u Williams W.J. i sar. (1983): *Hematology*, McGraw - Hill, New York, 923.
57. Perlick, E., Plenert, W, Prokop, O., Stobe (1977): *Fortschritte der Hamotologie Band. Blutgruppen*, Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
58. Proescher, F. and Moody, A. M. (1939): detection of bloody means of chemiluminescence, *J. Lab. Clin. Med.* 24 : 1183 – 1189.
59. Proom, H. (1943): The preparation of precipitating sera for the identification of animal spines, *J. pathol. Bacteriol.* 55 : 419 – 426.
60. Robertson – Vignaux (1995): *Interpreting Evidence, Evaluating Forensic Science in the Courtroom*, Chichester.
61. Roswell, D. F. and White, E. H. (1978): The chemiluminescence of luminal and related hydrazides, *methods Enzymol.* 57 : 409 – 499.
62. Schmitz, A (1902): *Über das hydrazid der trimensinsäure und der hemimellitsäure*, Inaug. Dissertation Heidelberg cited in Curtis T. and Simper A. (1913): *Ber. Btsch. Chem. Ges.* 46 : 1162.
63. Schneider, H. W. (1970): A new long lasting luminal chemiluminescent cold light, *J. Chem. Educ.* 47 : 519 – 522.
64. Simonin, C. (1962): *Medicine Legale Judiciace*, 3. Ed., Maloine, Paris.
65. Simonović B. (2004): *Kriminalistika*, Pravni fakultet, Kragujevac.
66. Sneath, J. S., Sneath, P. H. A. (1959): Adsorption of blood substances from serum on the red cells. *Brit. Med. Bull.* 15 : 154 - 157.
67. Snedecor, G. W., Cochran, W. G. (1967): *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames.
68. Specht, W. (1937): Die chemilumineszenz des Hamins ein hilfsmittel zur auffinding und erkennung forensissch wichtiger lutsuren, *Angew. Chemie* 50 : 155 – 157.
69. Specht, W. (1937): Die chemilumineszenz des Hamins ein hilfsmittel zur auffinding und erkennung forensissch wichtiger lutsuren, *Angew. Chemie* 50 : 155 – 157.
70. Srahl, A. J. (1963): La structure des substances specifique des groupes sanguines, *Biologie Medicale*, 5 : 283 - 318.
71. Stratton, F., Renton, P. (1958): *Practical Bloodgrouping*, Oxford, Blackwell.

72. Takayama, M. (1912): A method for identifying blood by hemochromogen crystallization, *Kokubyo Gakkai Zasshi* 306 : 463 – 481.
73. Thornton, J. I. and Maloney, R. S. (1985): The chemistry of the luminal reaction – where to from here? *CAC Newsletter*, September, pp. 9 – 17.
74. Thornton, J. I. and Murdock, J. E. (1966): Photography of the luminal reaction in crime scenes, *Criminologist* 10 : 15 – 19.
75. Thornton, J. I., Guariono, K., Rios, F. G. and Cashman, P. J. (1986): Enhancement of the luminal test by means of light amplification, *J. Forensic Sci.* 31 : 254 – 257.
76. Tippet, P. (1983): Blood group chimeras, *Vox. Sang.* 44 : 333.
77. Watkins, M. M. (1966): Bloodgroup substances. *Science*, 152 : 172 - 181.
78. Wei, C. and White, E. H. (1971): An efficient chemiluminescent hydrazide: benzo (ghi) perylene – 1, 2 – dicarboxylic acid hydrazide, *tetrahedron letters* 39 : 3559 – 3562.
79. White, C., Winstein, J. (1947): Blood derivatives and substitutes, Baltimore.
80. Wildes, P. D. and White, E. H. (1973): Differences between excited states produced chemically and photochemically. Ion pairs of excited states derived from luminal, *J. Am. Chem. Soc.* 95 : 2610 – 2617.
81. Wraxall, B., Bordeaux, J. and Harmor, G. (1978): Final report – Bloodstains Analysis System. Aerospace Corporation Sub Contract#67854.
82. Zonderman, J. (1999): *Beyond the Crime Lab*, New York.
83. Zweidlinger, R. A., Lytle, L. T. and Pitt, C. G. (1973): Photography of bloodstains visualized by luminal, *J. Forensic Sci.* 18 : 296 – 302.