

IZABELA BRDAKIĆ\*, ANTONIA BOKŠIĆ\*\*, IVAN JERKOVIĆ\*\*\*, IVANA KRUŽIĆ\*\*\*\*,  
ŽELJANA BAŠIĆ\*\*\*\*\*

## Detekcija tragova krvi Combur3-testom® nakon tretiranja sredstvima za čišćenje

### Sažetak

*U radu se istraživala djelotvornost preliminarnog testa za krv Combur3-test® E traka u otkrivanju tragova krvi na bijeloj pamučnoj tkanini. Za potrebe istraživanja napravljena su tri seta testova. Prvi set testova nije sadržavao krv već je nakon tretiranja tkanine vodom i sredstvima za čišćenje testiran Combur3-test® E trakama. U drugom je setu testova ispitana svježa krv na tkanini, dok je u trećem ispitana sasušena krv, obje nakon ispiranja vodom i sredstvima za čišćenje. Combur3-test® pokazao je pozitivne rezultate sa svježom krvi u svim ispitivanim slučajevima (6/6). U testu sa sasušenom krvi koja je tretirana deterdžentom i izbjeljivačem test je bio negativan u dva od šest ispitivanih slučajeva (2/6). Stoga je prilikom uporabe Combur3-test® E traka potreban oprez kad se sumnja na pokušaj uklanjanja tragova krvi čišćenjem ili pranjem uobičajenim sredstvima u domaćinstvu.*

**Ključne riječi:** tragovi krvi, preliminarni testovi za detekciju krvi, Combur3-test®, istraživanje mjesta događaja, tretiranje tragova sredstvima za čišćenje.

---

\* Izabela Brdakić, studentica, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu.

\*\* Antonia Bokšić, studentica, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu.

\*\*\* Ivan Jerković, doktorant, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu.

\*\*\*\* Ivana Kružić, docent, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu.

\*\*\*\*\* Željana Bašić, docent, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu.

## UVOD

Prilikom istraživanja mjesta događaja, posebice kod krvnih delikata, tragovi krvi predstavljaju najvažniju vrstu traga, jer omogućavaju rekonstrukciju događaja i identifikaciju osoba koje su u njemu sudjelovale. Iako postoje brojni testovi za identifikaciju krvi i identifikaciju osoba, na mjestu događaja su iznimno značajni preliminarni testovi za detekciju, odnosno otkrivanje krvi. Razlog leži u tome što je na mjestu događaja, prilikom prikupljanja relevantnih tragova i predmeta, važno utvrditi radi li se uistinu o krvi ili ne.

Preliminarni testovi najčešće se rabe tijekom dinamičkog dijela očevida kada je potrebno utvrditi postojanje relevantnog traga. Uglavnom se temelje na kemijskim, fizikalnim ili enzimskim reakcijama, a postoji ih više vrsta: testovi za krv, spermu i ostale tjelesne tekućine. Iznimno su značajni jer forenzičarima služe kao orijentacijska proba koja je brza i lako primjenjiva, dok istražitelje usmjeravaju u njihovoj istrazi. Međutim, ovakvi testovi nisu dovoljno pouzdani jer ponekad mogu dati i lažno pozitivne rezultate, pa se naknadno redovito rabe potvrdni testovi u laboratorijima. Neki od poznatih preliminarnih testova za krv su: fenolftaleinski (Kastle – Meyer-ov®) test, luminolski test, benzidinski test, leukomalahitski test (LMG), tetrametilbenzidinski test (TMB, npr. Hemastix® trake) te o-toluidinski test (Primorac et al., 2014).

Testovi za krv temelje se na njezinom kemijskom sastavu i svojstvima. Krv je crvena, viskozna tekućina koja se sastoji od krvnih stanica (eritrocita, leukocita i trombocita) te krvne plazme. Važnost krvi je u prenošenju kisika do svih stanica u tijelu te odnošenje ugljikovog dioksida. Ovu ulogu imaju eritrociti odnosno njihova glavna sastavnica – hemoglobin koji im daje crvenu boju, te se upravo na tome bazira većina preliminarnih testova na krv (Primorac et al., 2014).

Korištenje preliminarnih testova za krv započelo je već u 19. stoljeću kada je Nijemac Schönbein dokazao reakciju između vodikova peroksida i hemoglobina iz krvi što je služilo kao poticaj razvoju ostalih preliminarnih testova. Prvi test za dokazivanje krvi rabljen u forenzici benzidinski je test koji se temelji na kolorimetriji, odnosno reakciji između kromogena i oksidirajućeg agensa koju katalizira hemoglobin iz krvi (Stock, 2005). Rabe se i drugi kolorimetrijski testovi, kao što su fenolftaleinski test i TMB. Osim kolorimetrije, rabe se i testovi temeljeni na kemiluminiscenciji i fluorescenciji (npr. luminol). Luminol je kemijski spoj koji ima svojstvo kemiluminiscencije i često se rabi u forenzičnim istraživanjima zbog vizualnog efekta kojeg stvara prilikom reakcije sa željezom iz hemoglobina. Efekt kojeg stvara svjetlost je plave boje te traje 30 sekundi, što je dovoljno da bi istražitelji to dokumentirali. Da bi luminol djelovao potrebno ga je pomiješati s oksidirajućim agensom. Nakon miješanja s oksidirajućim agensom ravnomjerno se popraska po površini na kojoj se pretpostavlja da postoji trag krvi te se čeka njegovo djelovanje. Testiranje se provodi u zamračenoj prostoriji (Barni et al., 2007). Luminol se najčešće rabi kada se radi o latentnim tragovima, odnosno onima oku nevidljivim. On ujedno ima i najveću osjetljivost, pa ga se smatra i najpouzdanijim (Webb et al., 2006), ali ga velika osjetljivost čini osjetljivim i na lažno pozitivne rezultate (Primorac et al., 2014).

Osim luminola rabe se i Hemastix® trake koje sadrže tetrametilbenzidin i peroksid, a reagiraju na peroksidaznu aktivnost hemoglobina. Ove trake lako su dostupne i jeftine i stoga se često rabe kao preliminarna metoda testiranja postojanja krvi. Jednostavne su za korištenje i njihova reakcija jako je brza (Primorac et al., 2014).

Jedan od važnijih testova je i Combur3-test® (slika 1) odnosno plastične trake koje na sebi imaju tri polja od kojih jedno reagira na hemoglobin, drugo na proteine, a treće na glukozu. Polje za detekciju krvi sadrži organski hidropersoksid i tetrametilbenzidin koji predstavljaju kolorimetrijske indikatore. Prisutnost hemoglobina uzrokuje oksidaciju koja dovodi do promjene boje polja iz žute u zelenoplavu (Laberke et al., 2011). Test je jednostavan i brz za korištenje, a osjetljivost mu varira. Postoji mogućnost lažno pozitivnih rezultata u slučajevima prisutnosti različitih oksidansa, primjerice metala poput željeza ili bakra te povrća ili životinjskih peroksidaza u tragovima (Conti i Vecchiotti, 2017).



Slika 1: Combur3-test® (<https://www.capesmedical.co.nz/>- 21. 4. 2017.).

Iako su već napravljena brojna ispitivanja preliminarnih testova za otkrivanje tragova krvi, većina istraživanja nije obuhvatila i *Combur3-test*® E trake, a dosadašnja su se istraživanja većinom orijentirala na testove poput luminolskog i Hemastix trakama (Webb et al., 2006). Osnovna namjena *Combur3-test*® E traka je u medicini za brzu detekciju bubrežnih bolesti, urinarnih infekcija i dijabetesa. Kako je krv u urinu jedan od glavnih indikatora ovih bolesti, jedno polje trake sadrži reagens za detekciju već malih količina krvi u uzorku urina. Stoga se ove trake, koje se jednostavnije nabavljaju od Hemastix traka, u Hrvatskoj uglavnom koriste za preliminarnu detekciju krvi na mjestu događaja i u forenzičnom laboratoriju. Stoga se, s obzirom na učestaliju uporabu *Combur*® testa u forenzici, kao i na nedostatak podataka iz znanstvenih istraživanja o njegovim mogućnostima otkrivanja tragova krvi, javlja potreba za njegovim daljnjim testiranjem.

Cilj ovog rada jest testirati tragove krvi *Combur3-test*® E trakama kako bi se utvrdila njihova osjetljivost i pouzdanost primjene u stvarnim forenzičnim okolnostima.

## 1. MATERIJALI I METODE

U radu je korištena venska krv bez konzervansa (2 ml po uzorku), bijela pamučna tkanina, komercijalna sredstva za čišćenje (tekući sapun Ordinary, deterdžent za pranje suđa Cleffekt (Lidl Stiftung & Co.), izbjeljivač Blistal Cream (SAPONIA d.d, na bazi natrijeve soli - do-decilbensulfonske kiseline i kokos dietanolamida), dezinfekcijsko sredstvo Skinman® Soft N (Ecolab Inc., na bazi 2-propanola i benzalkonij klorida)) te preliminarni test (*Combur3-test*® E trake (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Krv je izvađena na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. Bijela pamučna tkanina (nova i nenošena) je prije tretiranja oprana običnom vodom i osušena na zraku.

Bijela pamučna tkanina izrezana je na 18 manjih fragmenata – po šest za svaki set ispitivanja. Za potrebe prvog seta ispitivanja na tkaninu nije nanescna krv, već samo voda i sredstva za čišćenje. Za drugi set ispitivanja u središte svakog obilježenog fragmenta tkanine kapaljkom je nanescna svježa krv koja na prvom fragmentu tkanine nije ispirana, na drugom je isprana vodom, u preostalim slučajevima isprana je sredstvima za čišćenje, slijedom: voda, sapun, deterdžent, izbjeljivač te dezinfekcijsko sredstvo. U trećem setu ispitivanja na fragmente tkanine nanescna je svježa krv koja se potom sušila tri dana te se naknadno tretirala istim slijedom kao u drugom testu. Prilikom testiranja sasušene krvi destilirana voda nanescna je na testnu traku, potom je testirana sasušena krv na tkanini.

U prvom koraku istraživanja, odnosno uzorku bez krvi, na tkaninu su nanescni voda i sredstva za čišćenje, i to slijedom: voda, sapun, deterdžent, izbjeljivač, dezinfekcijsko sredstvo, dok je prvi komad tkanine testiran bez nanošenja ikakvih sredstava. Odmah nakon ispiranja vodom i sredstvima za čišćenje pristupilo se testiranju *Combur3-test*® E trakama.

U drugom setu ispitivanja svježe nakapana krv na prvom komadiću tkanine nije tretirana, dok su ostali komadići tretirani vodom i sredstvima za čišćenje, tj. sapunom, deterdžentom, izbjeljivačem te na kraju dezinfekcijskim sredstvom.

Odmah nakon ispiranja svakog fragmenta vodom i sredstvima za čišćenje pristupilo se testiranju korištenjem *Combur3-test*® E traka.

U trećem testu-setu ispitivanja pripravljeni uzorci krvi tri dana su sušeni na sobnoj temperaturi, zatim su tretirani sredstvima opisanim slijedom te se nakon ponovnog sušenja u trajanju tri dana pristupilo testiranju korištenjem *Combur3-test*® E traka.

## 2. REZULTATI

Uzorak bez krvi pokazao je da voda i sredstva za čišćenje ne daju pozitivnu reakciju s *Combur3-test*® E trakama. Međutim, sapun je reagirao na proteine (reakcija na drugom polju testnih traka) na kojima se istraživanje nije ni provodilo. Premda se nije provodilo testiranje s drugim reagensima na testnim trakama, zapažena je pozitivna reakcija na proteine u slučaju tkanine tretirane sapunom.

Analiza rezultata drugog seta ispitivanja pokazala je da je vodom tretiran trag krvi na tkanini u svim slučajevima dao pozitivnu reakciju na krv s *Combur3-test*® E trakama.

U trećem setu ispitivanja s osušenom krvi, dva uzorka (osušena krv isprana deterdžentom i izbjeljivačem) dala su negativan rezultat na hemoglobin, dok je za ostala četiri tretirana uzorka rezultat bio pozitivan.

Pokazalo se da *Combur3-test*® E trake imaju različiti stupanj reagiranja koji se očituje u tamnijoj ili svjetlijoj boji polja.

### 3. RASPRAVA

Bez obzira na to radi li se na mjestu događaja ili laboratoriju te primjenjuju li se preliminarni ili potvrdne metode, u forenzičnom kontekstu svakako valja poznavati ograničenja i pouzdanost postupaka kojima se koristi. Upravo stoga, svaka od metoda i testova koji su u uporabi moraju biti validirani, tj. mora se provjeriti koliko su metode pouzdane i primjenjive u različitim okolnostima u svakodnevnom radu. Naime, malokad će uvjeti biti idealni, odnosno istovjetni onima u kojima je metoda izvorno razvijena. Primjerice, na tragove krvi mogu utjecati brojni čimbenici, od samog protoka vremena, vremenskih neprilika, a često i pokušaja uništavanja i prikrivanja tragova. Iako se na temelju preliminarnih testova neće donijeti konačni zaključci, važni su kako bi se uopće mogli odabrati uzorci s mjesta događaja koji će se poslati na potvrdnu analizu. Dakle, o njihovoj pouzdanosti često će ovisiti i krajnji rezultat dobiven u laboratoriju. Međutim, upravo zbog toga što nemaju izravnu dokaznu vrijednost i iako se svakodnevno rabe na mjestu događaja, često se njihov značaj podcjenjuje.

U mnogim istraživanjima testirani su i validirani mnogi preliminarni testovi za detekciju krvi u tragovima. Međutim, koliko je autorima ovoga rada poznato, od svih testova osjetljivost i pouzdanost *Combur3-test*® traka najmanje je istražena. Stoga se ovim radom nastojao barem djelomično nadomjestiti nedostatak validacije *Combur3-test*® traka.

Rezultati istraživanja pokazali su da je *Combur3-test*® zaista pouzdan kada se radi o svježim krvnim mrljama, čak i kada su one ispirane vodom ili tretirane uobičajenim sredstvima za pranje, izbjeljivanje i dezinfekciju u domaćinstvu. Također je pouzdan kod sasušanih tragova krvi. Međutim, test nije posve pouzdan kada se radi o tretiranim sasušanim krvnim mrljama, jer je u dva od pet slučajeva (40 %) bio lažno negativan na hemoglobin. Rezultati su značajni za praksu zbog toga što se pokazalo da protokom vremena i pokušajem uklanjanja tragova dolazi do povećanja mogućnosti postizanja lažno negativnih rezultata. Dakle, kada se sumnja na takve okolnosti, rezultate dobivene *Combur3-test*® trakama trebalo bi uzeti u obzir s velikim oprezom.

Uzimajući u obzir dobivene rezultate ustanovljeno je da je preliminarni *Combur3-test*®, bez obzira na ispiranje krvi vodom i sredstvima za čišćenje, u 8 od 10 slučajeva bio pozitivan na hemoglobin.

U prvom setu ispitivanja u kojem nije korištena krv već samo voda i sredstva za čišćenje *Combur3-test*® E trake nisu reagirale na hemoglobin u svih šest slučajeva. Iznimka se dogodila s tkaninom koja je isprana sapunom i vodom, i to ne u reakciji na krv, nego na proteine. Pozitivna reakcija na proteine rezultat je reakcije reagensa na proteine u drugom polju test trake s biljnim proteinima koji su uobičajeni sastojak mirisa sapuna.

U drugom je testu svježja krv (isprana vodom i tretirana različitim sredstvima za čišćenje) testirana na hemoglobin. *Combur3-test*® E trake pozitivno su reagirale na svaki testni uzorak. Na tkanini gdje se nalazila netretirana svježja krv testna traka najjače je reagirala, vrlo tamno zeleno do smeđe obojenje. Na tkanini na kojoj je svježja krv oprana dezinfekcijskim sredstvom, obojenje je bilo svijetlozeleno, dok je u ostalim slučajevima obojenje bilo tamnozeleno boje. Uzrok ovim razlikama u boji leži u činjenici da je dezinfekcijsko sredstvo

bilo učinkovitije u otklanjanju tragova krvi što je dovelo do slabije reakcije *Combur3-test*® E trake s uzorkom, a što se očituje svjetlijim obojenjem polja testne trake.

U trećem setu testova analizirala se osušena krv isprana vodom i sredstvima za čišćenje, nakon trodnevnog sušenja na sobnoj temperaturi. Reakcije su se donekle razlikovale od onih u testu sa svježom krvi. Osušeni uzorak krvi (bez ispiranja vodom i tretiranja sredstvima za čišćenje) pokazao je jednaku reakciju kao i u prethodnom testu, pa je polje poprimilo gotovo smeđu boju. U slučajevima pranja vodom i sapunom polja na traci poprimila su svijetlozelenu boju. U slučaju tretiranja deterdžentom i izbjeljivačem sama polja na trakama nisu promijenila boju, ali je mjesto na tkanini gdje je traka stavljena poprimilo plavkasto-zelenu boju. Na tkanini na kojoj je krv oprana dezinfekcijskim sredstvom polje na traci poprimilo je svijetlozelenu boju. Razlike u boji vidljive na dijelu testnih traka za hemoglobin rezultat su različite količine hemoglobina koji je preostao nakon tretiranja, pa je stoga boja trake u slučaju sasušene krvi bila najintenzivnija, dok je ovisno o sastavu korištenog sredstva za čišćenje poprimila svjetlije nijanse zelene i plave boje. Ovaj nalaz ne ukazuje samo na postojanje ili nepostojanje krvi, već na to da na mjestu događaja čak i preliminarni test može indicirati namjeru prikrivanja djela.

Činjenica da se prilikom testiranja u nekim slučajevima boja s testne trake prenijela na tkaninu ukazuje na mogući nedostatak *Combur3-test*® E traka koji se odnosi na moguću konataminaciju dokaza, no to je problem koji je izvan konteksta teme ovog rada.

*Combur3-test*® pokazao se uspješnim preliminarnim testom u slučaju svježe krvi i svježe krvi tretirane vodom i sredstvima za čišćenje, jer je u svim navedenim slučajevima pozitivno reagirao na krv. Međutim, prilikom testiranja sasušene krvi tretirane deterdžentom i izbjeljivačem pokazao je negativnu reakciju na hemoglobin. Kako se rabio izbjeljivač s natrijevim kipokloritom koji je oksidans, otežano detektiranje hemoglobina je bilo očekivano. Međutim, zanimljivo je kako je u ispitivanju sa svježom krvlju i izbjeljivačem test ipak bio pozitivan. Mogući razlog je vrijeme djelovanja izbjeljivača: u slučaju svježe krvi uzorak je odmah tretiran izbjeljivačem i testiran na hemoglobin, dok je kod sasušene krvi tek nakon sušenja izbjeljivačem tretiranog uzorka napravljen test na hemoglobin. Te su aktivne tvari izbjeljivača mogle dulje djelovati na krv. Ovdje se pokazuje i važnost uključivanja slijepe probe u istraživanje jer je pokazano da nijedna od ispitivanih tvari za čišćenje neće sama dati pozitivan rezultat s *Combur3*®-testom.

Zaključno, sve upućuje na to da je *Combur3*® test pouzdan kad se radi o svježim tragovima krvi, dok bi se za osušene tragove krvi trebala primijeniti neka od drugih metoda preliminarnog testiranja koje su se pokazale uspješnijima. Pokazalo se da *Combur3*®test nije dovoljno pouzdan kad se radi o pokušaju otklanjanja tragova krvi sredstvima za čišćenje.

Istraživanjem je ispitan samo manji dio mogućih sredstava kojima bi se mogli pokušati ukloniti tragovi krvi te se nadamo da će se u budućim istraživanjima obuhvatiti veći broj sredstava, kao i da će se detaljnije ispitati utjecaj protoka vremena na konačne rezultate.

## LITERATURA

1. Barbaro, A., Cormaci, P. & Teatino, A. (2004, April). Validation of forensic DNA analysis from bloodstains treated by presumptive test reagents. In *International Congress Series* (Vol. 1261, pp. 631-633). Elsevier.
2. Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M. & Lago, G. (2007). Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 72(3), 896-913.
3. Laberke, P. J., Hausmann, R., Wiprächtiger, N., Briellmann, T. & Balitzki, B. (2011). Analysis with the Combur-Test--special aspects in forensic trace examination. *Archiv fur Kriminologie*, 229(5-6), 189-197.
4. Primorac, D., & Schanfield, M. (2014). Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective--a new book in forensic science. *Croatian medical journal*, 55(4), 434.
5. Webb, J. L., Creamer, J. I. & Quickenden, T. I. (2006). A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence*, 21(4), 214-220.
6. Barbaro, A., Cormaci, P. & Teatino, A. (2004, April). Validation of forensic DNA analysis from bloodstains treated by presumptive test reagents. In *International Congress Series* (Vol. 1261, pp. 631-633). Elsevier.
7. Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M. & Lago, G. (2007). Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 72(3), 896-913.
8. Stock, J. T. (2005, March). Decomposition of hydrogen peroxide by blood: George Senter's discovery of the enzyme involved. In Abstracts of papers of American Chemical Society (Vol.229, pp. U904-U904). 1155 16th ST, NW, Washington, DC 20036 USA: Amer Chemical Soc.

## INTERNETSKI IZVORI

1. Notes on forensic laboratory tests. URL: <https://knoxdnareport.wordpress.com/contents/conclusions-1/notes-on-forensic-laboratory-tests/> [Accessed 21.4. 2017]. 17:03
2. URL: <http://www.capesmedical.co.nz/medical-products/diagnostic/Combur®-3-test-e-strips-roche-protein-glucose-blood/Combur®-3-test-e-strips-roche-protein-glucose-blood> [Accessed 21.4. 2017]. 16:25
3. URL: <http://www.csiforensic.com/m7/%2314-1000--hemastix-presumptive-blood-test.html> [Accessed 22.4. 2017]. 17:38, H. K. W. C. C. C.-N.-O.-F.-L.-T.

Summary

---

**Izabela Brdakić, Antonia Bokšić, Ivan Jerković, Ivana Kružić, Željana Bašić**

**Detection of blood traces treated with cleaning agents using Combur3-test®**

The paper examines the effectiveness of a preliminary test for blood – Combur3-test® E strips in the detection of traces of blood on a white cotton fabric. Three sets of tests were made for the purpose of the research. The first set of tests did not contain blood but after treatment with water and cleaning agents was tested with the Combur3-test®E strips. In the second set of tests, fresh blood was tested on the fabric and in the third test dried blood, both after being rinsed with water and cleaning agents. Combur3® test showed positive results with fresh blood in all tested cases (6/6). In the test with dried blood treated with detergent and bleach the test was negative (2/6). Therefore, caution is required when using Combur3-test®E strips if there is doubt of covering blood traces by cleaning and washing with the usual cleaning agents.

**Key words:** blood traces, preliminary tests for blood detection tests, Combur3® test, detection, crime scene investigation, treatment of traces using cleaning agents.