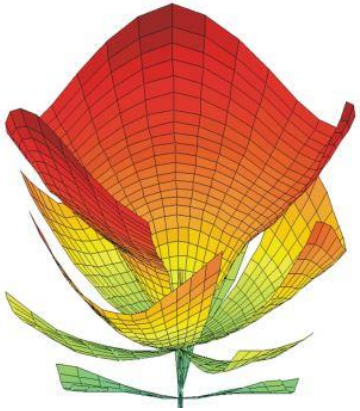
PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

Pilot kísérlet Sus scrofa domestica tetemek forenzikus ökológiai szempontú vizsgálatára.

- Forenzikus tudományok centrális erőtere
- Kísérleti előzmények
- Kísérleti eredmények
- Tervek

Kricskovics Antal, Angyal Miklós, Árvay Gyula, Rácz Evelin, Porpáczy Zoltán, Bozó Csaba, Ujvári Zsolt, Sipos Katalin

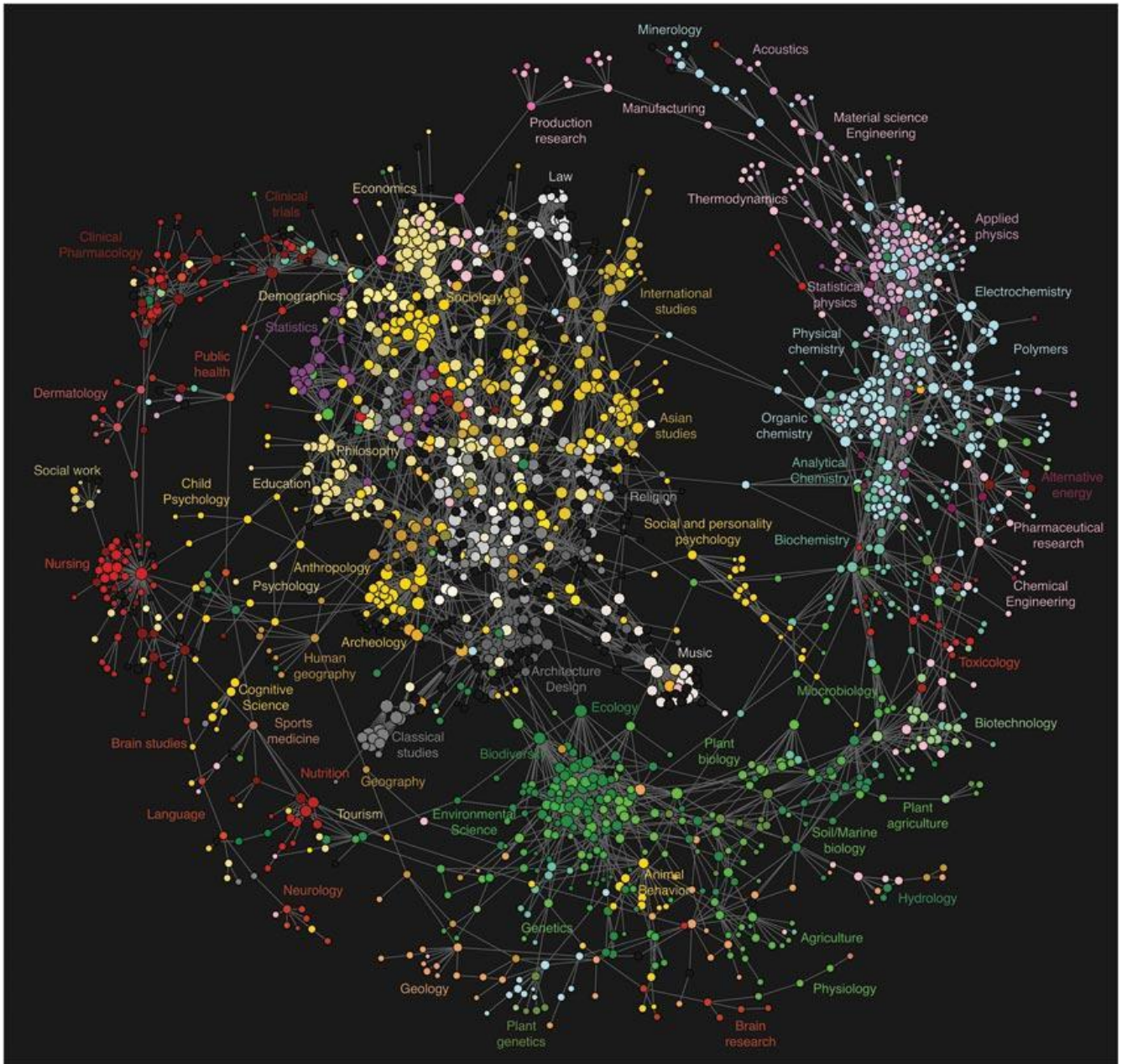


50. Jubileumi Ülés
Budapest

A forenzikus tudományok centrális erőtere

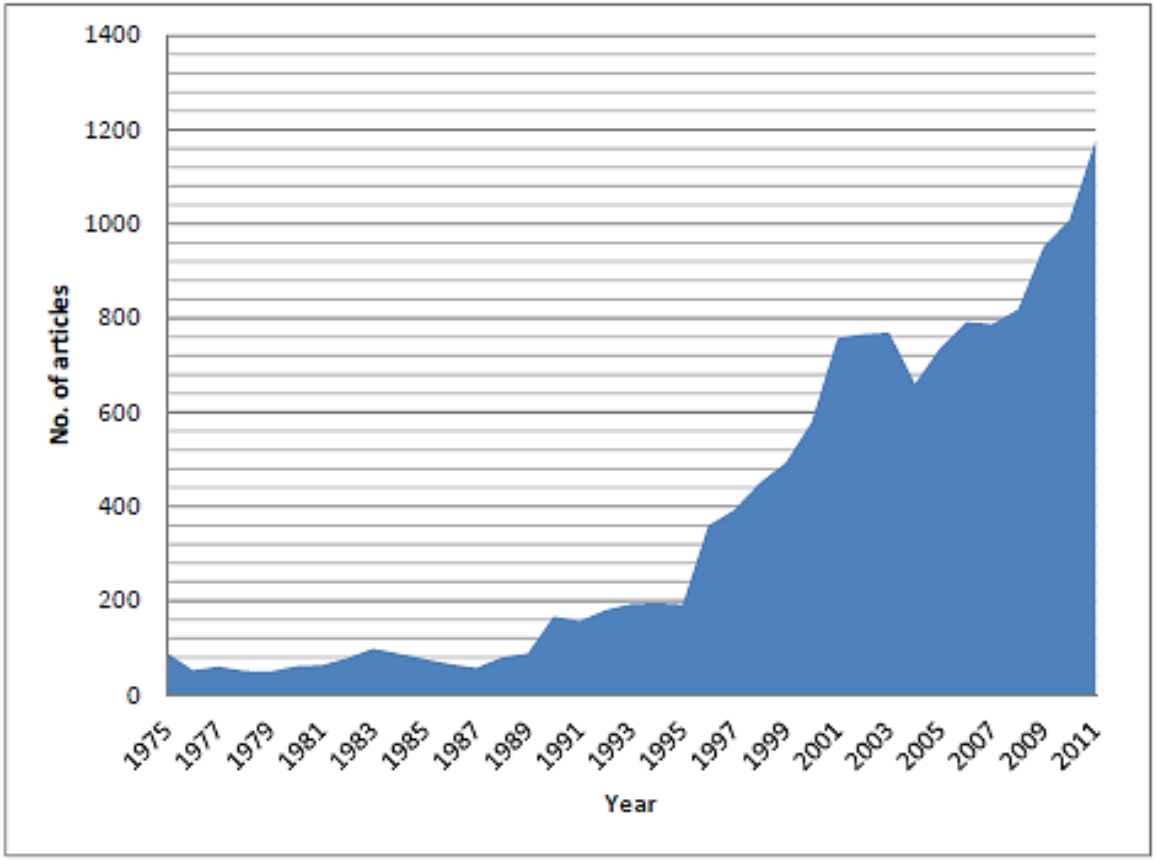
- Tradicionális tudományok alkalmazása forenzikus területen:
  - biológia, kémia, toxikológia, kábítószer analitika, fizika,…
- Modern tudományos eredmények beépülése a gyakorlatba, a forenzikus tudományok abszolút alkalmazotti jellege miatt folyamatosan zajlik.
- A forenzikus tudományok között a biológia speciális és kiemelten fontos…pl. a személyazonosítás területén.
- A biológiai anyagok kiemelt jelentőségűek az inkriminált cselekmények vonatkozásában, ezek pl. a vér és más testfolyadékok, a haj, a textilszálak, a botanikai és az állati eredetű anyagmaradványok…cserekapcsolataik vizsgálata által válik bizonyító erővé.
- A biológiai vizsgálatok kiemelt jelentőségűek ily módon ma a fejlesztés vektora a centrális helyzetű genetikai analízis irányába mutat.
- De,…!

A centrális erőtér határai

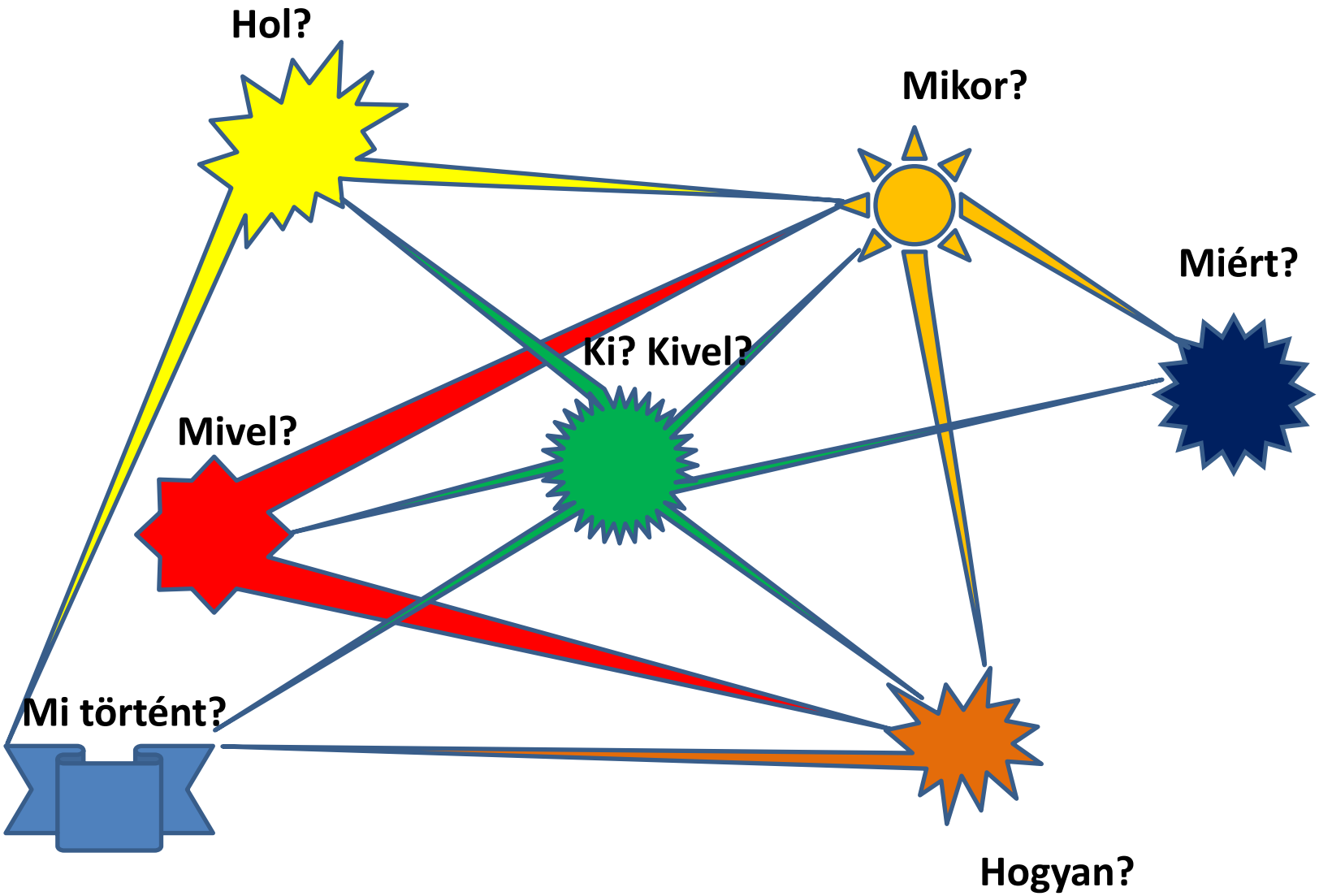


Bibliometrikus adatok változása a forenzikus tudományok területén

- Botanika
- Entomológia
- Mikrobiológia
- Geológia
- Antropológia
- Archeológia
- Orvostan
- …



Forrás: http://digitalcommons.unl.edu

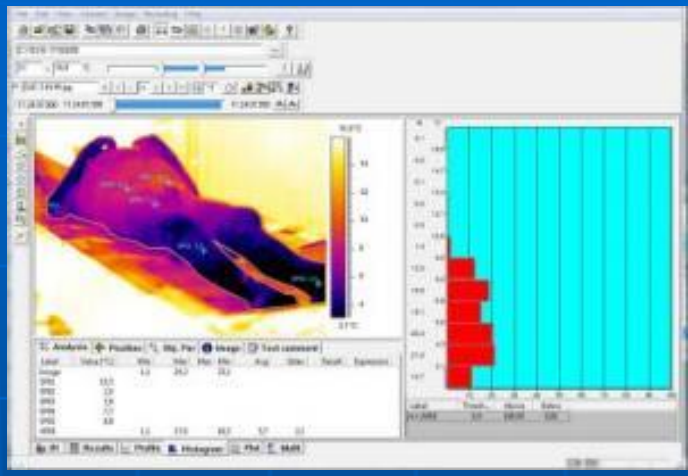

Hol?
Mikor?
Miért?
Ki? Kivel?
Mivel?
Mi történt?
Hogyan?

A kormeghatározás főbb módszerei a halál időpontjának (PMI) megállapítására

- hullajelenségek
- termális változások
- rovartani
- mikrobiológiai
- thanatokémiai

(Decomposition Staging Scale - Micozzi et al., 1991;
Total Body Score - Megyesi et al., 2005)

PMI azonosító módszerek



Algor mortis
Supravitalis react.
Livor mortis
Rigor mortis
Putrifikáció speciális környezetben
Thanatokémiai tesztek
Forenzikus rovartan.....
Csontok laboratóriumi vizsg.
Dendrokronológia
Sztratigráfia

Órák Napok Hetek Évek

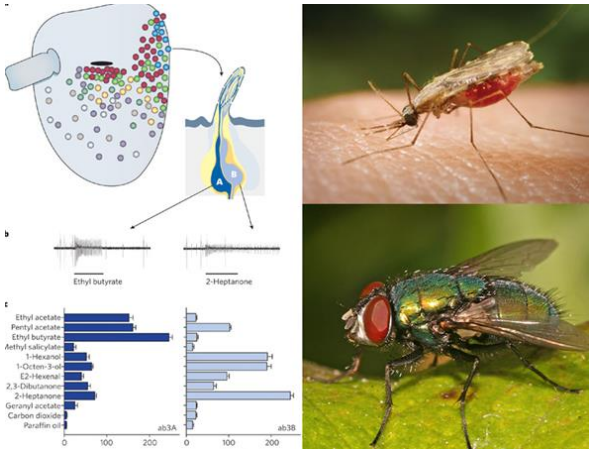
Table 2
List of the compounds extracted from day 1 (1st instar) larvae of *L. sericata*, *C. vomitoria* and *C. vicina*, along with the total percentage of each compound present, the percentage standard deviation and the Kovats index to aid identification.

Peak identification	Kovats (iu)	*L. sericata*	*C. vicina*	*C. vomitoria*
		% ($n = 10$)	% ($n = 10$)	% ($n = 10$)
Octadecane	1800	4.53 ± 0.84	ND	ND
Eicosene	1990	ND	1.21 ± 0.46	ND
Eicosane	2000	7.84 ± 1.71	0.75 ± 0.31	1.93 ± 0.79
Heneicosane	2100	ND	0.92 ± 0.42	1.76 ± 0.67
Docosane	2200	7.91 ± 1.86	1.33 ± 0.65	1.67 ± 0.59
2-Methyldocosane	2264	ND	ND	1.82 ± 0.96
Tricosene	2271	ND	ND	3.66 ± 1.04
Tricosene	2278	ND	ND	1.61 ± 0.63
Tricosane	2300	4.61 ± 2.37	2.07 ± 0.95	8.80 ± 2.93
9 + 11-Methyltricosane	2339	ND	ND	1.78 ± 1.64
7-Methyltricosane	2342	ND	ND	0.85 ± 0.38
Tetracosane	2400	7.79 ± 2.01	1.88 ± 0.87	1.78 ± 0.70
2-Methyltetracosane	2464	ND	8.51 ± 3.27	7.45 ± 8.29
Pentacosene	2471	1.45 ± 0.87	ND	2.17 ± 0.91
Pentacosene	2479	ND	ND	1.67 ± 0.44
9 + 11-Methylpentacosane	2536	1.91 ± 1.32	6.71 ± 2.66	10.59 ± 15.03
9-Methylpentacosane	2538	ND	1.69 ± 0.73	ND
7-Methylpentacosane	2544	2.19 ± 0.78	1.01 ± 0.52	ND
5-Methylpentacosane	2552	ND	0.78 ± 0.40	ND
3-Methylpentacosane	2574	ND	1.79 ± 0.79	1.82 ± 2.32
Hexacosane	2600	8.07 ± 2.20	2.51 ± 1.02	2.39 ± 1.29
12 + 14-Methylhexacosane	2636	ND	1.04 ± 0.44	ND
2-Methylhexacosane	2665	ND	ND	5.50 ± 5.31
12,22-diMethylhexacosane/12,20-dimethylhexacosane*	2666	3.74 ± 1.79	25.70 ± 18.29	ND
Heptacosene	2676	ND	1.34 ± 0.60	ND
Heptacosene	2679	ND	0.39 ± 0.24	ND
Heptacosane	2700	7.81 ± 4.77	9.93 ± 7.65	10.78 ± 8.93
11 + 13-Methylheptacosane	2735	ND	5.62 ± 2.47	5.10 ± 7.55
7-Methylheptacosane	2743	ND	1.00 ± 0.58	ND
5-Methylheptacosane	2753	ND	0.93 ± 0.57	ND
3-Methylheptacosane	2775	ND	0.70 ± 0.58	ND
Octacosane	2800	7.36 ± 2.10	1.61 ± 0.84	1.36 ± 1.05
2-Methyloctocosane	2871	1.21 ± 0.58	5.79 ± 4.77	2.00 ± 1.61
Nonacosane	2900	5.70 ± 2.70	3.39 ± 2.40	5.62 ± 3.64
11 + 13-Methylnonacosane	2936	ND	1.86 ± 1.94	2.01 ± 1.80
9-Methylnonacosane	2941	ND	0.69 ± 0.66	ND
7-Methylnonacosane	2947	ND	0.85 ± 0.83	ND
5-Methylnonacosane	2956	ND	0.25 ± 0.16	ND
3-Methylnonacosane	2977	ND	0.62 ± 0.78	ND
Triacontane	3000	4.58 ± 2.66	0.86 ± 0.39	2.49 ± 1.85
2-Methyltricontane	3067	ND	0.99 ± 0.78	ND
Cholesterol + hentriacontene	3070	ND	ND	2.50 ± 1.28
Hentriacontene	3084	11.65 ± 7.17	ND	2.11 ± 0.93
2,6/2,8/2,10-diMethyltriacontane	3097	ND	0.55 ± 0.63	ND
Hentriacontane	3100	5.10 ± 2.23	1.86 ± 1.08	4.13 ± 2.39
Dotriacontane	3200	6.53 ± 2.34	2.89 ± 1.41	2.80 ± 1.52
Tritriacontane	3300	ND	ND	1.87 ± 1.32

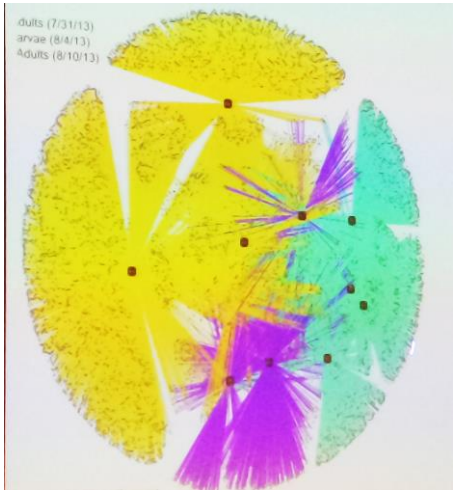
ND = not detected.
* Co-eluted with heptacosene in immature larval stage of *C. Vicina*.

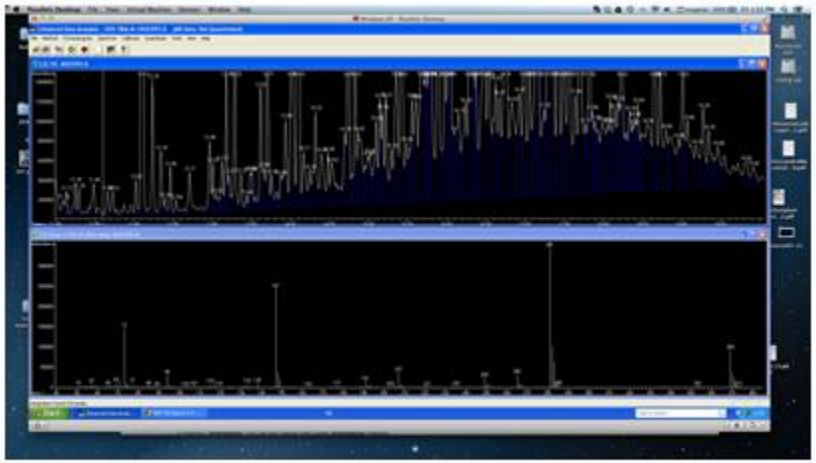
MPT Magyar Parazitológusok Társasága

Emberi szag detektálása



Baktérium közösség aktivitásának változása (Calliphora terranovae).



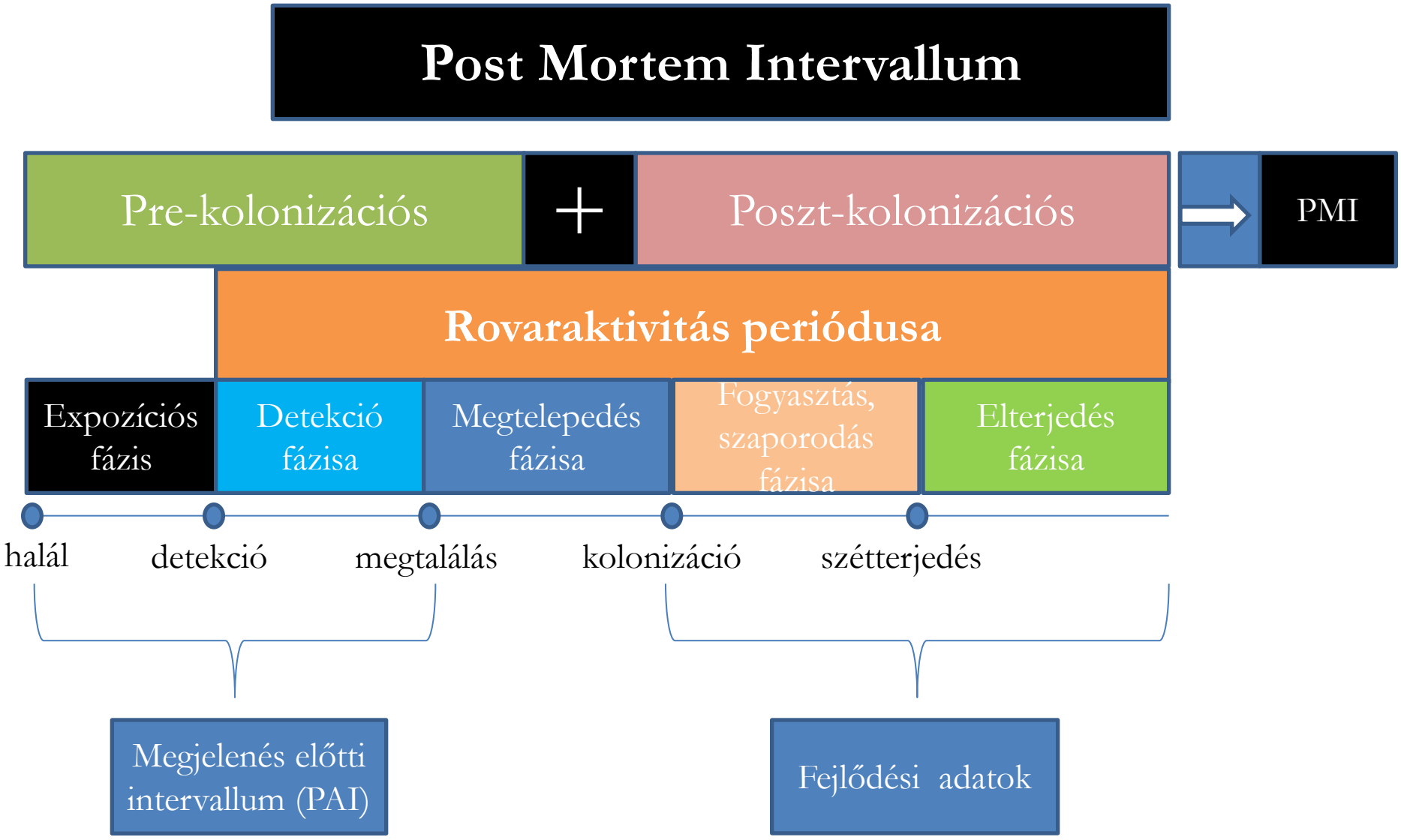


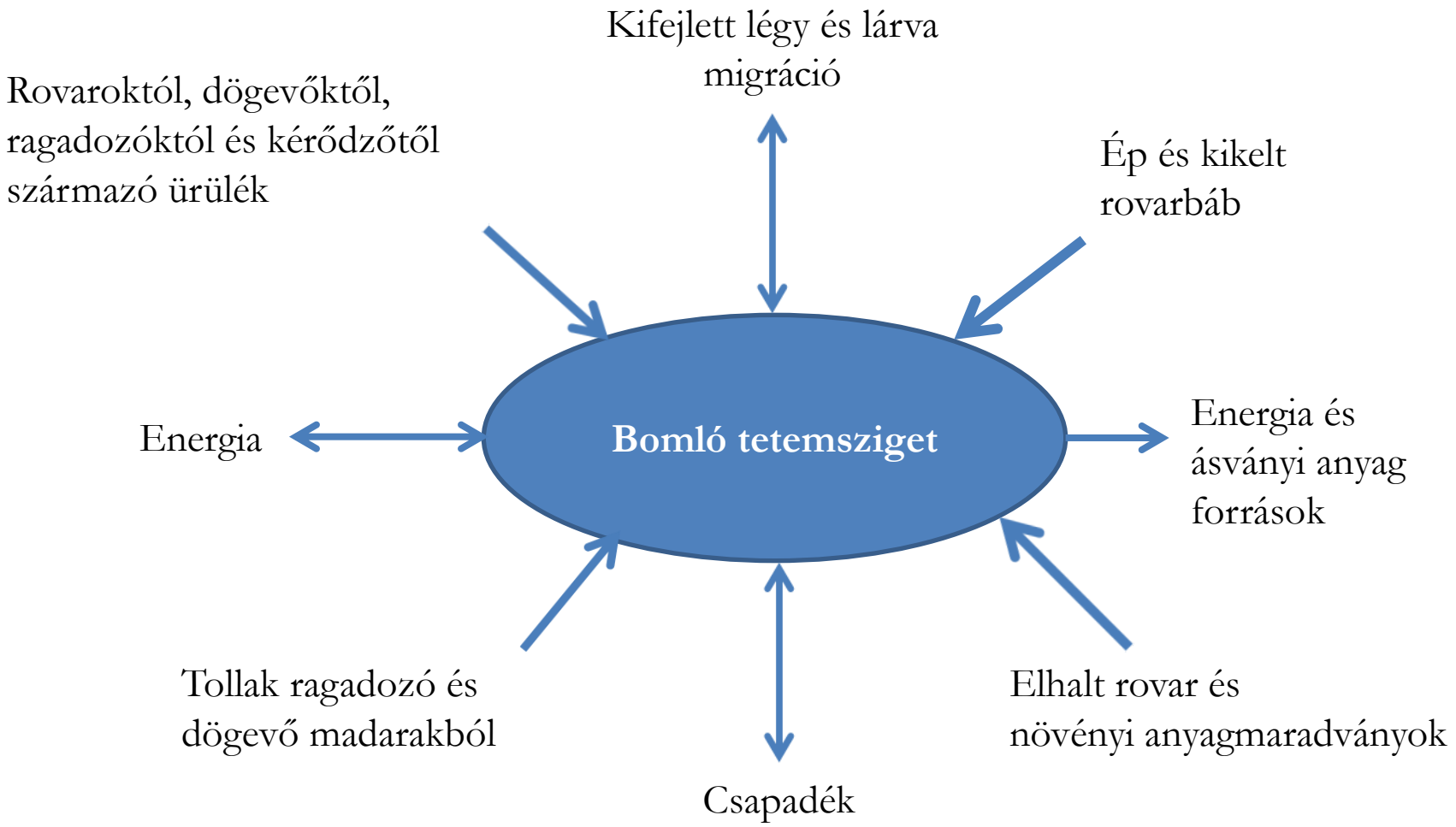
2013-as női szagminta hónaljból
11-20 perc

Textíliákra kötött emberi illatanyagok zárt rendszerű illatanyag gyűjtő berendezéssel (CLSA-Closed Loop Stripping Apparatus) volt összegyűjtve.

(Bozó Cs., Kárpáti Zs., 2014)

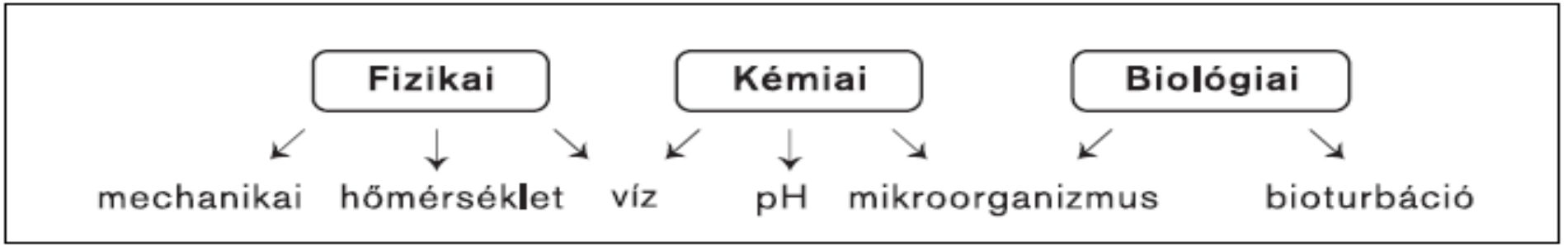
(Michael J. McGuire et al., 1981)


Post Mortem Intervallum
Pre-kolonizációs
+
Poszt-kolonizációs
PMI
Rovaraktivitás periódusa
Expozíciós fázis
Detekció fázisa
Megtelepedés fázisa
Fogyasztás, szaporodás fázisa
Elterjedés fázisa
halál
detekció
megtalálás
kolonizáció
szétterjedés
Megjelenés előtti intervallum (PAI)
Fejlődési adatok

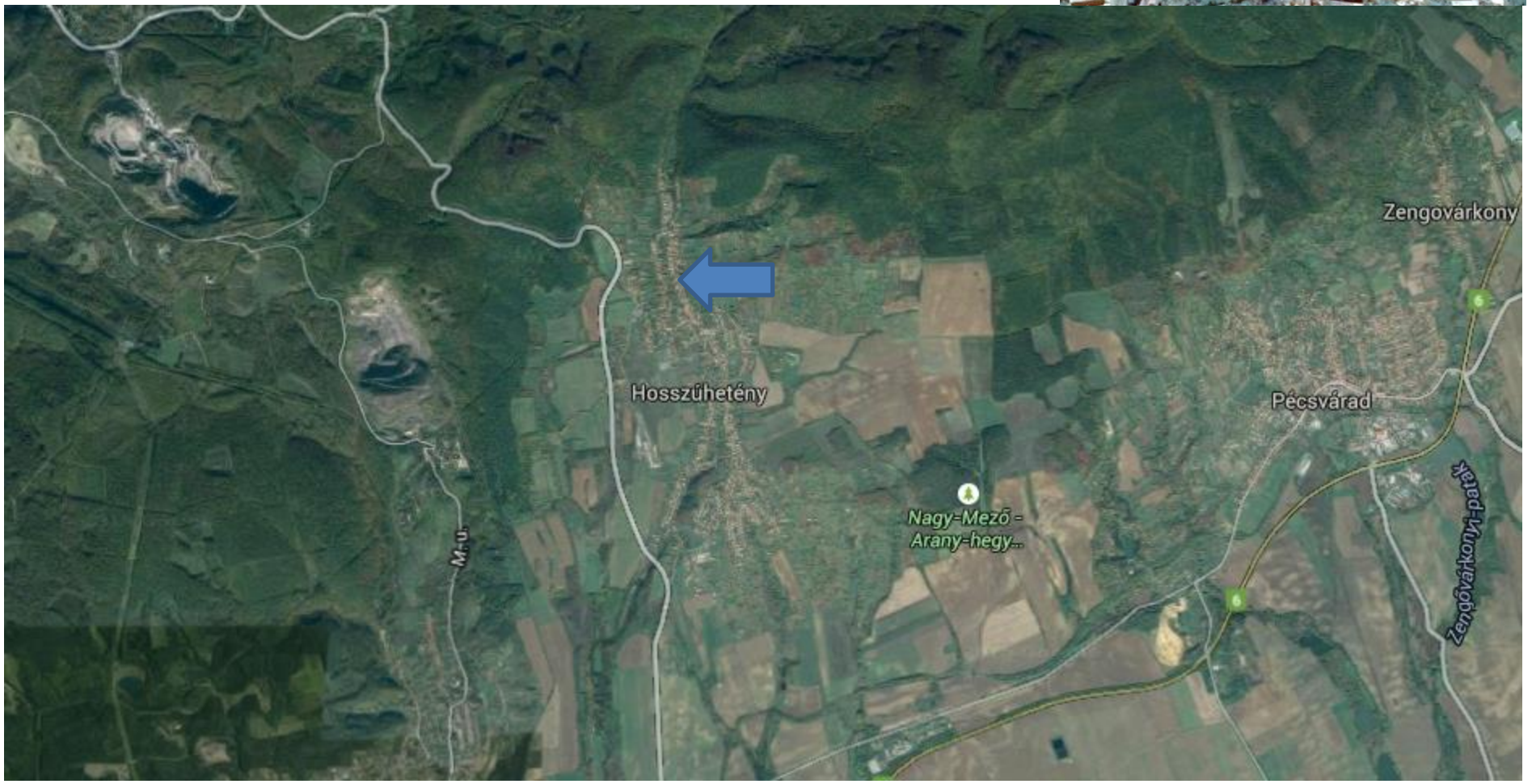

Kifejlett légy és lárva migráció
Rovaroktól, dögevőktől, ragadozóktól és kérődzőtől származó ürülék
Ép és kikelt rovarbáb
Energia
Bomló tetemsziget
Energia és ásványi anyag források
Tollak ragadozó és dögevő madarakból
Csapadék
Elhalt rovar és növényi anyagmaradványok

Taphonómiai folyamatok szakaszai

Az együttes neve	A folyamat neve	Értelmezés
Biocönózis		Fauna
	biosztratonómia	Természetes hatások Emberi hatások
	diagenezis	Lerakódás (keletkezés) utáni természetes hatások
Tanatocönózis		
	helyszíni szemle, kutatás, mintavételezés	Másodlagos emberi hatások
Potenciális bizonyítékok		
	dokumentáció, feldolgozás	
Szakértői vélemény	vélemény alkotás	Büntető eljárás

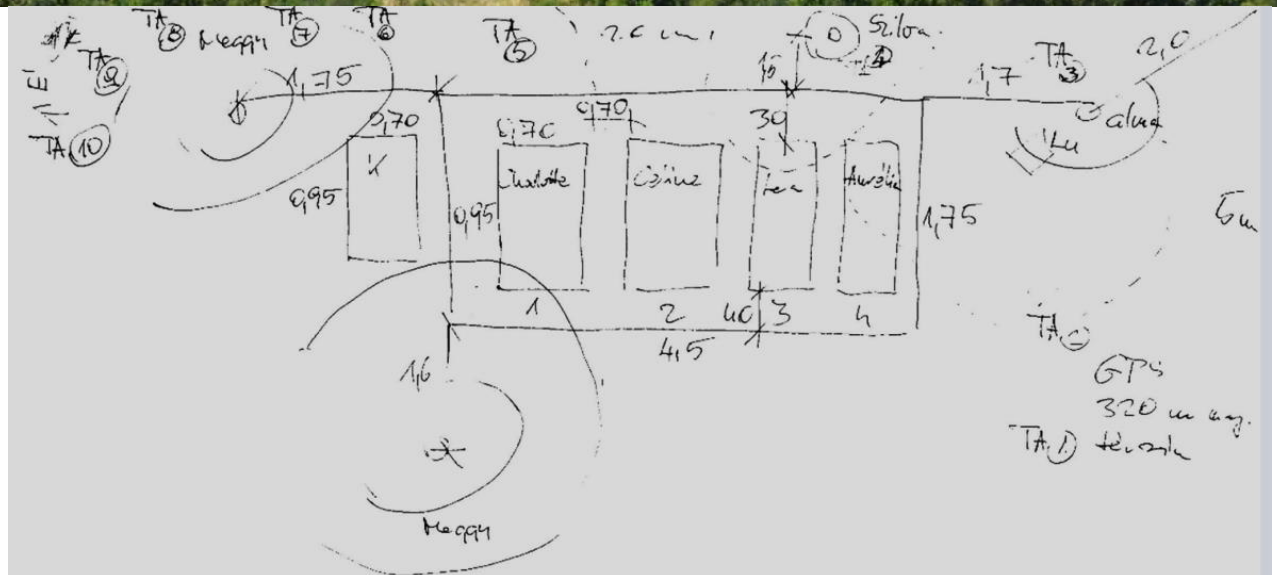


A helyszín:
Kelet-Mecsek Tájvédelmi Körzet
46°10'05.1"N 18°20'59.3"E



A kísérlet tervezett és alkalmazott módszerei:

- **rovartani:** szukcesszió vizsgálata;
- **mikrobiológiai:** a holttest fekvésének hatása a talaj mikrobiológiájára;
- **kémiai analitikai:** a talaj szerves nitrogén tartalmának változása a fekvési idő függvényében.



Hipotézisek

- Azonos környezeti körülmények között, a holttest alatti egységnyi talajfelszín szerves nitrogén koncentrációjának változása, a környezeti hőmérséklet függvényében, összefüggésben van a halál óta eltelt idővel.
- A talaj mikrobiális társulására a megjelenő tetem jellegzetes változásokat idéz elő.
- A tetemen megjelenő rovarfajok szukcessziója erős kölcsönhatást mutat a mikrobiális aktivitás változásaival.
- A talajatka populáció összetétele megváltozik összhangban a cönózis más komponenseivel.

Kísérleti adatok, módszerek

- Kísérlet helyszíne:
  - Hosszúhetény, kerítéssel körbevett, kis dőlésszögű, érintetlen (megműveletlen) talaj
- Kísérlet időtartama:
  - 2012. július 16. – 2012. szeptember 23.
  - tetemek eltávolításának időpontja: 2012. július 26.
- Kísérleti alanyok:
  - 4 db, közel azonos időben elölt, hasonló tömegű (45,7; 43; 41; 44 kg) süldő (S*us scrofa domesticus*)
- Mért változók:
  - napi átlaghőmérséklet (datalogger, óránkénti mérésekkel)
  - páratartalom (datalogger, óránkénti mérésekkel)
  - csapadékmennyiség (ombrométer)
  - tetemek testtömege (személymérleg)
- Dokumentáció:
  - Kísérleti jegyzőkönyv
  - fényképek

Mintavétel

- Mintavételi módszer:
  - Domino elv szerint
  - Kézi mintavétel
  - Lucilia csapda
  - Phoridae csapda

- Mintamennyiség:
  - ~80-100 g talaj / mintavételi hely / alkalom

- Mintavételek gyakorisága:
  - 16. kísérleti napig naponta
  - 16-35. kísérleti nap között 3-4 naponta
  - 35-68. kísérleti nap között 6-7 naponta

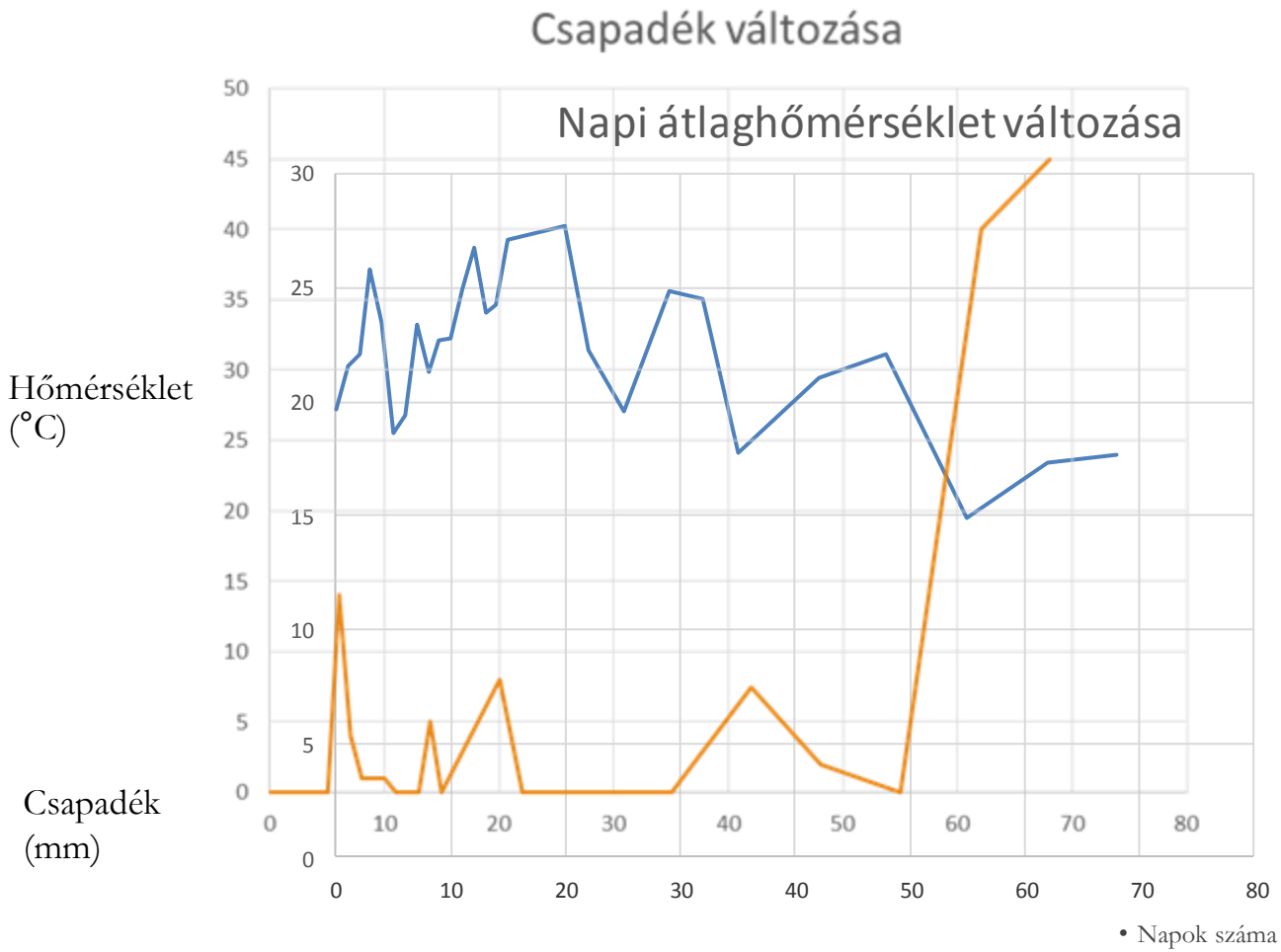
- Minták száma:
  - 4 malac alól + kontroll talaj – párhuzamos mintavételek
  - Összesen 135 db minta

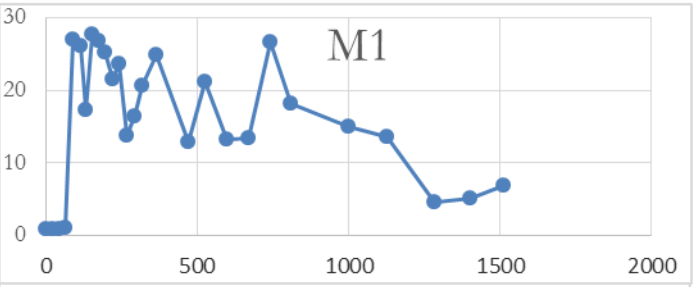
- Mintatárolás:
  - -20 °C-on
  - 70%-os alkoholban

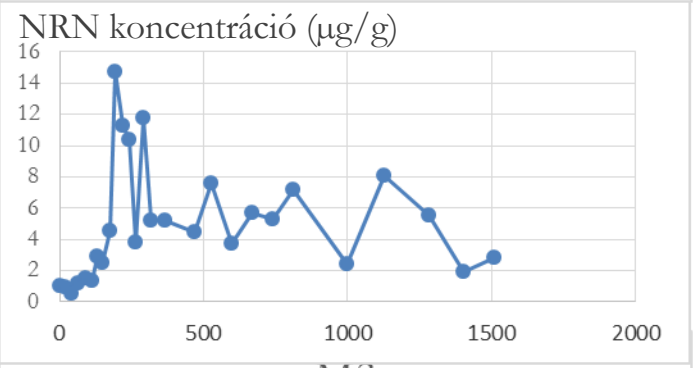
Mérési módszerek

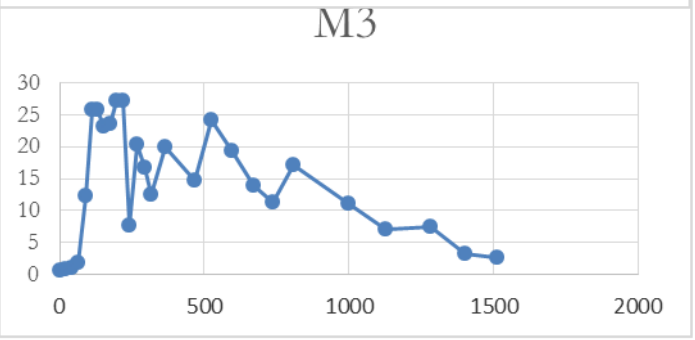
- Ninhydrin reaktív nitrogén meghatározás:
  - Carter et al. által kidolgozott módszertan kissé módosított változata
  - Forrás:
    - Carter DO; Yellowlees D; Tibbett M: Using Ninhydrin to Detect Gravesoil. J Forensic Sci, March 2008, Vol. 53, No. 2 397-400
  - Minta előkészítés:
    - Talajminták kiszárítása 60 °C-on 60 percig
    - Növényi elemek illetve rovarok (főként légylárvák) eltávolítása
  - Mérési folyamat:
    - 1 g talajminta + 8 ml KCl (2M) oldat, 30 percig rázatva, majd leszűrve
    - 2 ml filtrátum + 0,5 ml ninhydrin reagens (*Sigma N6014)* – 25 percig 100 °C-on inkubálva
    - 10 ml 50 %-os (V/V) etanol hozzáadása után
    - Spektrofotométerrel 570 nm-en történtek a mérések
    - Koncentráció értékek egy leucin standard alapján kerültek kiszámításra

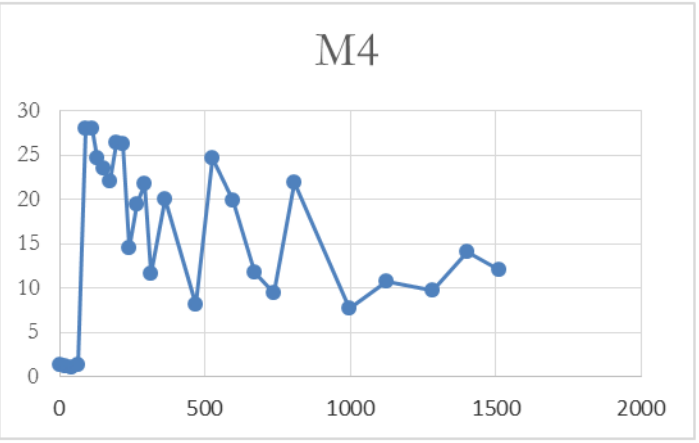
Mérési eredmények







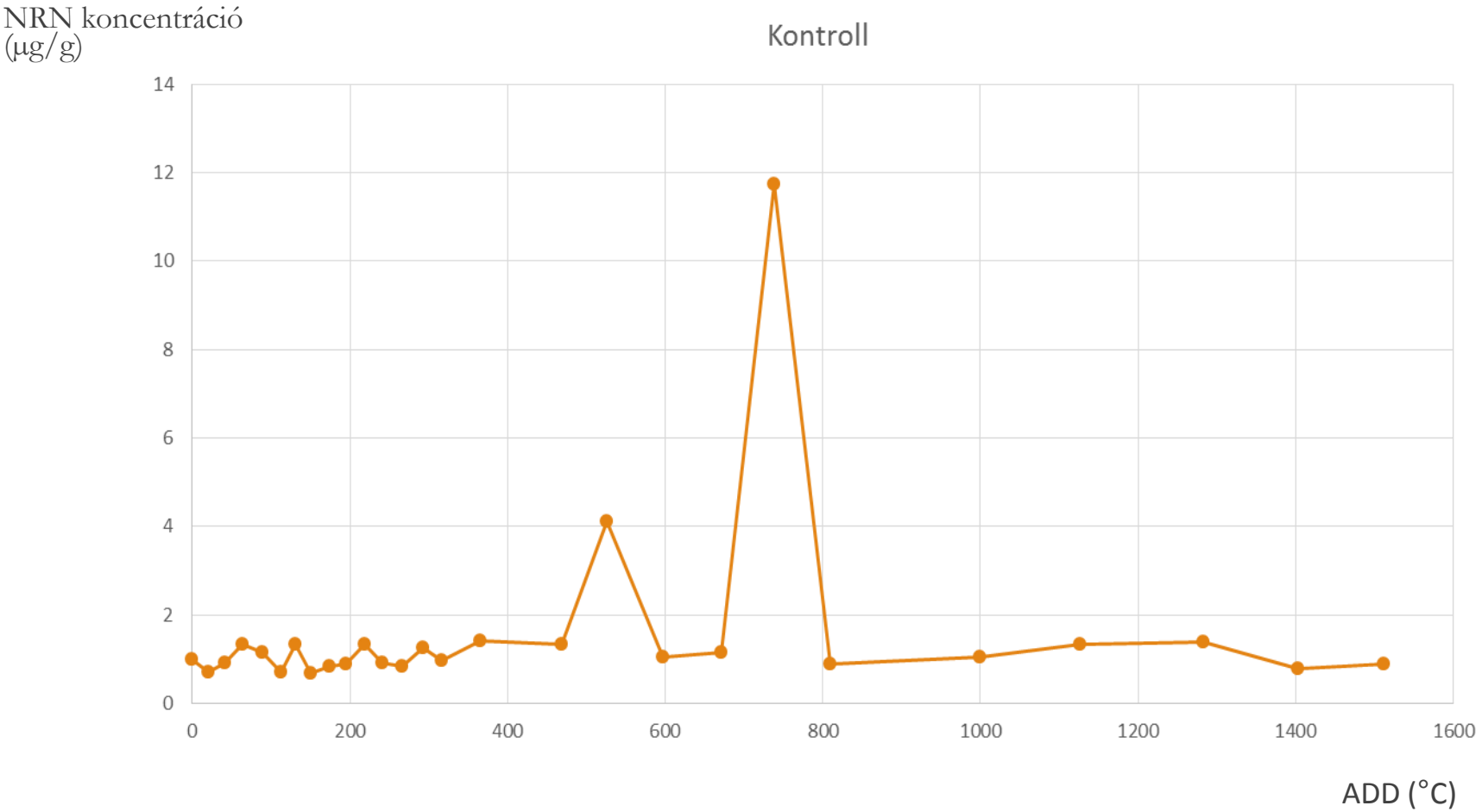




ADD (°C)

Mérési eredmények

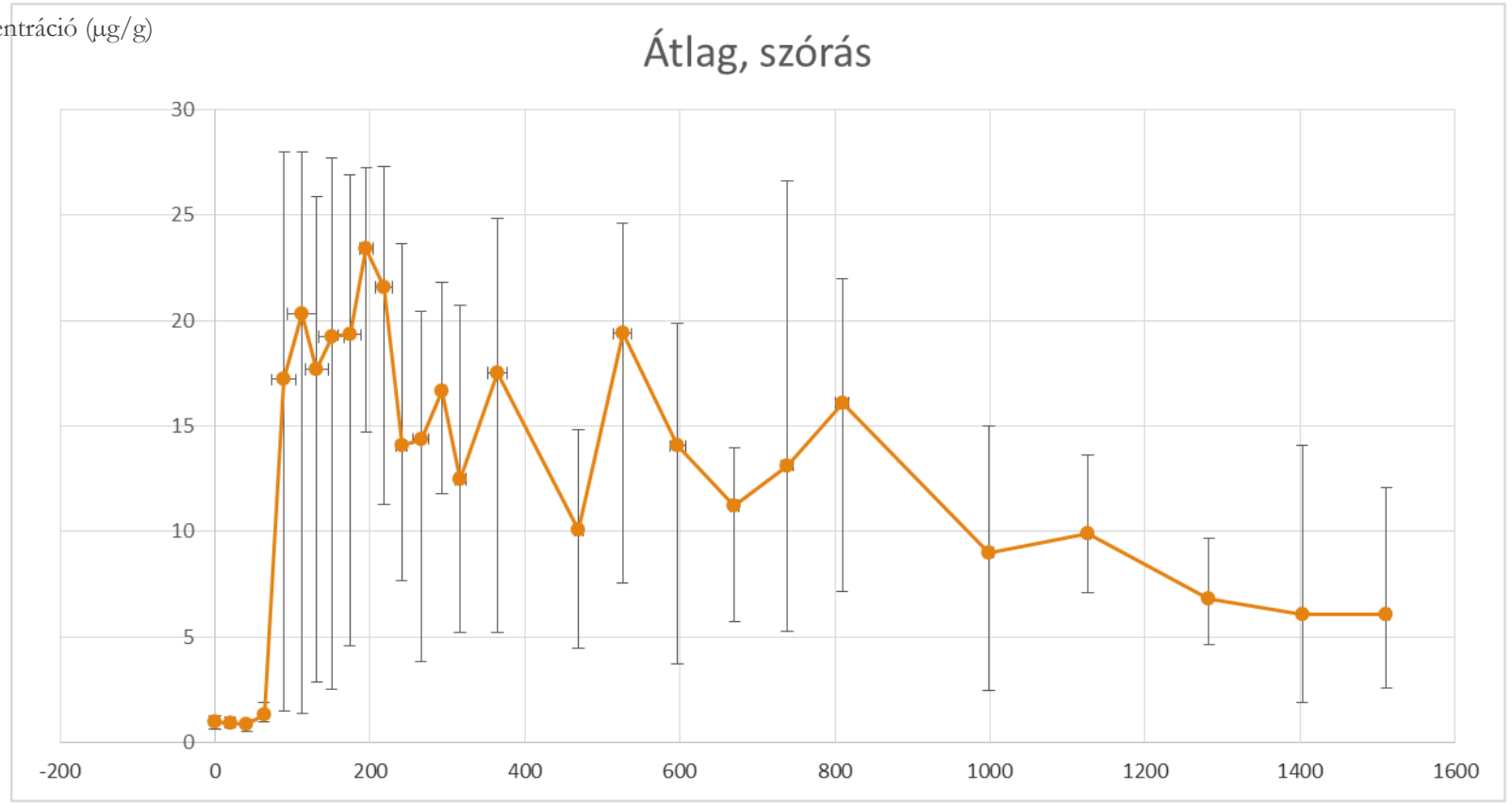
Mérési eredmények



Mérési eredmények

(4 tetem átlaga)

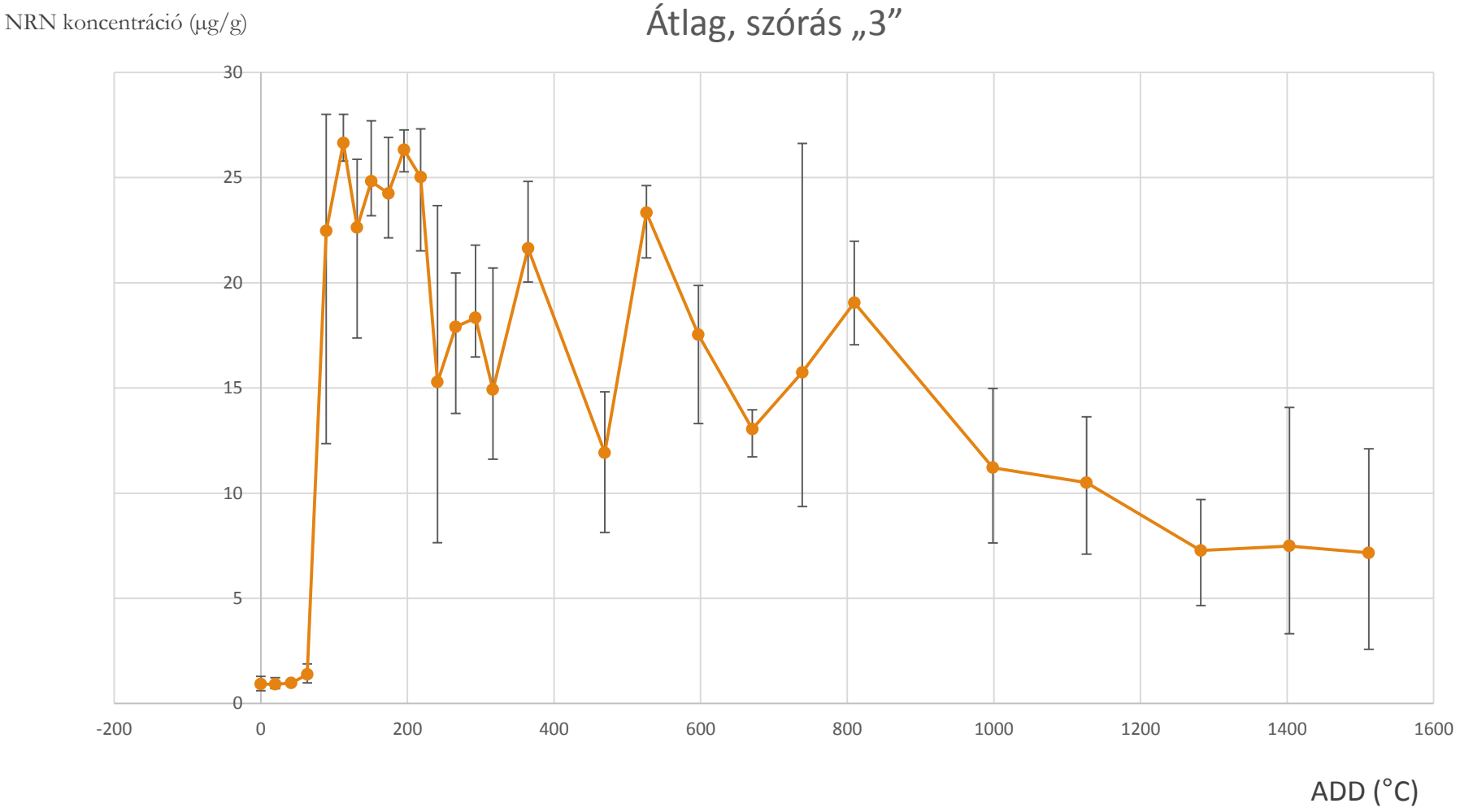
NRN koncentráció (µg/g)



ADD (°C)

Mérési eredmények

(3 tetem átlaga)



A holttest fekvésének hatása a talaj mikrobiológiájára.

Igazságügyi tafonómia

PMI becslése

Lehetséges fekvési helyek azonosítása

Mikrobiológiai változások

Szervezeten belül

Környezet mikrobiális összetételében

A szervezeten belül….

Aerob baktériumok → oxigén jelen van

Anaerob baktériumok → mikrobiális populáció növekszik

Aerob baktériumok és gombák → Környezetből származnak, szkeletonizáció

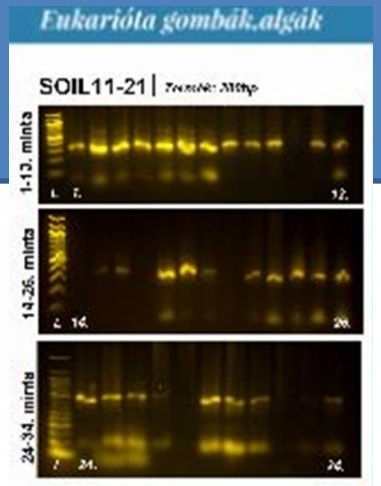
felhalmozódnak a gázok

anaerob körülmények között elszaporodnak a gastrointesztinalis baktériumok

kényszerített kiáramlás a termelődő gázok hatására

A szervezeten kívüli, azaz környezeti mikrobiológiai változások

- a tetemek általában valamilyen talajjal érintkeznek
- a levegő és a talaj mikroorganizmusai részt vesznek a bomlási folyamatokban
- a hullalé a talajjal érintkezik, a testben lévő baktériumok a környezetbe jutnak
- gyakran a környezetben élő gombák tápanyag forrásként is használják a tetemet
- a talaj mikrobiális összetételének változásáról kevés az irodalmi adat



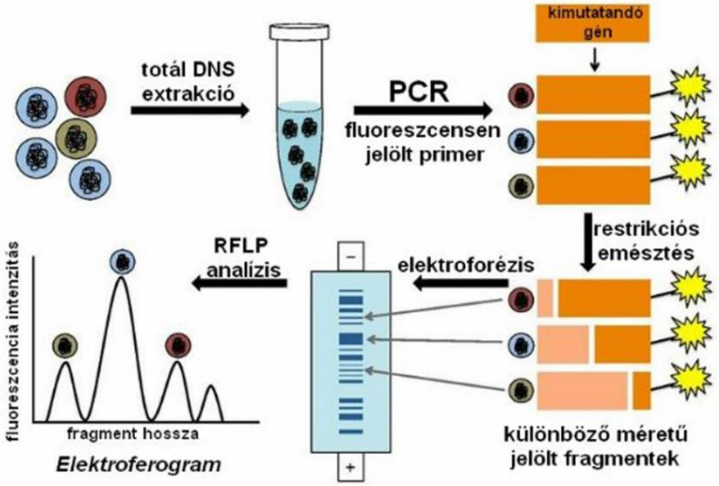
A cél a változás kimutatása.

A módszer legyen:

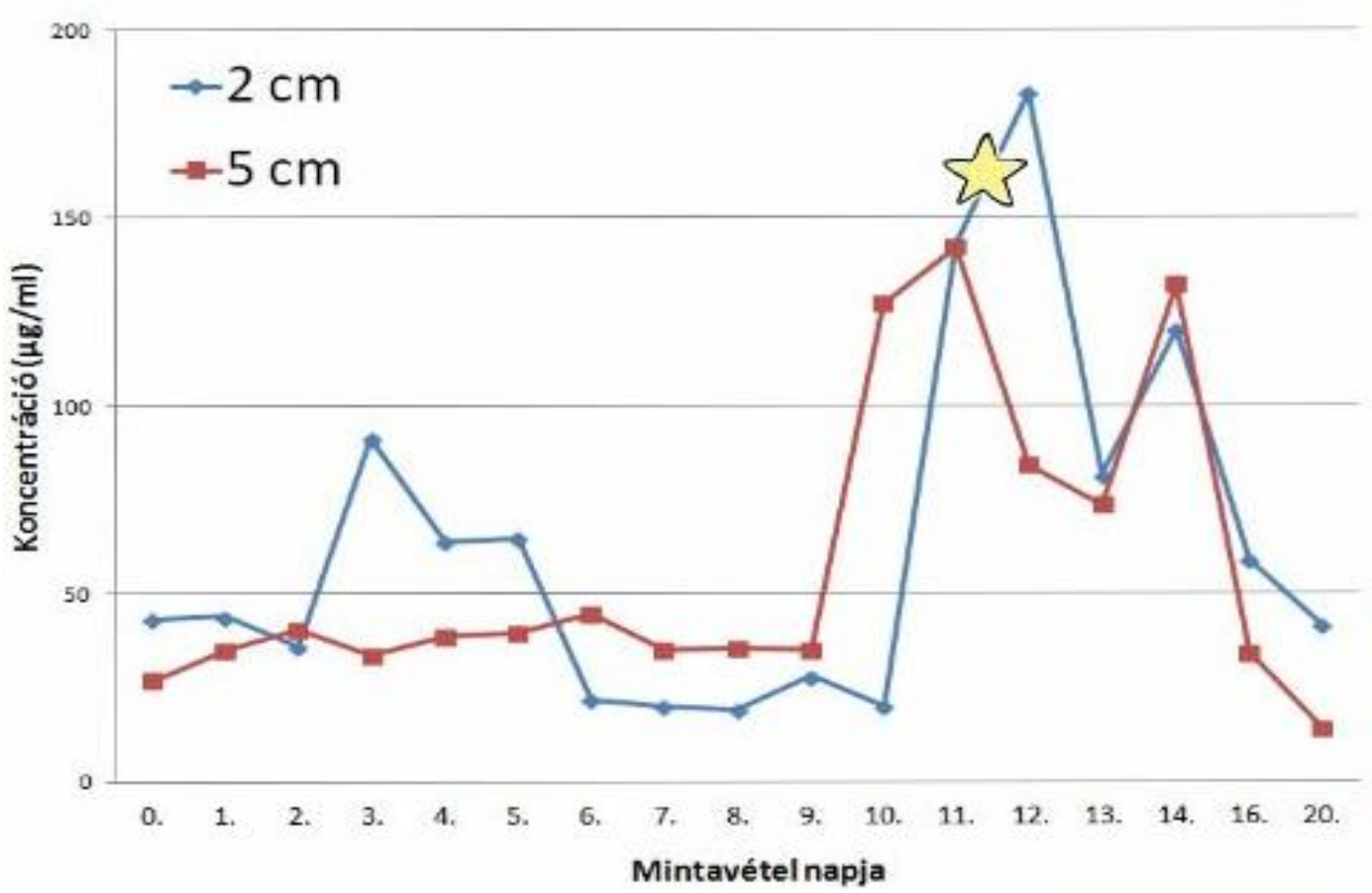
- egyszerű,
- könnyen reprodukálható

A módszer:

- baktérium tenyésztés
- DNS izolálás
- PCR spec. primerekkel
- restrikciós emésztés
- RFLP



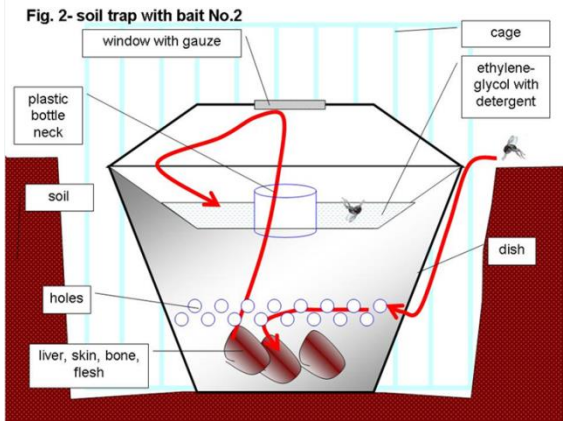
A talajmintából izolált összbakteriális DNS koncentráció az eltelt napok függvényében ábrázolva



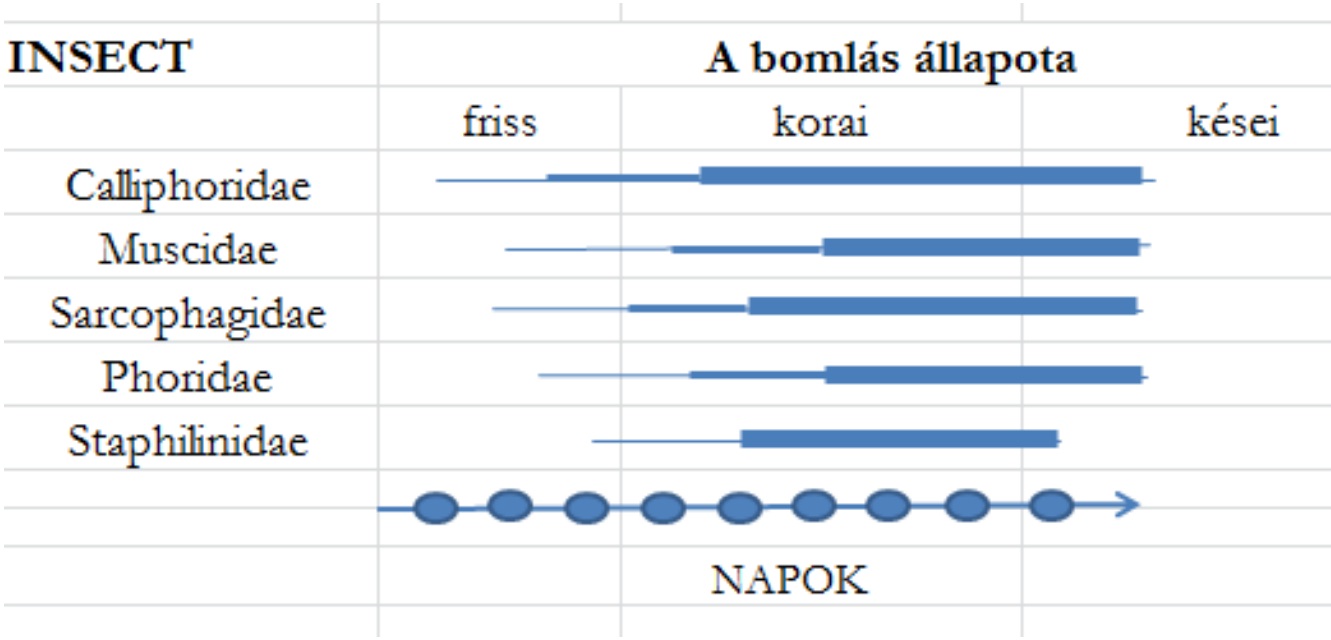
Fajok listája és szukcessziója a tetemekről gyűjtött mintákból

- *Calliphoridae*
  - *Lucilia sericata*
  - *Calliphora vicina*
  - *Chrysomia albiceps*
- *Sarcophagidae*
  - *Sarcophaga sp.*
- *Phoridae*
- *Muscidae*
- *Coleoptera*
  - ➢ *Staphylinidae*
    - *Ocypus olens*

- *Formica rufa*
- *Forficula auricularia*
- *Vespula germanica*



Lengyel Gábor nyomán



Acari fajlista a tetemek alól mintavételezett talajmintákból

Ascidae Oudemans, 1905

- *Asca aphidioides* (Linnaeus, 1758 – gyakori
- *Leioseius bicolor* (Berlese, 1918) - gyakori

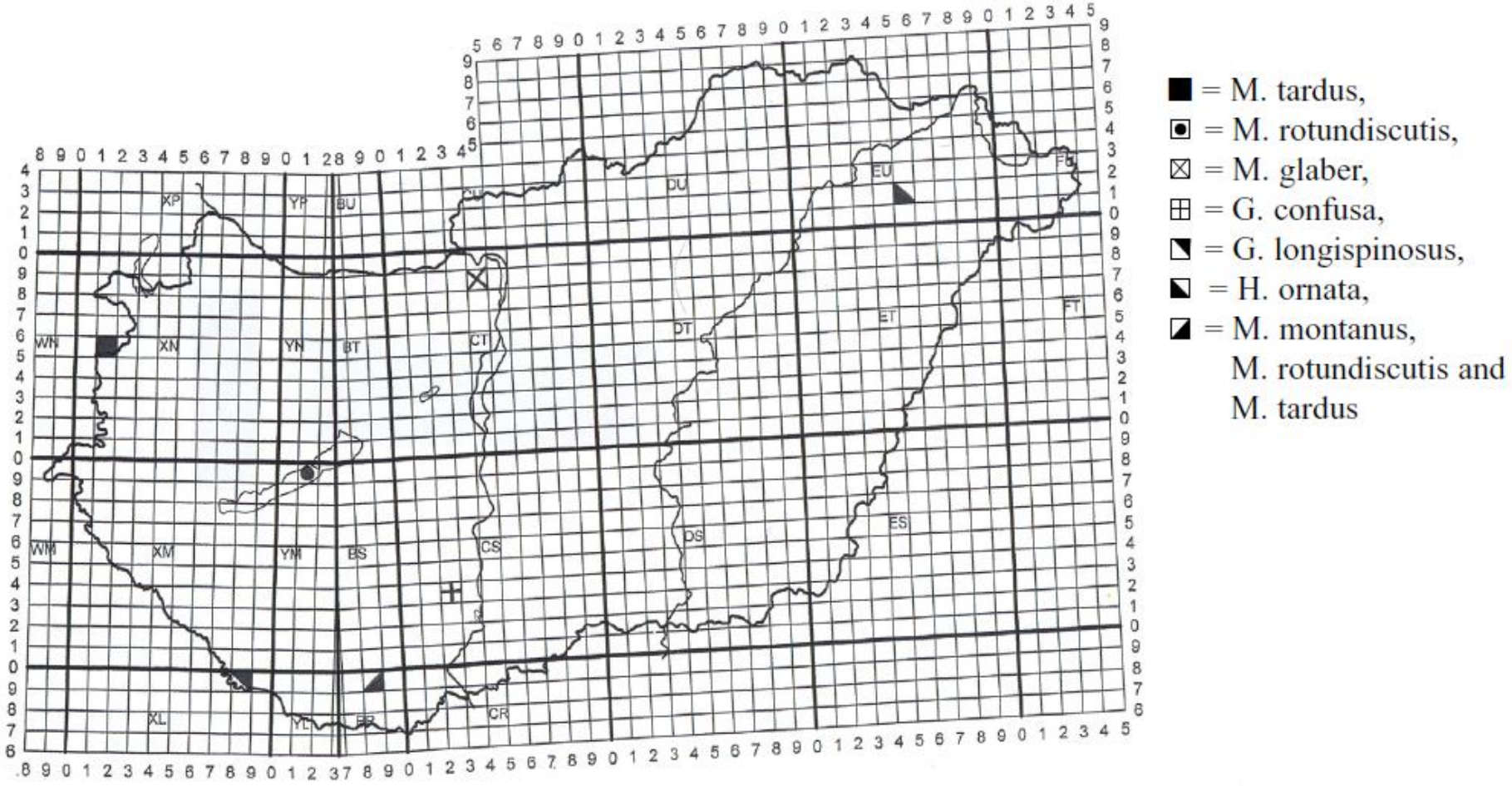
Zerconidae G. Ganestrini, 1891

- *Prozercon fimbriatus* (C. L. Koch, 1839) - gyakori
- *Prozercon tragardhi* (Halbert 1923) – kevésbé gyakori
- *Zercon gurensis* Mihelčič, 1962 – **főként dunántúli előfordulás**
- *Zercon hungaricus* Sellnick, 1958 – **minden biotópban gyakori**, de
- *Zercon latissimus* Sellnick, 1944 jellemző faja az erdősztyepének
- *Zercon peltatus* C. L. Koch, 1836 – gyakori, főként bomló, rothadó anyagon
- *Zercon spatulatus* C. L. Koch, 1839 – **főleg dunántúli előfordulás**

Macrochelidae Vitzthum, 1930

- *Geholaspis longispinosus* (Kramer, 1876) - gyakori
- *Macrocheles montanus* (Willmann, 1951)
- *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli, 1772)
- *Macrocheles tardus* (C. L. Koch, 1841) – **előfordulása elsősorban a Dunántúlon**

Néhány atka faj (Acari: Mesostigmata) elterjedése Mo.-on



Kontschán Jenő (2005) Contribution to the Macrochelidae fauna of Hungary (Acari: Mesostigmata)

Diszkusszió

- Szakirodalomban leírt tendenciák reprodukálhatóak voltak
  - A talaj szerves N koncentrációjának változása 3 szakaszra osztható, ezek:
    1. Kezdeti szakasz, bomlástermékek még nem jutottak érdemi mennyiségben a talajba (4 nap)
    2. Maximális bomlástermék (hullalé) kiáramlás, rovarhatás (30-40. napig)
    3. Konszolidáció, éghajlati (csapadék), diffúzió vagy mikrobiális hatás? (30-40. naptól)

  - Mikrobiológiai spektrum változása
    1. A talaj mikroflórája összességében állandóan jelen volt.
    2. A nitrogén fixáló baktériumokat a bomlás 7. napjától nem tudtunk kimutatni. A tetem eltávolítása után (11. nap) 5 nappal (16. nap) 2 cm-en újra megjelentek.
    3. A bomlási folyamatokban résztvevő baktériumok:
       1. szakasz: Staphylococcus, Enterobacteriaceae (aerobok)
       2. szakasz: Clostridium, Bacteroides, coliform (váltás anaerobokra)

  - A rovarok szukcessziója és a közreható tényezők kölcsönhatásának vizsgálata
    1. A megjelenő és kolonizáló fajok összhangban a bomlási folyamatok változásával zajlott
    2. Az atka fajok számos egyedét sikerült kimutatni, azonban az adatok további feldolgozása szükséges az egyes atka fajok abundanciájának értékelésére.
    3. Hasonlóan az atkákhoz a púposlegyek (Phoridae) is egy fehér foltja a forenzikus entomológiának. A minta feldolgozása még folyamatban van.

Diszkusszió

- „Céline” (M2) dilemmája
  - Látszólag azonos környezeti tényezők ellenére jelentősen lelassult bomlási folyamatok
  - Lehetséges ok?
    - Antibakteriális kezelés?
- Jövőbeli célok:
  - Új elemekkel kiegészített kísérletek
  - Optimális(abb) helyszín
  - Kísérleti állatok előéletének ellenőrzése
  - Mintavételi módszer továbbfejlesztése, különböző módszerek összehasonlítása
  - További bomlástermékek vizsgálata (szabad zsírsavak, oxálsav, glikolsav; proteáz, foszfodiészteráz enzimaktivitás…) gázhalmazállapotú bomlástermékek detektálásával.
  - Infrakamerás méréssel kiegészített tetemre jellemző baktériumok detektálása

Köszönöm a figyelmet!