Studentská tvůrčí a odborná činnost
STOČ 2016

ANALÝZA BAKTERIÁLNÍ TRANSLOKACE V JATERNÍ TKÁNI LABORATORNÍHO BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Dominika BURDÍKOVÁ

Univerzita Tomáše Bati
Fakulta aplikované informatiky
Nad Stráněmi 4511
760 05 Zlín

FAI UTB ve Zlíně

Klíčová slova: *bakterie, forenzní kriminalistika, játra, bakteriální translokace, exotermické reakce*

Anotace: *Výzkumná práce je zaměřena na zkoumání mikroorganismů uvnitř střevní mikroflóry a jater laboratorního biologického materiálu se zaměřením na identifikaci aerobní a anaerobní mikroflóry. Matematickým vyjádřením je provedena analýza výše uvedené mikroflóry a její vliv na změnu tělesné teploty v procesu smrti biologického materiálu. Výsledky jsou zpracovány pomocí vědeckotechnických výpočtů v interaktivním programovém prostředí MATLAB. Verifikací a validací získaných hodnot práce vyúsťuje k odbornému závěru v oblasti vlivu bakteriální translokace vyšetřované břišní oblasti laboratorního materiálu. Výsledkem tohoto zkoumání je ověření metody stanovení doby úmrtí a jeho následné využití v oblasti kriminalistiky.*

Obsah

Úvod 4
1. Forenzní vědy 4
2. Kriminalistika 4
2.1 Kriminalistická biologie 4
3. Místo činu 5
4. Výzkumná část 5
4.1 Escherichia coli 6
4.2 Proteus mirabilis 7
4.3 Staphylococcus aureus 7
4.4 Enterococcus solitaries 7
5. Grafický výstup teplotní závislosti na bakteriálním zamoření parenchymu 9
6. Verifikace dat v programu MATLAB 10
6.1 Teplotní závislost na čase a bakteriální translokaci 11
7. Závěr 12
Literatura 12

Úvod

V předložené výzkumné práci prezentuji problematiku bakteriálního rozboru jaterní tkáně biologického laboratorního materiálu v době úmrtí. Uvedený výzkum spadá do forenzní kriminalistiky, která řeší kriminální činnost pomocí vědeckých poznatků, výzkumů a různých chemických, biologických a jiných rozborů. Konkrétně zde je využita část forenzní medicína. V této oblasti jsem se zaměřila na aerobní a anaerobní bakterie, což představuje vyšetřovanou oblast břišní dutiny – jaterní oblast. Hlavní testy jsou založeny na bakteriologickém vyšetření, především na přítomnost aerobních a anaerobních bakterií. Výzkum byl prováděn na potkanech Rattus norvegicus (laboratorního biologického materiálu), kteří nebyli speciálně vyšlechtěni k jiným účelům. Vzorky určené pro bakteriální translokaci byly odebírány v několika fázích, kdy byly odebírány bezprostředně po smrti, další vzorky v různých časových intervalech od doby úmrtí zkoumaných objektů. Disproporce u těchto vzorků jsou především v množství nakultivovaných bakterií.

1. Forenzní vědy

Forenzní vědy jsou takto označovány podle latinského slova forensis znamenající fórum. V dávném Římě se řešení trestných činů prezentovalo na veřejných fórech, proto toto označení. V českém jazyce se slovo forenzní často nahrazuje slovem soudní.
Forenzní vědy se zabývají problematikou kriminalistky. Tyto vědy dopomáhají k vyšetřování a odhalování v oblasti kriminalistiky a to pomocí aplikací specifických metod na vědeckém základě. Forenzní vědy se rozvíjí společně s všeobecným pokrokem. U těchto věd je třeba jak vědeckých poznatků, tak i logických úsudků a dedukcí, aby jednotlivá fakta, vyplývající z vědy dávala celek a tak mohla vyřešit kriminální případy. Forenzní vědy tvoří rozsáhlou oblast vědy, která se neustále posouvá kupředu, je proto nutné tyto vědy nějak dále dělit, abychom se mohli podrobněji zaměřit na určitou problematiku. V předložené práci využívám část forenzní medicína.

2. Kriminalistika

Kriminalistika je samostatný vědní obor. V předložené práci tento obor zmiňuji, protože úzce souvisí s forenzními vědami. Kriminalistika slouží k ochraně občanů a státu před trestnými činy. Stejně jako forenzní vědy vyhledává příčiny vzniku trestného činu a zkoumá a zajišťuje stopy. Zabývá se především zákonitostmi vzniku, trvání a zániku stop, dále zákonitostmi vyhledávání, zajištění a zkoumání využívaných stop.

2.1 Kriminalistická biologie

Kriminalistická biologie se zabývá vyhledáváním, zjišťováním, zkoumáním a vyhodnocováním biologických stop lidského, zvířecího a rostlinného původu. Biologický materiál lidského původu jako objekt zkoumání lze rozdělit do několika skupin:

- samovolně odloučený materiál,
- materiál oddělený od lidského těla působením násilí,
- materiál pocházející ze zaniklého organizmu.

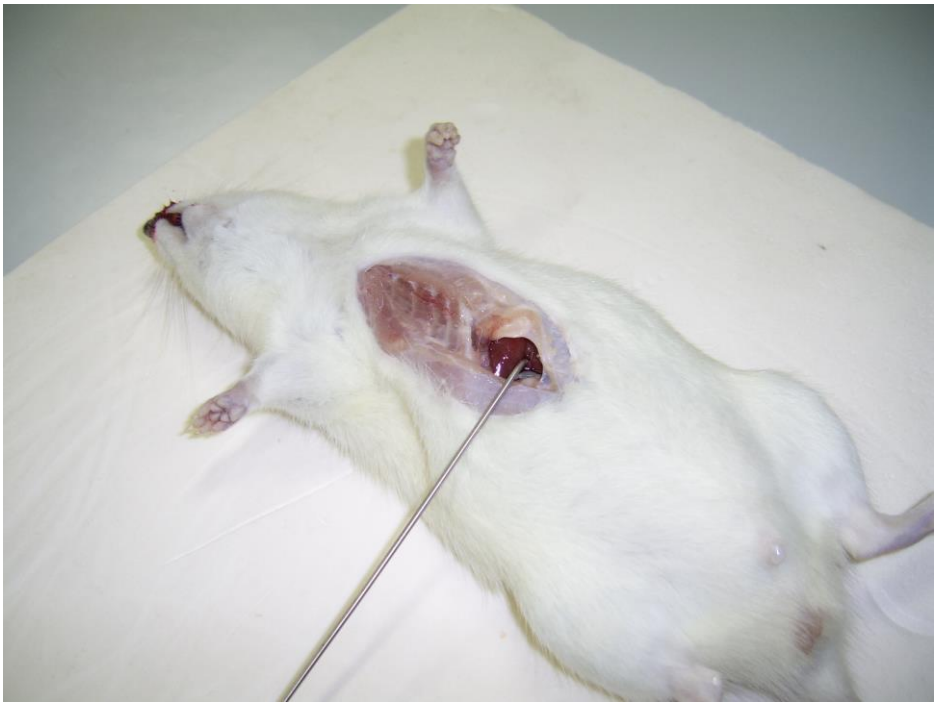
3. Místo činu

Místem činu se myslí území, prostor, kde došlo k vyšetřované události. V užším slova smyslu se jedná o místo, kde byla dokonána trestná činnost pachatele. Místo činu je často jediným zdrojem informací o spáchaném trestném činu. Na tomto místě se zajišťují nejdůležitější okolnosti potřebné pro objasnění trestného činu. Při objevení místa činu se provádí jako první zajištění místa činu, aby nedošlo k narušení a znehodnocení stop. Dále je nutné ohledat místo činu. Je-li na místě činu zemřelý, je třeba tělo ohledat. Ohledání zemřelého provádí soudní lékař. Výzkum dané problematiky se dělá především z důvodu usnadnění vyšetřování spáchaného trestného činu. Je-li nalezeno místo činu se zemřelým, první policista může provést první zkoumání – měření teploty jater. Díky této rychlé, snadné a bezkontaktní metodě následně stanoví dobu úmrtí. Než na místo činu dorazí soudní lékař, aby blíže prohlédl tělo, policista, který již stanovil dobu úmrtí, může promyslet a zahájit metody pátrání pro dopadení pachatele. Celý proces vyšetřování se tímto urychlí a usnadní.

V problematice předložené práce je třeba se zaměřit právě na manipulaci se zemřelým. Aby nedošlo ke zkreslení výsledků, je třeba provést měření teploty jater předtím, než se bude se zemřelým jakkoli hýbat. Tělo by mělo zůstat v pozici, jak ho kriminalisté našli. Až po zaznamenání naměřených výsledků by mělo dojít k následné manipulaci způsobené lékařským ohledáním těla.

4. Výzkumná část

Zpracování výsledků bakteriální translokace. Při výsledcích z bakteriální translokace laboratorního biologického materiálu byla zjištěna přítomnost bakterií (Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Enterococcus solitarius) v játrech, které nám ovlivňují průběh poklesu teploty. Vzorky byly odebírány z parenchymu. V játrech se běžně vyskytuje velký počet bakterií různých kmenů. Nejčastěji se jedná o bakterie: Aerococcus viridans, Micrococcus luteus, Staphylococcus xylosus, Pasteurella pneumotropica, Staphylococcus aureus, Staphylococcus nepalensis, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Enterococcus solitarius. Převážně zde převládaly 4 konkrétní druhy bakterií (viz. Výpis z identifikace vzorků) - Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Enterococcus solitarius. Tyto bakterie byly určeny s přesností +++ až ++, což znamená, že identifikace jednotlivých bakterií je velmi přesná, bakterie vyskytovaly v hojném počtu. Identifikace bakteriálních rozborů byla provedena metodou MALDI-TOF. Tato metoda je velice přesná. Dá se aplikovat na široké spektrum mikroorganismů. Bakterie se dají pomocí popsané metody rozlišit na rodové, druhové i kmenové úrovni. Ve zjednodušeném pojetí je tato metoda založena na spektrometrii.



Obrázek č. 1 – odběr vzorků z povrchu jater

4.1 Escherichia coli

E. coli je jeden z nejznámějších a nejběžnějších mikroorganismů. Jedná se o modelový organismus, na kterém byly prozkoumány a popsány jevy jako bakteriální konjugace či replikace DNA.
Jedná se o pohyblivé, gramnegativní, nesporulující tyčky, 2-3 μm dlouhé a 0,5-0,8 μm široké. Vyskytují se jednotlivě nebo po dvojicích, jsou pohyblivé peritrichálními bičíky. Mají jak respiratorní, tak fermentatorní typ metabolismu, živí se chemoorganotrofně. Rostou na běžných půdách, kde se jeví jako drobné kulaté kolonie, vykazují značnou biochemickou aktivitu - štěpí glukózu a laktózu za tvorby plynu, tvoří indol, neštěpí močovinu. *E. coli* je oxidáza negativní, kataláza pozitivní, metylčerveň pozitivní, citrát negativní. Optimální teplota růstu je 37 °C. Je součástí přirozené střevní mikroflóry člověka a dalších teplokrevných živočichů, kde se působí jako užitečný komenzál. *E. coli* produkující enterotoxiny mohou způsobovat průjmy a jsou i častými původci infekcí močového traktu, nozokominálních infekcí včetně septikémií a meningitid.

Ve studiích a odborné literatuře není prokázáno, že by se *E. Coli* běžně vyskytovala v jaterní tkáni. Je tedy pravděpodobné, že se do tkáně bakterie dostala sekundárně. Jeden z důvodů sekundárního výskytu je, že všechny vzorky utrpěly krevní trauma. Tento způsob je méně pravděpodobný. K infikování bakterií také mohlo dojít již po narození a růstu, nevíme totiž, z jakého prostředí zkoumaný materiál pochází. Některé kmeny *E. Coli* mohou způsobovat u potkanů chronická onemocnění jater, ale ve studiích je uváděno, že se vždy jednalo o aktivní inokulaci daného kmene *E. coli*, což znamená, že by *E. coli* musela být naočkována. Primárně se zde nevyskytují.

4.2 Proteus mirabilis

Proteus mirabilis je gramnegativní anaerobní bakterie. Způsobuje 90 % infekcí rodu Proteus. Je součástí normální střevní flory, vyskytuje se také v půdě, ve vodě, na rostlinách, ve stolici lidí a zvířat. Proteus je nalezený v mnoha ekologických stanovištích, včetně dlouhodobých zdravotnických zařízení a nemocnic. Patří do skupiny enterobakterií. Vyznačuje se plazivým růstem. Nejčastěji dochází k infekcím, pokud se bakterie přesunou do močové trubice a močového měchýře.
Bakterie mohou vstoupit do krevního řečiště skrze poranění, vyvolají zánětlivou reakci, která může způsobit sepsi.

Stejně jako *E. coli* je výskyt této bakterie v játrech sekundární. I zde je velice pravděpodobná inokulace tohoto kmene.

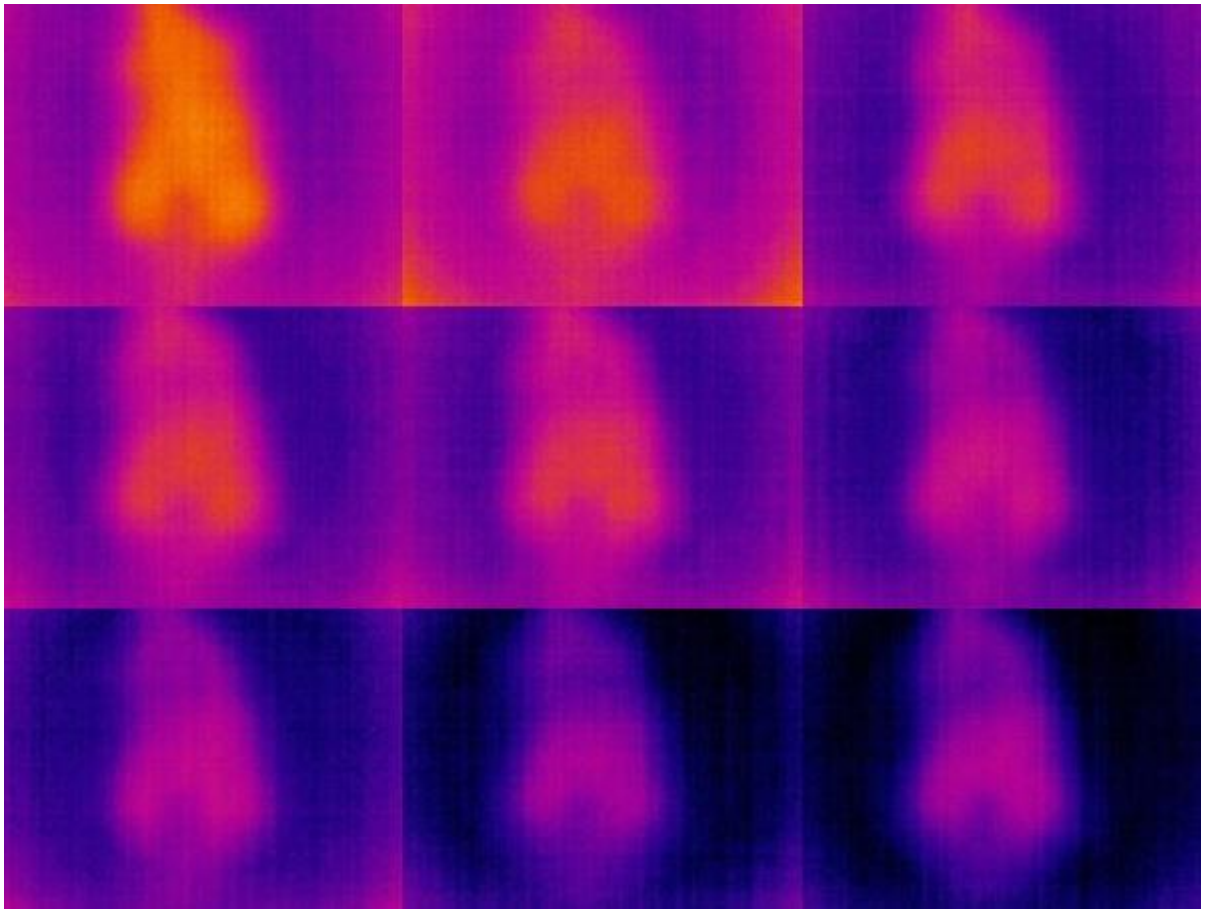
4.3 Staphylococcus aureus

S. aureus je asi 1μm mikroorganismus kulovitého tvaru, vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích, tetrádách či nepravidelných shlucích. Typický je růst stafylokoků ve shlucích tvaru hroznu. Barví se grampozitivně, je nepohyblivý, nesporulující, fakultativně anaerobní. Živí se chemoorganotrofně, metabolismus má jak respiratorní, tak fermentatorní. Kolonie jsou obvykle neprůhledné, bílé až krémové barvy, občas žluté až žlutooranžové. Kataláza pozitivní, oxidáza negativní, redukují nitráty. Rostou v přítomnosti 10% NaCl, optimální teplota růstu se pohybuje mezi 30 °C – 37 °C. Stafylokoky jsou všudypřítomné bakterie, jejich výskyt je primárně vázán s kůží, kožními žlázami a sliznicemi širokého spektra teplokrevných obratlovců, kde se uplatňuje jako běžný komenzál. Dále jsou často izolovány z různých potravin živočišného původu (maso, mléko, sýr) a z nejrůznějších zdrojů v prostředí jako je půda, voda, písek a prach. *S. aureus* je zřejmě nejúspěšnější lidský patogen, který zapříčiňuje velké spektrum onemocnění od nejběžnějších hnisavých onemocnění kůže, abscesů až po sepse a alimentární intoxikace. Má pozitivní koagulázu volnou i vázanou.

Bakterie se může primárně vyskytovat prakticky ve všech tkáních a orgánech. Nejedná se ale o invazivní mikroorganismus, pokud je hostitel zdravý a jeho imunitní systém v pořádku. Pokud se v játrech vyskytovala jen v malých počtech, pravděpodobně nezapříčinila zvyšování teploty. Aby ji zvýšila, muselo by se jednat o větší množství nebo už o stafylokokovou infekci. Z našich výsledků známe, že se v játrech vyskytovala bakterie ve větším počtu a to u mnoha vzorků.

4.4 Enterococcus solitaries

Jedná se o anaerobní gram-pozitivní bakterie vyskytující se v párech či řetězcích. Tvoří přirozenou mikroflóru ve střevě. Rostou v hypertonickém roztoku NaCl, ale mohou velmi dobře růst i za přítomnosti žluči. Patří mezi podmíněné patogeny.
Vzorky, u kterých byla identifikována bakterie Enterococcus solitarius byly zamořeny infekcí. Infekčnímu zamoření organismu mohlo dojít v průběhu života, ale také po smrti vzorku. U těchto vzorků bylo více pravděpodobné, že právě zmíněná bakterie se podílela na zvyšující se teplotě nejvíce. Došlo-li k infekci, bakterie se vyskytovala ve vyšetřované oblasti ve větším počtu, proto i po translokaci byla ve výsledcích tato bakterie v největším počtu.

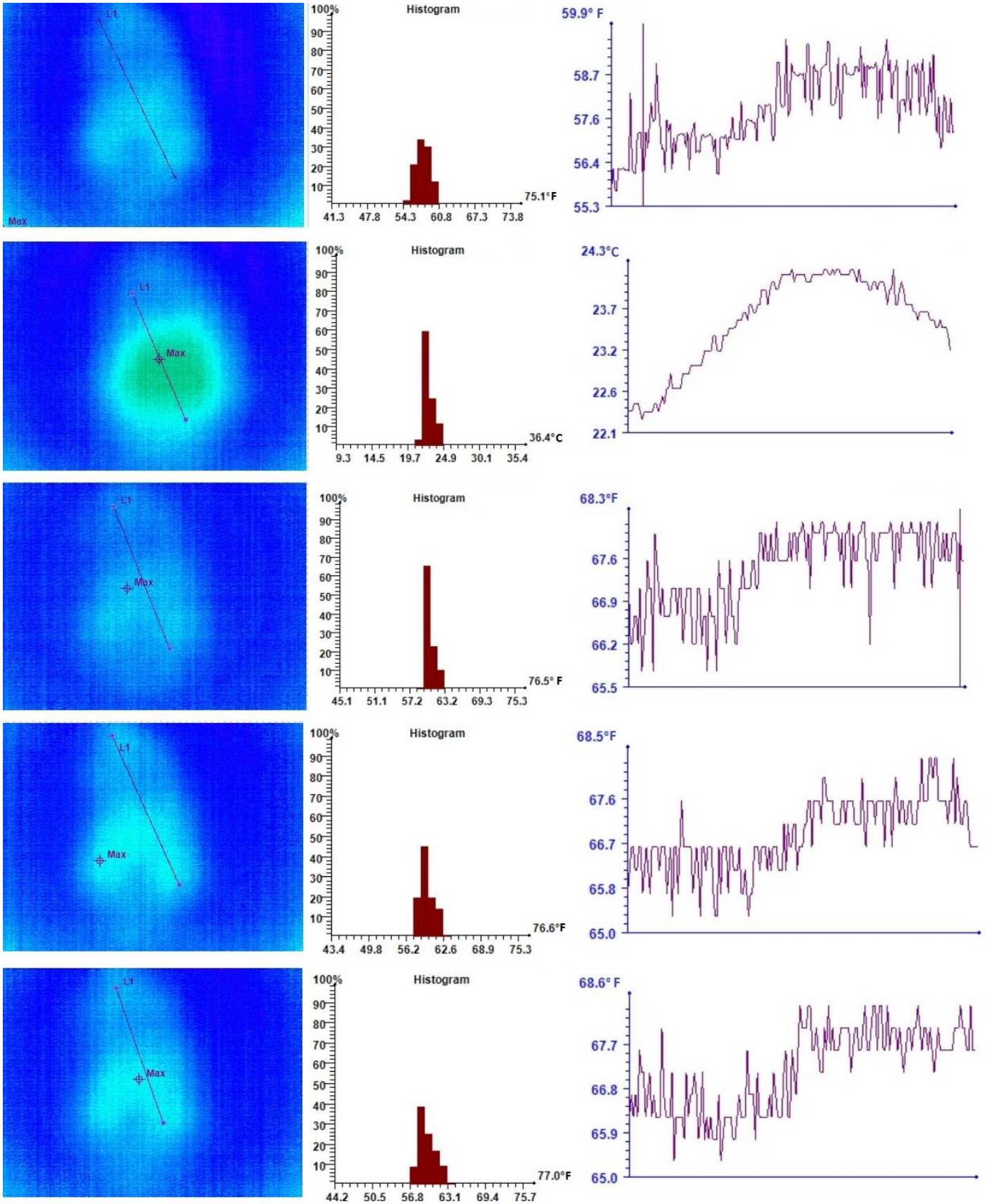


Obrázek č. 2 – Postupné chladnutí biologického materiálu

Tabulka č. 1 – zastoupení bakterií zkoumaných vzorků

Escherichia coli	82%
Staphylococcus aureus	64%
Proteus mirabilis	36%
Enterococcus soltarius	18%

5. Grafický výstup teplotní závislosti na bakteriálním zamoření parenchymu



Na snímcích z termokamery lze vidět teplota jater zkoumaného materiálu. Místa s nejvyšší teplotou jsou oblasti s nejpočetnější bakteriální translokací.

6. Verifikace dat v programu MATLAB

Na základě naměřených dat byly vykresleny grafické závislosti času, teploty a bakteriální translokace dvou ukázkových vzorků v programu MATLAB. Základní výpis zdrojového kódu pro vykreslení je uveden níže.

Načtení dat

Načtení dat ze souboru:

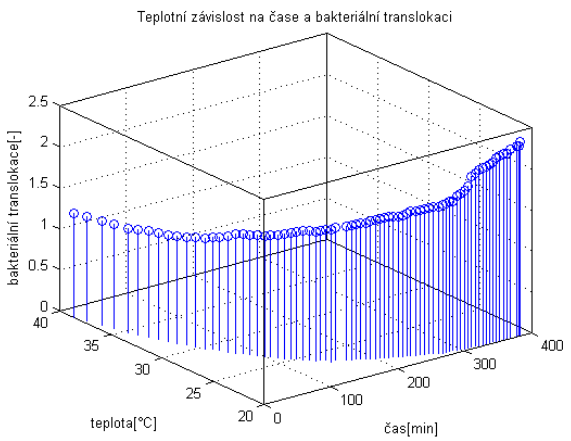
```
vzorek1 = xlsread('pluska.xlsx', 1, 'I12:K89');
vzorek2 = xlsread('pluska.xlsx', 1, 'M12:O89');
```

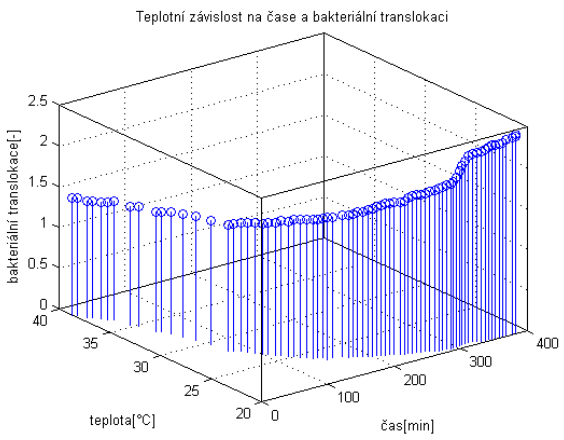
Vykreslení dat

Vykreslení načtených dat, popis grafu, popis os:

```
figure(1);
s = stem3(vzorek1(:,1),vzorek1(:,2),vzorek1(:,3));
title('Teplotní závislost na čase a bakteriální translokaci');
xlabel('čas[min]');
ylabel('teplota[°C]');
zlabel('bakteriální translokace[-]');
view(3);

figure(2);
s = stem3(vzorek2(:,1),vzorek2(:,2),vzorek2(:,3));
title('Teplotní závislost na čase a bakteriální translokaci');
xlabel('čas[min]');
ylabel('teplota[°C]');
zlabel('bakteriální translokace[-]');
view(3);
```





6.1 Teplotní závislost na čase a bakteriální translokaci

Teplotní závislost na čase a bakteriální translokaci - vzorek č. 1													
čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
teplota [°C]	38,6	37,6	36,5	35,6	34,6	33,9	33,2	32,6	32,0	31,4	30,8	30,3	29,7
bakteriální translokace	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1,29	1,30	1,30	1,30	1,31	1,31	1,33	1,34
čas [min]	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125
teplota [°C]	29,3	28,9	28,4	28,0	27,6	27,3	26,9	26,5	26,2	25,8	25,5	25,2	25,0
bakteriální translokace	1,37	1,38	1,41	1,45	1,46	1,46	1,47	1,47	1,49	1,50	1,52	1,54	1,55
čas [min]	130	135	140	145	150	155	160	150	170	175	180	185	190
teplota [°C]	24,7	24,4	24,1	24,0	23,8	23,6	23,5	23,3	23,1	22,9	22,8	22,7	22,5
bakteriální translokace	1,57	1,57	1,57	1,57	1,59	1,59	1,61	1,62	1,62	1,64	1,65	1,65	1,66
čas [min]	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255
teplota [°C]	22,4	22,2	22,1	22,0	21,9	21,8	21,6	21,5	21,4	21,4	21,2	21,1	21,0
bakteriální translokace	1,68	1,69	1,70	1,70	1,71	1,71	1,71	1,72	1,74	1,75	1,76	1,76	1,77
čas [min]	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305	310	315	320
teplota [°C]	20,9	20,8	20,6	20,5	20,5	20,5	20,5	20,4	20,4	20,3	20,3	20,3	20,2
bakteriální translokace	1,78	1,78	1,79	1,81	1,81	1,82	1,82	1,87	1,89	1,93	1,97	2,08	2,11
čas [min]	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	385	380	385
teplota [°C]	20,2	20,2	20,2	20,2	20,2	20,2	20,2	20,1	20,1	20,1	20,2	20,1	20,1
bakteriální translokace	2,14	2,16	2,16	2,17	2,19	2,23	2,25	2,26	2,26	2,29	2,30	2,32	2,35

Teplotní závislost na čase a bakteriální translokaci - vzorek č. 2													
čas [min]	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
teplota [°C]	38,7	38,5	37,8	37,6	37,1	36,8	36,5	35,2	34,7	33,3	33,1	32,5	31,7
bakteriální translokace	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,44	1,45	1,45	1,47	1,47	1,48	1,50	1,50
čas [min]	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125
teplota [°C]	30,7	29,6	28,2	28,0	27,6	27,3	26,9	26,4	26,2	25,8	25,6	25,2	25,0
bakteriální translokace	1,52	1,53	1,54	1,55	1,58	1,59	1,60	1,60	1,62	1,63	1,65	1,66	1,68
čas [min]	130	135	140	145	150	155	160	150	170	175	180	185	190
teplota [°C]	24,7	24,4	24,1	24,0	23,8	23,7	23,5	23,4	23,2	22,9	22,8	22,7	22,5
bakteriální translokace	1,69	1,70	1,70	1,70	1,71	1,72	1,72	1,74	1,74	1,74	1,75	1,77	1,78
čas [min]	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255
teplota [°C]	22,3	22,2	22,1	22,0	21,9	21,8	21,7	21,4	21,3	21,3	21,2	21,1	21,0
bakteriální translokace	1,80	1,81	1,83	1,84	1,86	1,86	1,86	1,87	1,88	1,91	1,92	1,93	1,93
čas [min]	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305	310	315	320
teplota [°C]	20,9	20,8	20,6	20,5	20,5	20,4	20,3	20,4	20,4	20,4	20,5	20,5	20,6
bakteriální translokace	1,94	1,96	1,97	1,99	1,99	2,01	2,02	2,03	2,08	2,14	2,19	2,24	2,28
čas [min]	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	385	380	385
teplota [°C]	20,5	20,4	20,3	20,2	20,2	20,2	20,2	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1	20,1
bakteriální translokace	2,30	2,32	2,32	2,34	2,36	2,37	2,37	2,37	2,38	2,40	2,41	2,41	2,43

7. Závěr

Výzkum byl zaměřen na zvyšování teploty jater v procesu Algor Mortis. Jak již bylo výše uvedeno, vzorky pro bakteriální rozbor byly odebírány z povrchu jater. Vzhledem k výskytu bakterií uvnitř jaterní tkáně muselo dojít k zaplavení bakteriemi celou zkoumanou tkání a následně se bakterie translokací dostaly až na povrch vyšetřované oblasti. Při pozitivním bakteriálním nálezu je zřejmé, že k translokaci dochází ihned po úmrtí zkoumaného materiálu. Translokace je dlouhý proces, při kterém se nakultivuje obrovské množství počtu bakterií. Na základě verifikace dat není možné přesně stanovit, která konkrétní bakterie teplotu navyšuje nejvíce. Ve zkoumaných vzorcích byly nejvíce zastoupeny 4 druhy bakterií. V tabulce č. 1 je uveden procentuální výskyt těchto bakterií. Z tabulky lze vyčíst, že nejčastěji se vyskytující bakterie je *E. Coli*. Přítomnost této bakterie byla prokázána u 82% zkoumaných vzorků. Po úmrtí u biologického materiálu v jaterní oblasti dojde k nekontrolovatelnému zaplavení bakteriemi vyšetřované oblasti. Po určité době dojde ke skokovému navýšení teploty vyšetřované oblasti (viz graf č. 1 a 2). Příčinou tohoto nárůstu jsou exotermické reakce, které způsobuje právě bakteriální translokace. Ke zvyšování teploty dopomáhají všechny bakterie nacházející se ve vyšetřované oblasti. Je nutné, aby se bakterie v játrech mohly primárně vyskytovat nebo aby tam mohly být krví, lymfou dopraveny. Z problematiky vyplývá, že je nutná přítomnost bakterií v době úmrtí zkoumaného materiálu v játrech primárně nebo aby se bezprostředně po smrti do jater dostaly.

Literatura

[1] IVANKA, Ján. The Pathological Effect of Bacterial Translocation to the Henssge Nomogram. *The Pathological Effect of Bacterial Translocation to the Henssge Nomogram*. 2012. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.09.511. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705812045742

[2] RNDR. SEDLÁČEK, Ivo CSc. *Taxonomie Prokaryot*. 1. vyd. Brno: Typo Art Pres, 2007. ISBN 80-210-4207-9.

[3] American Academy of Forensis Science. *American Academy of Forensis Science* [online]. [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: http://www.aafs.org/