

Recommendations of the Polish-speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics (ISFG-PL) regarding the disclosure of biological traces and the handling of evidence for identification tests

Zalecenia Polskojęzycznej Grupy Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG-PL) dotyczące ujawniania i identyfikacji śladów biologicznych przeznaczonych do badań genetycznych

Ryszard Pawłowski ^[1], Wojciech Branicki ^[2,3], Tomasz Kupiec ^[3], Tomasz Grzybowski ^[4], Agnieszka Parys-Proszek ^[3], Monica Abreu-Głowacka ^[5], Kornelia Drożdżiak ^[6], Marzanna Ciesielka ^[7], Marcin Woźniak ^[4], Andrzej Ossowski ^[8], Renata Jacewicz ^[9]

[1] Pracownia Biologii i Genetyki Sądowej, Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska

[2] Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, Polska

[3] Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie, Kraków, Polska

[4] Katedra Medycyny Sądowej, Collegium Medium w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, Polska

[5] Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Poznań, Polska

[6] Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice, Polska

[7] Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin, Polska

[8] Zakład Genetyki Sądowej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Szczecin, Polska

[9] Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej, Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

Abstract

The purpose of this paper is to formulate recommendations for the disclosure of biological traces in the laboratory and the handling of forensic evidence submitted for identification tests, recommended by the Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics. The paper organizes the knowledge of the most relevant stages of preliminary analysis of biological traces based on both literature sources and those resulting from years of research practice. Recommendations formulated in the course of multi-stage expert consultations contained in this study should be used in the development of laboratory procedures applied during the execution.

Keywords

ISFG-PL guidelines, biological traces, forensic evidence, disclosure and proceeding, preliminary studies, pre-genetic tests

Streszczenie

Celem niniejszego opracowania jest sformułowanie zaleceń dotyczących ujawniania śladów biologicznych w laboratorium i postępowania z materiałem dowodowym przekazanym do badań identyfikacyjnych, rekomendowanych przez Polskojęzyczną Grupę Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (*The Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics*). Opracowanie porządkuje wiedzę z zakresu najistotniejszych etapów badań wstępnych śladów biologicznych, w oparciu zarówno o źródła z piśmiennictwa, jak również wynikające z wieloletniej praktyki badawczej. Wypracowane w toku wieloetapowych konsultacji eksperckich rekomendacje zawarte w niniejszym opracowaniu powinny być wykorzystywane w tworzeniu procedur laboratoryjnych używanych w trakcie realizacji zleceń podmiotów prowadzących postępowania związane z analizą śladów biologicznych.

Słowa kluczowe

wytyczne ISFG-PL, ślady biologiczne, materiał dowodowy, ujawnianie i postępowanie, badania wstępne, testy przedgenetyczne

Introduction

The process of selecting traces for biological content and for genetic testing depends on a number of factors such as the nature of the incident and the questions included in the order, the type, size and state of preservation of the biological trace, the method of preservation (with or without a substrate), etc.

The following recommendations specify the standards for performing preliminary studies of biological traces, the purpose of which is the disclosure and identification of the type of biological material followed by its evaluation and qualification for DNA testing.

The principles presented for the disclosure, selection for testing and documentation of biological traces, as well as the methodology for identifying the type of biological substances are derived from the data published on the specificity of preliminary studies, the level of contamination and sources of secondary transfer, along with the requirements of the CCP, the PN-EN ISO/IEC 17025:2018-2 standard, the DAB-10 document and the principles of good laboratory practice – GLP [1-10]. Visual inspection of physical evidence with regard to genetic testing that generally follows must take into account stringent requirements and standards, especially in terms of preventing contamination and degradation of forensic evidence.

Wstęp

Proces typowania śladów do badań pod kątem zawartości materiału biologicznego oraz do badań genetycznych zależy od wielu czynników, takich jak: charakter zdarzenia oraz pytania zawarte w zleceniu, rodzaj, wielkość i stan zachowania śladu biologicznego, sposób zabezpieczenia (z podłożem lub bez podłoża), itp.

W poniższych rekomendacjach określono standardy wykonania wstępnych badań śladów biologicznych, których celem jest ujawnienie i rozpoznanie rodzaju materiału biologicznego, a następnie dokonanie jego oceny i kwalifikacji do badań DNA.

Przedstawione zasady ujawniania, typowania do badań i dokumentowania śladów biologicznych oraz metodyka identyfikacji rodzaju substancji biologicznych wynikają z opublikowanych danych dotyczących specyficzności testów wstępnych, poziomu kontaminacji oraz źródeł transferu wtórnego, jak również wymagań KPK, normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-2, dokumentu DAB-10 oraz zasad dobrej praktyki laboratoryjnej – DPL/GLP (ang. *Good Laboratory Practice*) [1-10]. Oględziny dowodów rzeczowych, ze względu na następujące po nich z reguły badania genetyczne, muszą uwzględniać restrykcyjne wymagania i standardy, szczególnie w aspekcie przeciwdziałania kontaminacji i degradacji materiału dowodowego.

A. Preparation and decontamination of the examination site

A.1. Preparation of the site in which visual inspection of physical evidence is conducted comprises decontamination of the room and tools as well as application of appropriate protective clothing.

A.2. Disclosure of biological substances on physical evidence should take place in a room exclusively dedicated for the visual inspection of physical evidence.

A.3. Only one piece of physical evidence should be worked with at a time to avoid cross-contamination.

A.4. Throughout the entire process of inspection, preservation and testing, it is necessary to ensure maximum protection of physical evidence and traces from contamination.

B. Descriptive documentation of forensic evidence

B.1. The laboratory must keep a written procedure for handling the test material which should include:

- description of the manner of documentation of all activities,
- identification methods for biological traces,
- ways of collecting them for testing.

B.2. All biological traces disclosed must be documented in the inspection report as well as in the expert opinion of forensic evidence.

B.3. The documentation must encompass all traces that will undergo further testing of a destructive nature.

C. Disclosure and collection of biological traces

C.1. Preliminary non-destructive tests should be conducted first, especially if the amount of forensic evidence is limited.

C.2. With the use of alternative light sources (so-called specialized light) during the inspection, it is advisable to state in the examination report/opinion the type of equipment used for the illumination and its settings used to disclose biological traces.

C.3. If biological traces are detected using alternative light sources or chemicals (e.g. luminol), their location must be documented.

C.4. The examination report should indicate the location of the trace and if the whole trace or part of it was taken for examination.

C.5. It is recommended that the entire disclosed trace is not taken for examination (if possible).

C.6. Each sample taken for testing from a trace requires an individual identification and a description of how it was taken should be included in the examination report/opinion. In a situation where more than one sample is taken from the same trace, its individual identification is also required to be entered.

A. Przygotowywanie i dekontaminacja miejsca badań

A.1. Przygotowanie miejsca, w którym prowadzone są oględziny dowodów rzeczowych obejmuje dekontaminację pomieszczenia i narzędzi oraz zastosowanie odpowiedniego ubioru ochronnego.

A.2. Ujawnianie substancji biologicznych na dowodach rzeczowych powinno odbywać się w dedykowanym pomieszczeniu, przeznaczonym wyłącznie do oględzin dowodów rzeczowych.

A.3. Należy pracować na raz tylko z jednym dowodem rzeczowym, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego (ang. cross-contamination).

A.4. Podczas całego procesu oględzin, zabezpieczania i testowania należy zapewnić maksymalną ochronę dowodów rzeczowych i śladów przed kontaminacją.

B. Dokumentacja opisowa materiału dowodowego

B.1. Laboratorium musi posiadać pisemną procedurę postępowania z badanym materiałem, która powinna zawierać:

- opis sposobu dokumentacji wszystkich czynności,
- metody identyfikacji śladów biologicznych,
- sposoby ich pobierania do badań.

B.2. Wszystkie ujawnione ślady biologiczne muszą zostać udokumentowane w protokole oględzin, jak również w opinii biegłego z dowodu.

B.3. Dokumentacja musi objąć wszystkie ślady, które poddane zostaną dalszym badaniom o charakterze niszczącym.

C. Ujawnianie i pobieranie śladów biologicznych

C.1. W pierwszej kolejności należy przeprowadzić wstępne testy nieniszczące, szczególnie wtedy, gdy ilość materiału dowodowego jest ograniczona.

C.2. Przy stosowaniu w trakcie oględzin alternatywnych źródeł światła (tzw. światła specjalistycznego) wskazane jest podanie w sprawozdaniu/opinii z badań rodzaju użytego do oświetlenia urządzenia oraz jego ustawień zastosowanych do ujawniania śladów biologicznych.

C.3. W przypadku detekcji śladów biologicznych z wykorzystaniem alternatywnych źródeł światła lub substancji chemicznych (np. luminolu), należy udokumentować ich lokalizację.

C.4. W sprawozdaniu z badania należy wskazać miejsce występowania śladu oraz czy do badań pobrano jego całość, czy też fragment.

C.5. Zalecane jest niepobieranie do badań całości ujawnionego śladu (jeśli jest to możliwe).

C.6. Każda próbka pobrana do badań ze śladu wymaga indywidualnego oznaczenia oraz opisu sposobu pobrania, umieszczonego w sprawozdaniu/opinii z badań. W sytuacji, kiedy pobierana jest więcej niż jedna próbka z tego samego śladu, wymagane jest również wprowadzenie jej indywidualnego oznaczenia.

D. Securing biological material which remains after testing

D.1. If the volume of material available for testing makes it possible, it is imperative to leave and secure the unused portion of the material for any further testing, including control testing.

D.2. The forensic evidence remaining after the analysis should be returned to the ordering party together with the opinion prepared.

D.3. In the case of inability to return the material remaining after testing (e.g. human remains), the ordering party should be notified of this fact as well as of the period of time for which the material remaining after testing will be stored. Upon request of the ordering party, the laboratory should make it possible to transfer the material for long-term storage in another unit.

E. Testing for the presence of biological substances on objects

E.1. Identification of the type of biological substance present in the trace should be performed based on at least one specific test or at least two non-specific tests, if such tests are available for the type of trace.

E.2. Contact traces can be subjected directly to genetic analysis with the omission of tests for the presence of biological substances.

E.3. Given the characteristics of immunochemical tests, it is emphasized that they need to be thoroughly internally validated, and precise wording is recommended when reporting the results of these tests, considering the specificity and sensitivity of a particular test.

E.4. As long as the amount of material makes it possible, it is necessary to conduct tests which provide unequivocal determination of the type of biological substance present in the investigated trace.

E.5. If the volume of the trace available for testing is too low to be able to establish a DNA profile and determine the type of biological substance present in the tested trace, it is recommended that arrangements be made with the ordering party on further proceedings.

E.6. Visual microscopic examination is the preferred method for confirming the presence of semen in biological traces. In the absence of possibility to perform it, obtaining positive results in at least two preliminary tests, including at least one immunochemical test and disclosing after preferential lysis the presence of a male DNA profile in the sperm fraction, taken together they provide a basis for inferring the possibility of the presence of semen in the investigated trace.

E.7. The swabs for examination should be collected only using sterile water or other buffers of molecular purity, verified to have no effect on further stages of the study.

E.8. Selection of the method which should be used for specific identification of the presence of blood is left to the discretion of the expert, depending on the size of the trace and the procedures used in the laboratory.

D. Zabezpieczanie materiału biologicznego pozostającego po badaniach

D.1. Jeśli ilość dostępnego do badań materiału na to pozwala, należy bezwzględnie pozostawić oraz zabezpieczyć jego nieużytą część do ewentualnych dalszych badań, w tym badań kontrolnych.

D.2. Pozostały po analizie materiał dowodowy powinien zostać odesłany do zlecającego wraz ze sporządzoną opinią.

D.3. W przypadku braku możliwości odesłania pozostającego po badaniach materiału (np. szczątki ludzkie), zleceniodawca powinien zostać powiadomiony o tym fakcie, z podaniem okresu czasu, przez jaki pozostały po badaniach materiał będzie przechowywany. Laboratorium powinno umożliwić, na życzenie zleceniodawcy, przekazanie materiału do przechowywania długoterminowego w innej jednostce.

E. Badanie obecności substancji biologicznych na obiektach

E.1. Identyfikacja rodzaju substancji biologicznej obecnej w śladzie powinna być przeprowadzona, w oparciu o co najmniej jeden test swoisty lub co najmniej dwa testy nieswoiste, jeśli tego rodzaju testy są dostępne dla danego rodzaju śladu.

E.2. Ślady kontaktowe można poddawać bezpośrednio analizie genetycznej z pominięciem testów na obecność substancji biologicznych.

E.3. Ze względu na charakterystykę testów immunochemicznych podkreśla się znaczenie ich dokładnej walidacji wewnętrznej oraz zaleca się stosowanie precyzyjnych sformułowań przy raportowaniu wyników tych testów, uwzględniających specyficzność i czułość danego testu.

E.4. Jeżeli tylko pozwala na to ilość materiału, należy przeprowadzić testy, które dają możliwość określenia w sposób jednoznaczny rodzaj substancji biologicznej obecnej w badanym śladzie.

E.5. Gdy ilość dostępnego do badań śladu jest zbyt mała, aby możliwe było zarówno ustalenie profilu DNA jak i określenie rodzaju substancji biologicznej obecnej w badanym śladzie, zaleca się przeprowadzenie uzgodnienia ze zleceniodawcą, co do dalszego toku postępowania.

E.6. Preferowaną metodą potwierdzenia obecności nasienia w śladach biologicznych są oględziny mikroskopowe. W przypadku braku możliwości ich wykonania uzyskanie pozytywnych wyników w co najmniej dwóch testach wstępnych, w tym co najmniej w jednym teście immunochemicznym, oraz ujawnienie po lizie preferencyjnej obecności męskiego profilu DNA we frakcji plemnikowej dają razem podstawę do wnioskowania o możliwości występowania nasienia w badanym śladzie.

E.7. Wymazy do badań powinny być pobierane wyłącznie z użyciem jałowej wody lub innych buforów o czystości molekularnej, zweryfikowanych pod kątem braku ich wpływu na dalsze etapy badań.

E.8. Wybór metody, jaka powinna być zastosowana do swoistej identyfikacji obecności krwi pozostawia się do decyzji biegłego w zależności od wielkości śladu oraz stosowanych w laboratorium procedur.

F. Non-specific, preliminary (screening) tests

F.1. In the case of testing for the presence of biological substances with non-specific tests, it is necessary to report the result in three possible ways:

- a positive result may indicate the presence/does not allow the exclusion of the presence of a specific substance;
- a negative result does not allow determination of the presence of a specific substance;
- an ambiguous (doubtful, inconclusive) result does not allow inferring the presence or absence of a particular substance.

F.2. The obtained concentration/activity levels of the tested markers should be taken into account when interpreting the results.

G. Specific tests confirming the presence of a biological substance

G.1. In the case of testing for the presence of biological substances with specific tests, it is necessary to report the result in three possible ways:

- a positive result indicating the presence of a specific substance;
- a negative result indicating failure to detect the presence of a specific substance;
- an ambiguous (doubtful, inconclusive) result obliging to conduct additional tests prior to their final interpretation (only if it is possible).

G.2. Human blood and semen can be identified based on specific tests providing a certain confirmation of their presence.

G.3. For biological substances (biological fluids and tissues) other than blood and semen, there are currently no known fully specific tests available commercially. Any method used for the specific identification of such substances should be validated both developmentally and internally before use, and the results of the validation should be published in a peer-reviewed scientific journal.

H. Reporting and interpreting detection of biological substances

H.1. Information on the type of tests performed should be included in the examination protocol and report/opinion in each case, so that it can be established unequivocally by what techniques and methods the results reported for a given trace were obtained, and the section of the report/opinion relating to it is formulated.

H.2. When reporting semen test results, it is important to distinguish between the presence of whole semen containing spermatozoa and the presence of seminal fluid.

H.3. In the case of an inconclusive test result for the presence of a specific biological substance, the examination report/opinion may only contain a statement about the possible presence of a specific biological substance, but may not conclusively indicate its presence.

F. Testy nieswoiste, wstępne (przesiewowe)

F.1. W przypadku badania obecności substancji biologicznych testami nieswoistymi należy raportować wynik na trzy możliwe sposoby:

- Wynik pozytywny (dodatni) może wskazywać na obecność/ nie pozwala na wykluczenie obecności określonej substancji;
- Wynik negatywny (ujemny) nie pozwala na stwierdzenie obecności określonej substancji;
- Wynik niejednoznaczny (wątpliwy, nierozstrzygujący) nie pozwala na wnioskowanie, co do obecności określonej substancji bądź jej braku.

F.2. Przy interpretacji wyników należy uwzględnić uzyskane poziomy stężenie/aktywności badanych markerów.

G. Testy swoiste, potwierdzające obecność substancji biologicznej

G.1. W przypadku badania obecności substancji biologicznych testami swoistymi należy raportować wynik na trzy możliwe sposoby:

- Wynik pozytywny (dodatni) wskazujący na obecność określonej substancji;
- Wynik negatywny (ujemny) wskazujący na niewykrycie obecności określonej substancji;
- Wynik niejednoznaczny (wątpliwy, nierozstrzygujący), obli-gujący do przeprowadzenia dodatkowych testów przed ich ostateczną interpretacją (jeśli jest to tylko możliwe).

G.2. Krew i nasienie człowieka można identyfikować w oparciu o testy swoiste dające pewne potwierdzenie ich obecności.

G.3. Dla substancji biologicznych (płynów biologicznych i tkanek) innych niż krew i nasienie nie są obecnie znane w pełni swoiste testy dostępne komercyjnie. Jakkolwiek metoda używana do swoistej identyfikacji takich substancji powinna zostać przed wykorzystaniem poddana walidacji, zarówno rozwojowej, jak i wewnętrznej, a wyniki walidacji powinny zostać opublikowane w recenzowanym czasopiśmie naukowym.

H. Raportowanie i interpretacja detekcji substancji biologicznych

H.1. Informacja o rodzaju wykonanych testów powinna się każdorazowo znaleźć się w protokole z badań i sprawozdaniu/opinii, tak aby można było jednoznacznie ustalić, przy użyciu jakich technik i metod uzyskano raportowane dla danego śladu wyniki oraz sformułowano dotyczącą go część sprawozdania/opinii.

H.2. Przy podawaniu wyników testów na obecność nasienia należy rozróżnić stwierdzenie obecności pełnego nasienia, w którym znajdują się plemniki, od obecności płynu nasiennego.

H.3. W przypadku niejednoznacznego wyniku badań na obecność określonej substancji biologicznej sprawozdanie/opinia z badań może jedynie zawierać stwierdzenie o możliwej obecności określonej substancji biologicznej, nie może natomiast jednoznacznie wskazywać na jej obecność.

1. Preparation and decontamination of examination site

The following steps are imperative before starting the examination of physical evidence:

- Decontamination of the room where visual inspection is performed and material is collected for genetic testing. All working surfaces and reusable auxiliary tools coming into contact with the test material must be subjected to DNA removal, both before and after testing of the material.
- Disposable consumables, including test tubes and pipette tips, should be used whenever possible. The use of disposable tips with filters is recommended, as well as the use of disposable small laboratory tools such as scalpels and tweezers that are DNA and RNA free as well as RNase and DNase free.
- Some additional measures that prevent contamination with unwanted DNA include the use of chemical reagents that remove DNA (e.g. sodium hypochlorite), the use of UV exposure (UV Crosslinker, indoor UV lamps).

All laboratory activities in the examination rooms should be performed in disposable protective clothing (apron, mask and head cap). Gloves should be changed unconditionally after each piece of physical evidence examined and/or after each biological trace, and in any situation where the expert considers that foreign DNA may have been transferred to the gloves.

Swabs, test tubes, pipettes, slides, etc. should be stored in sealed containers.

It is necessary to work with only one piece of physical evidence at a time to avoid cross-contamination, i.e. the transfer of genetic material from one object to another.

The examination of evidence and comparison material must be separated at least in time, and preferably in space. If it is separated in time, the examination of the comparative material in the same room as the examination of the forensic evidence is only possible after completion of the latter and after decontamination of the room.

The examination of physical evidence from victims must be separated in time from the examination of physical evidence secured from suspects, as long as the laboratory has some preliminary knowledge of the origin of the evidence.

1. Przygotowywanie i dekontaminacja miejsca badań

Przed rozpoczęciem badań dowodów rzeczowych bezwzględnie konieczne jest przeprowadzenie następujących czynności:

- Dekontaminacji pomieszczenia, w którym wykonywane są oględziny i pobierany jest materiał do badań genetycznych. Wszystkie powierzchnie robocze oraz narzędzia pomocnicze wielokrotnego użytku mające kontakt z materiałem badanym, muszą być poddane procesowi usunięcia DNA, tak przed jak i po badaniu tego materiału.
- Gdy jest to możliwe, należy stosować jednorazowe materiały zużywalne, w tym próbówki oraz końcówki do pipet. Zalecane jest korzystanie z jednorazowych końcówek z filtrami oraz używanie jednorazowych oraz wolnych od DNA i RNA oraz RNAz i DNAz drobnych narzędzi laboratoryjnych, takich jak np. skalpele czy pęsety.
- Dodatkowymi działaniami zapobiegającym kontaminacji niepożądanym DNA są: użycie odczynników chemicznych usuwających DNA (np. podchloryn sodu), zastosowanie ekspozycji promieniami UV (*UV Crosslinker, lamy UV w pomieszczeniach*).

Wszystkie czynności laboratoryjne w pomieszczeniach badawczych należy wykonywać w jednorazowej odzieży ochronnej (fartuchu, masce i czepku na głowę). Rękawice powinny być zmieniane bezwzględnie po każdym badanym dowodzie rzeczowym i/lub po każdym śladzie biologicznym oraz w każdej sytuacji kiedy biegły uzna, że mogło dojść do przeniesienia obcego DNA na rękawice.

Wymazówki, próbówki, pipety, szkiełka, itp. powinny być przechowywane w zamykanych pojemnikach.

Należy pracować na raz tylko z jednym dowodem rzeczowym, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego (cross-contamination), tj. przeniesienia materiału genetycznego z jednego obiektu na drugi.

Badania materiału dowodowego i porównawczego muszą być rozdzielone co najmniej w czasie, a najlepiej w przestrzeni. W przypadku rozdzielenia badań w czasie badanie materiału porównawczego w tym samym pomieszczeniu co badanie materiału dowodowego jest tylko możliwe po ukończeniu badania materiału dowodowego oraz po przeprowadzeniu dekontaminacji pomieszczenia.

Badanie dowodów rzeczowych pochodzących od ofiar musi być oddzielone w czasie od badania dowodów rzeczowych zabezpieczonych od osób podejrzanych, o ile laboratorium posiada wstępną wiedzę na temat pochodzenia tych dowodów.

2. Documentation of evidence / objects examined

Each piece of physical evidence delivered to the laboratory should be uniquely identified on the basis of the order, subjected to technical and procedural security checks, documented in the form of photographs, with preference given to documentation made in accordance with the principles of forensic photography, or descriptively. If photographic documentation is not possible, the description should include the characteristics of the object of examination.

The documentation must include all those biological traces that will be subjected in their entirety to further testing of a destructive nature.

Photographs should show a gauge with a clear scale that allows accurate estimation of the size of the object being documented and the angle at which the photograph was taken.

It is imperative during this stage as well as during the subsequent stages to protect the forensic evidence from contamination with foreign biological material.

The laboratory should keep a written procedure for handling the test material that includes ensuring maximum protection against contamination.

The procedure should also specify how to document the activities performed, the observations made and the results of the tests performed. Documentation should be preserved and stored in such a way that the course of research activities conducted can be traced and reconstructed at a later date. The documentation concerning the examination must identify the person who performed it, and include the serial numbers and expiration dates of the tests used.

The optimal solution is the use of Laboratory Information Management System (LIMS) electronically recording all research steps, adequately serviced and creating backups of the data entered, allowing the documentation to be recovered in case of failure.

3. Disclosure and collection of biological traces

In the process of disclosing traces of biological substances from test objects, a wide range of different non-specific and specific analytical methods can be used [11]. Preliminary inspection should be performed in the form of a visual examination using daylight and/or artificial light of such brightness that the details of the objects under inspection can be ob-

2. Dokumentacja materiału dowodowego / badanych obiektów

Każdy dowód rzeczowy dostarczony do laboratorium powinien zostać jednoznacznie zidentyfikowany w oparciu o zlecenie, poddany sprawdzeniu pod względem zabezpieczenia technicznego i procesowego, udokumentowany w postaci fotografii przy czym preferowana jest dokumentacja wykonana zgodnie z zasadami fotografii kryminalistycznej lub opisowo. W przypadku braku możliwości wykonania dokumentacji fotograficznej opis powinien zawierać cechy charakterystyczne dla danego obiektu badań.

Dokumentacja musi objąć wszystkie te ślady biologiczne, które poddane zostaną w całości dalszym badaniom o charakterze niszczącym.

Na fotografiach powinien być widoczny przymiar z wyraźną podziałką umożliwiającą dokładne oszacowanie wielkości dokumentowanego obiektu oraz kąta wykonania fotografii.

Podczas tego etapu jak i dalszych bezwzględnie konieczna jest ochrona materiału dowodowego przed zanieczyszczeniem obcym materiałem biologicznym.

Laboratorium powinno posiadać pisemną procedurę postępowania z badanym materiałem uwzględniającą zapewnienie maksymalnej ochrony przed kontaminacją.

Procedura powinna również określać sposób dokumentowania wykonanych czynności, dokonanych obserwacji i wyników wykonywanych testów. Dokumentacja powinna być zachowana i przechowywana w taki sposób, aby możliwe było późniejsze prześledzenie toku przeprowadzanych czynności badawczych oraz ich odtworzenie. Dokumentacja badania musi umożliwiać ustalenie osoby, która wykonała badanie, jak również zawierać numery seryjne i daty przydatności do użycia zastosowanych testów.

Optymalnym rozwiązaniem jest wykorzystanie do dokumentacji systemu LIMS (ang. *Laboratory Information Management System*) elektronicznie zapisującego wszystkie kroki badawcze, odpowiednio serwisowanego i tworzącego kopie zapasowe wprowadzanych danych, umożliwiające odtworzenie dokumentacji w razie awarii.

3. Ujawnianie i pobieranie śladów biologicznych

W procesie ujawniania śladów substancji biologicznych z obiektów badań może być zastosowana cała gama różnorodnych metod analitycznych, nieswoistych i swoistych [11]. Wstępne oględziny powinny być wykonane w postaci badania wizualnego z zastosowaniem światła dziennego i/lub sztucznego o jasności pozwalającej na zaobserwowanie szczegółów

served. During the inspection performed, if **biological material is detected, tests should be used to identify the type of substance disclosed on the examined object.**

For large, visible traces that resemble blood or semen in appearance, direct tests can be performed on their fragments to confirm the presence of these substances.

When the amount of available evidence in a potential trace is limited, preliminary non-destructive tests should be conducted in the first place.

Preliminary non-destructive testing with alternative light sources (ALS) includes testing with ultraviolet radiation (UV), blue light, or infrared radiation (IR) conducted using forensic light sources (FLS).

Saliva, urine and semen exhibit photoluminescence, hence the use of light of the appropriate wavelength to excite it is a frequently used preliminary method for disclosing these substances. The advantage of using FLS is primarily the fact that they do not destroy traces, and moreover, if the proper conditions for storing physical evidence are maintained, the fluorescence exhibited by biological material can be observed for many years [12].

Of the three aforementioned biological fluids, semen shows the most intense fluorescence, with a good visualization effect using an orange filter and a blue light source with a wavelength of 450 nm. Blood, unlike saliva, semen and urine, does not exhibit significant fluorescence, but instead displays very strong light absorption over a wide range of radiation from 300 to 900 nm, i.e. from ultraviolet to infrared light. In the case of disclosing blood, near-infrared is usually used, although increasing the contrast between blood and a heavily camouflaged substrate is also possible with light of different wavelengths.

When using alternative light sources, it is advisable to state in the examination report/opinion the type of equipment applied and the conditions used to disclose the biological material.

In view of its non-destructive nature and very high sensitivity, a commonly used preliminary test in forensic science to search for traces of blood on objects/physical evidence is the test with luminol or its derivatives. Oxidation of luminol in the presence of certain activators, such as heme, results in the appearance of characteristic chemiluminescence wherever blood or residues from removed (washed/wiped off) blood traces are present. This is related to the highest sensitivity among non-specific tests observed in research practice. However, this sensitivity is dependent on a large number of factors, ranging from the luminol reagent formula used, to the type of substrate on which the test traces are located [13].

poddawanych oględzinom przedmiotów. W trakcie wykonywanych oględzin, w razie wykrycia **materiału biologicznego należy zastosować testy umożliwiające zidentyfikowanie rodzaju substancji ujawnionej na badanym obiekcie.**

W przypadku dużych, widocznych śladów, przypominających wyglądem krew lub nasienie, można wykonać na ich fragmentach bezpośrednio testy potwierdzające obecność tych substancji.

W przypadku, gdy ilość dostępnego w potencjalnym śladzie materiału dowodowego jest ograniczona, w pierwszej kolejności należy przeprowadzić wstępne testy nieniszczące.

Do wstępnych testów nieniszczących z użyciem alternatywnych źródeł światła – ALS (ang. *alternative light source*) zaliczyć należy badanie z wykorzystaniem promieniowania ultrafioletowego – UV (ang. *ultraviolet radiation*), światła niebieskiego (ang. *blue light*), czy promieniowania podczerwonego – IR (ang. *infrared radiation*) przeprowadzone przy użyciu oświetlaczy kryminalistycznych – FLS (ang. *forensic light sources*).

Ślina, mocz i nasienie wykazują fotoluminescencję, stąd użycie światła o odpowiedniej długości fali do jej wzbudzenia jest często stosowaną metodą wstępną ujawniania tych substancji. Zaletą użycia FLS jest przede wszystkim fakt, iż nie niszczą one śladów, a ponadto, jeśli zachowane są odpowiednie warunki przechowywania dowodów rzeczowych, fluorescencja jaką wykazuje materiał biologiczny może być obserwowana przez wiele lat [12].

Z trzech wymienionych wyżej płynów biologicznych najintensywniejszą fluorescencję wykazuje nasienie, z dobrym efektem wizualizacji przy zastosowaniu filtra pomarańczowego i źródła światła niebieskiego o długości fali 450 nm. Krew w przeciwieństwie do śliny, nasienia i moczu nie wykazuje znaczącej fluorescencji, natomiast charakteryzuje się bardzo silną absorpcją światła w szerokim zakresie promieniowania od 300 do 900 nm, tj. od światła ultrafioletowego po podczerwień. W przypadku ujawniania krwi zazwyczaj używana jest bliska podczerwień, chociaż zwiększenie kontrastu pomiędzy krwią, a silnie maskującym podłożem możliwe jest również przy użyciu światła o różnych długościach fali.

Przy zastosowaniu alternatywnych źródeł światła wskazane jest podanie w sprawozdaniu/opinii z badań rodzaju użytego urządzenia oraz warunków zastosowanych do ujawniania materiału biologicznego.

Z uwagi na niedestrukcyjny charakter i bardzo wysoką czułość, powszechnie stosowanym w kryminalistyce testem wstępnym do poszukiwania śladów krwi na obiektach/dowodach rzeczowych jest test z luminolem lub jego pochodnymi. Utlenianie luminolu w obecności określonych aktywatorów, jak np. hemu, powoduje pojawienie się charakterystycznej chemilumine-

It should be emphasized that the test with luminol or its derivatives is highly non-specific. It can give positive results for metal oxides such as copper or iron in the presence of certain iron-metabolizing plants such as lichen, thyme or certain mosses. Chemiluminescence in the reaction with luminol is also observed for household detergents such as bleach or certain paints, and in the reaction with substances from certain crustaceans such as daphnia. However, the intensity and color of the chemiluminescence, as well as the reaction time for the aforementioned substances usually differs compared to the reaction with blood.

In addition to the very high sensitivity of detection with luminol, its widespread use for detecting the presence of blood, also directly at the crime scene, is linked to the possibility of performing non-destructive testing without adversely affecting the subsequent DNA analysis. Regrettably, application of this test has an adverse effect on the preservation of the shape of blood traces, which very often makes it impossible to determine the mechanism of their formation. Bearing in mind the adverse effects associated with the use of luminol, it should be used primarily in situations where there is a suspicion of invisible or faint traces of blood on the objects being inspected, and should be applied in small doses using a sprayer. Also, before using luminol, it is worth considering the use of near-infrared light to disclose blood, in spite of its significantly lower sensitivity compared to luminol.

In the case of detection of traces that are not visible to the unaided eye using FLS or luminol, it is advisable to document their location on the material evidence in the form of a photograph or, if there is no possibility of taking a photograph, a sketch.

After performing analyses with the use of non-destructive tests, tests requiring the collection of material contained in presumed biological traces for analysis, involving its utilization, should be performed next.

When preparing the report/opinion on the examination of biological traces, it should be ensured that the identification of the location from which each trace was taken is possible. When documenting a biological trace on physical evidence, the dimensions of the trace should be presented as precisely as possible.

When examining the presence of biological material, efforts should be made to detect all traces of a given type, documenting the topography of their distribution. Where there are multiple biological traces on a single piece of physical evidence, the expert should select those to be examined based on arrangements with the ordering party and knowledge of the event and their own experience.

scencji wszędzie tam, gdzie jest obecna krew lub pozostałości po usuwanych (zmywanych/zacieranych) śladach krwi. Ma to związek z największą wśród testów niespecyficzną obserwowaną w praktyce badawczej czułością tego testu. Czułość ta zależy jednak od bardzo wielu czynników, począwszy od zastosowanej formuły odczynnikowej testu z luminolem, a skończywszy na rodzaju podłoża, na którym znajdują się badane ślady [13].

Trzeba podkreślić, że test z luminolem lub jego pochodnymi jest wysoce niespecyficzny. Może dawać pozytywne wyniki dla tlenków metali, jak np. miedzi czy żelaza, w obecności pewnych roślin metabolizujących żelazo jak np. porostów, macierzanki czy niektórych mchów. Chemiluminescencję w reakcji z luminolem obserwuje się też dla detergentów używanych w gospodarstwie domowym, takich jak wybielacze czy niektóre farby, oraz w reakcji z substancjami pochodzącymi z niektórych skorupiaków np. rozwiłitek. Intensywność i kolor chemiluminescencji, a także czas reakcji dla wspomnianych wyżej substancji zwykle różni się jednak w porównaniu do reakcji z krwią.

Poza bardzo wysoką czułością detekcji z użyciem luminolu jego powszechne wykorzystanie do wykrywania obecności krwi, również bezpośrednio na miejscu przestępstwa, jest związane z możliwością wykonania nieniszczących badań, bez negatywnego wpływu na późniejszą analizę DNA. Niestety zastosowanie tego testu ma niekorzystny wpływ na zachowanie kształtu śladów krwawych, co bardzo często uniemożliwia określanie mechanizmu ich powstania. Mając na uwadze ten niekorzystny efekt związany z użyciem luminolu należy stosować go przede wszystkim w sytuacjach, gdy istnieje podejrzenie występowania na oglądanych przedmiotach niewidocznych bądź słabo widocznych śladów krwi, nanosząc go w niewielkich porcjach, przy pomocy rozpylacza. Warto również, przed użyciem luminolu, rozważyć zastosowanie światła z zakresu bliskiej podczerwieni do ujawniania krwi, pomimo znacznie niższej czułości tej metody w zestawieniu z luminolem.

W przypadku wykrycia śladów niewidocznych nieuzbrojonym okiem, z wykorzystaniem FLS czy też luminolu, wskazane jest dokumentowanie ich położenia na dowodzie rzeczowym w postaci fotografii lub, gdy nie ma jakiegokolwiek możliwości wykonania fotografii, szkicu.

Po wykonaniu analiz z użyciem testów nieniszczących/niedestrukcyjnych, w następnej kolejności powinny zostać wykonane testy wymagające pobrania do analizy materiału zawartego w domniemanych śladach biologicznych, wiążące się z jego zużyciem. Sporządzając sprawozdanie/opinię z badań śladów biologicznych należy upewnić się, że możliwa jest identyfikacja miejsc, z których pobrano poszczególne ślady.

Dokumentując ślad biologiczny na dowodzie rzeczowym należy przedstawić możliwie precyzyjnie jego rozmiary.

In the course of the disclosure, description and further analysis of biological material, the “jigsaw principle” applies, according to which each trace revealed and selected for examination (a single “jigsaw puzzle”) is subject to documentation and must absolutely find its reference in the final “picture of the whole”, i.e. in the results and in the conclusions of the examination report/opinion.

4. Securing biological material that remains after examinations

Any objects/physical evidence that remain after examinations should be returned to the ordering party. In the case of materials that must be collected in person or via special transport companies, the ordering party should be informed in writing of the storage period for such material and the location of storage.

If it is not possible to store the remaining test material on a long-term basis, the ordering party should be notified in writing of the time period and location of storage of the remaining test material.

If it is not possible to store the remaining test material on a long-term basis, the laboratory should make it possible to transfer such material to another facility for storage if the ordering party expresses such a wish. The ordering party should be informed in writing of this possibility.

Evidence stored in the laboratory, including DNA extracts, must not be destroyed before the expiry of the retention period adopted by laboratory procedures or agreed with the ordering party.

5. Detecting the presence of biological substances in traces from physical evidence/ test objects

5.1. Non-specific tests

Non-specific (preliminary, screening) tests for individual biological substances are mainly used as a preliminary method to identify potential biological traces, especially in situations where the traces are invisible or faintly visible (e.g. they are in the background color, on a camouflaging substrate) or where they have been subjected to a deletion process (e.g. washing,

Podczas badania obecności materiału biologicznego należy dążyć do wykrycia wszystkich śladów danego rodzaju, dokumentując topografię ich rozmieszczenia. W przypadku miejsc występowania wielu śladów biologicznych na jednym dowodzie rzeczowym biegły powinien wytypować te, które zostaną poddane badaniu w oparciu o ustalenia ze zleceniodawcą oraz wiedzę o zdarzeniu i swoje doświadczenie.

W trakcie ujawniania, opisywania i dalszych analiz materiału biologicznego obowiązuje „zasada puzzli”, zgodnie z którą każdy ujawniony i wytypowany do badań ślad (pojedynczy „puzzle”) podlega udokumentowaniu i musi bezwzględnie znaleźć swoje odniesienie w końcowym „obrazie całości”, tj. w wynikach i we wnioskach ze sprawozdania z badań/opinii.

4. Zabezpieczanie materiału biologicznego pozostałego po badaniach

Pozostałe po badaniach obiekty/dowody rzeczowe powinny zostać odesłane zleceniodawcy. W przypadku materiałów, które muszą zostać odebrane osobiście lub za pośrednictwem specjalnych firm przewozowych zleceniodawca powinien zostać poinformowany na piśmie o długości okresu przechowywania takiego materiału i miejscu jego przechowywania.

W przypadku braku możliwości długoterminowego przechowywania pozostałego po badaniach materiału, zleceniodawca powinien zostać powiadomiony o tym fakcie na piśmie, z podaniem długości czasu, przez jaki pozostały po badaniach materiał jest przechowywany i miejscu jego przechowywania.

W razie braku możliwości długoterminowego przechowywania materiału pozostałego po badaniach laboratorium powinno umożliwić przekazywanie takiego materiału do przechowywania w innej placówce, jeśli zleceniodawca wyrazi taką wolę. Zleceniodawca powinien zostać poinformowany pisemnie o takiej możliwości.

Przechowywane w laboratorium materiały dowodowe, w tym ekstrakty DNA nie mogą zostać zniszczone przed upływem przyjętego procedurami laboratoryjnymi lub uzgodnionego ze zleceniodawcą terminu ich przechowywania.

5. Wykrywanie obecności substancji biologicznych w śladach z dowodów rzeczowych/ obiektów badań

5.1. Testy nieswoiste

Testy nieswoiste (wstępne, przesiewowe) na obecność poszczególnych substancji biologicznych stosowane są głównie jako wstępna metoda identyfikacji potencjalnych śladów biologicznych, szczególnie w sytuacjach, kiedy ślady są niewidoczne lub słabo widoczne (np. są w kolorze tła, znajdują się na maskującym podłożu) lub gdy były poddawane procesowi usu-

wiping off). The information obtained with non-specific tests is also useful when specific tests give negative or doubtful results. These tests, compared to confirming (specific) tests are characterized by much higher sensitivity [13].

As a first-line non-specific test to detect the potential presence of saliva, semen, urine and other substances, ultraviolet light (UV) or infrared and ultraviolet (IR/UV) is often used (blood). As mentioned earlier, this type of testing should be preferred as preliminary because it does not cause material wear during its application.

For the initial disclosure of blood traces, also directly at the scene, rapid screening tests are commonly used in the form of ready-to-use single-strip test strips that give a colored reaction upon contact with traces containing hemoglobin.

The preliminary test commonly used to demonstrate the presence of semen is the seminal acid phosphatase (SAP) test, which is not a specific test for this substance. SAP test can give positive results in the presence of male urine, or female vaginal swab, periurethral gland secretions, including those of females, as well as for human milk or amniotic fluid, in the absence of semen, so it is considered a nonspecific test [42-45]. It should be noted that a negative test result does not necessarily mean the absence of seminal fluid in the tested trace, and a positive result does not conclusively indicate its presence.

Another immune reaction-based test used extensively in genetic and forensic studies to detect prostate-specific antigen (PSA), a glycoprotein enzyme produced by prostatic tubule epithelial cells and liquefying the ejaculate, cannot be considered fully specific for seminal fluid. In fact, PSA can be detected in other male body fluids such as urine (14-160 ng/ml) and blood (below 4 ng/ml). In addition, in prostate diseases, PSA levels in blood and urine are elevated to more than 200 ng/ml. PSA is also found in female vaginal secretions and human milk at concentrations as high as 350 ng/ml [42]. Significant PSA levels were also observed in the blood serum of pregnant women and women with androgen excess. PSA is also revealed in menstrual blood, where its level varies depending on the day of menstruation. Particularly high concentrations of PSA increasing with the time of gestation, up to 500 ng/ml, were observed in amniotic fluid and in aspirates from the mammary glands of women with breast cancer [43,44]. Low PSA levels, however, were reported in the urine of about 11% of women [45].

Screening tests that detect the presence of saliva usually use enzymatic reactions catalyzed by salivary amylase to produce a colored product resulting from the breakdown of the substrates used in the test. The most widely used tests of this type include reaction with Lugol's reagent on a starch substrate and Phadebas® commercial tests. The RSID SALIVA immunochro-

wania (np. spierania, zmywania). Uzyskane przy pomocy testów nieswoistych informacje są przydatne również wtedy, gdy testy swoiste dają wyniki negatywne lub wątpliwe. Testy te w porównaniu do testów potwierdzających (swoistych), charakteryzują się znacznie wyższą czułością [13].

Jako test nieswoisty pierwszego rzutu do ujawniania potencjalnej obecności śliny, nasienia, moczu i innych substancji często używane jest światło ultrafioletowe (UV) lub podczerwień i ultrafiolet (IR/UV) (krew). Jak wspomniano wcześniej tego rodzaju testy powinny być preferowane jako wstępne ponieważ nie powodują zużycia materiału podczas ich stosowania.

Do wstępnego ujawniania śladów krwi, również bezpośrednio na miejscu zdarzenia, powszechnie wykorzystywane są szybkie testy przesiewowe, w postaci gotowych do użycia jednowskaźnikowych pasków testowych, dających barwną reakcję przy kontakcie ze śladem zawierającym hemoglobinę.

Testem wstępnym stosowanym powszechnie w celu wykazania obecności nasienia jest test aktywności kwaśnej fosfatazy nasienia – SAP (ang. *seminal acid phosphatase*), który nie jest testem swoistym dla tej substancji. Test aktywności SAP może dawać pozytywne wyniki w obecności moczu mężczyzny, czy też wymazu z pochwy kobiety, wydzielin gruczołów okołocewkowych, w tym również żeńskich, a także dla ludzkiego mleka czy płynu owodniowego, przy braku obecności nasienia, zatem uznaje się go za test niespecyficzny [42-45]. Należy pamiętać, że ujemny wynik testu nie musi oznaczać braku płynu nasiennego w badanym śladzie, a pozytywny wynik nie wskazuje jednoznacznie na jego obecność.

Inny przeprowadzany w oparciu o reakcję immunologiczną, stosowany na szeroką skalę w badaniach genetyczno-sądowych test wykrywający swoisty antygen prostaty – PSA (*prostate-specific antigen*), tj. enzym glikoproteinowy wytwarzany przez komórki nabłonka kanalików gruczołu krokowego i upłynniający ejakulat, nie może być uznany za w pełni specyficzny dla płynu nasiennego. PSA może być bowiem wykryty w innych płynach ustrojowych mężczyzn, takich jak mocz (14-160 ng/ml) czy krew (poniżej 4 ng/ml). Ponadto w chorobach stercza stężenie PSA we krwi i w moczu ulega podwyższeniu do ponad 200 ng/ml. PSA występuje też w kobiecej wydzielinie pochwowej oraz w ludzkim mleku w stężeniu dochodzącym nawet do 350 ng/ml [42]. Znaczące stężenia PSA obserwowano również w surowicy krwi kobiet ciężarnych oraz kobiet z nadmiarem androgenów. PSA ujawnia się również we krwi menstruacyjnej, gdzie jego poziom jest zmienny w zależności od dnia miesiączki. Szczególnie wysokie stężenia PSA wzrastające wraz czasem gestacji, nawet do 500 ng/ml, obserwowano w płynie owodniowym oraz w aspiratach z sutków kobiet z rakiem piersi [43,44]. Niskie stężenia PSA raportowano natomiast w moczu około 11% kobiet [45].

matographic test is also included in the screening tests due to its demonstrated lack of high specificity to human saliva.

From a scientific point of view, the practice of using two or more screening techniques to disclose the presence of body fluids is acceptable provided that they are based on different reaction mechanisms (they differ in the markers tested) and are therefore subject to different limitations in terms of specificity [48].

This approach is appropriate if the use of a second non-specific method with high or very high sensitivity offers a higher chance of a positive result (if the substance in question is present in the trace) than the use of a specific method requiring a significant amount of forensic evidence.

The principle should be strictly observed that even a positive result obtained by two independent non-specific tests is not a reason to definitely confirm the presence of a substance in a biological trace.

5.2. Specific tests (confirming the presence of a biological substance)

There is a wide range of tests available based on different methods of identifying the presence of blood [11,12-17,19-21], semen [11,14,17,18,21-26], saliva [11,14,17-19,27,28] or reproductive tract secretions [25,29-33]. Many of them are available as commercial sets, some of which, however, such as tests for reproductive tract secretions are “in house” tests developed and used in trace identification laboratories. With the exception of tests for blood and semen, no tests have yet been developed to conclusively confirm the presence of other biological substances, including saliva or secretions from the reproductive tract, mainly because of the occurrence of cross-reactions with other body fluids. Assays based on mRNA, currently under development, appear to be very promising in terms of specificity, reference to which is made in the final section of this paper.

If the amount of material in the disclosed biological trace allows it, it is necessary to conduct assessments that give the possibility to conclusively identify the presence of a specific substance expected to be detected in the tested sample.

For the identification of semen, it is recommended to test for the presence of spermatozoa for each swab from the natural

Testy przesiewowe wykrywające obecność śliny wykorzystują zwykle reakcje enzymatyczne katalizowane przez amylazę ślinową w celu uzyskania barwnego produktu będącego wynikiem rozkładu substratów wykorzystanych w teście. Najpowszechniej stosowane testy tego typu obejmują reakcję z odczynnikiem Lugola na podłożu skrobiowym oraz komercyjne testy z rodziny Phadebas®. Do testów przesiewowych, ze względu na wykazany brak wysokiej specyficzności względem śliny człowieka, zalicza się również test immunochromatograficzny RSID SALIVA.

Z naukowego punktu widzenia dopuszczalna jest praktyka stosowania dwóch lub więcej technik przesiewowych do ujawniania obecności płynów ustrojowych, pod warunkiem, że oparte są one na różnych mechanizmach reakcji (różnią się badanymi markerami) i w związku z tym podlegają różnym ograniczeniom w zakresie specyficzności [48].

Takie podejście jest właściwe, jeżeli użycie drugiej metody nieswoistej o wysokiej lub bardzo wysokiej czułości daje wyższą szansę na uzyskanie pozytywnego wyniku (w razie obecności danej substancji w śladzie), niż zastosowanie metody swoistej wymagającej znacznej ilości materiału dowodowego.

Należy ściśle przestrzegać zasady, iż nawet pozytywny wynik uzyskany dwoma niezależnymi testami niespecyficznymi nie jest przyczynkiem do potwierdzenia w sposób pewny obecności danej substancji w śladzie biologicznym.

5.2. Testy swoiste (potwierdzające obecność substancji biologicznej)

Dostępna jest cała gama testów opartych na różnych metodach identyfikacji obecności krwi [11,12-17,19-21], nasienia [11,14,17,18,21-26], śliny [11,14,17-19,27,28] czy wydzieliny z dróg rodnych [25,29-33]. Wiele z nich dostępnych jest jako zestawy komercyjne jednak niektóre, jak np. testy na obecność wydzieliny z dróg rodnych, są testami typu „in house”, opracowanymi i używanymi w laboratoriach zajmujących się identyfikacją śladów. Za wyjątkiem testów na obecność krwi oraz nasienia, nie opracowano jak dotychczas testów jednoznacznie potwierdzających obecność innych substancji biologicznych, w tym śliny, czy wydzieliny z dróg rodnych, głównie z powodu występowania reakcji krzyżowych z innymi płynami organizmu. Bardzo obiecujące w aspekcie swoistości wydają się być testy oparte na badaniach mRNA, będące obecnie w fazie opracowywania, do czego nawiązano w końcowej części niniejszego opracowania.

Jeżeli tylko pozwala na to ilość materiału w ujawnionym śladzie biologicznym, należy przeprowadzić oznaczenia, które dają możliwość zidentyfikowania w sposób jednoznaczny obecności określonej substancji, której wykrycia spodziewamy się w badanej próbce.

body orifice. In the case of blood, it is recommended to perform a determination of the presence of human hemoglobin (alternatively its derivatives) or glycophorin A and beta spectrin of human erythrocytes.

The use of specific tests is of great significance in terms of using the results of biological traces for forensic purposes, since in some cases the unambiguous determination of the type of biological substance is of fundamental procedural importance. For example, in a case involving sexual violence, the DNA profile of the victim on the perpetrator's clothing will have a different evidentiary value if it is found to originate from the epidermis (a sweat and oil substance, a contact trace), and a completely different one if it can be shown that the source of the DNA is a secretion from the victim's reproductive tract. Establishing a DNA profile from a trace, in the absence of a clear determination of the type of substances present in the trace, can lead to a limitation of the evidentiary value of the results obtained. In an optimal situation, when an expert has a substantial amount of material to test, there is usually no problem in disclosing the full DNA profile and determining what type of biological substance is present in the trace, and thus what source of the DNA is revealed. In the situation of a limited amount of material (fingernail scrapings, contact traces and other micro-traces containing a negligible amount of biological material, often additionally degraded), when it is impossible to simultaneously fully analyze the determination of the type of substance nor the DNA profile, the expert is faced with a serious choice as to which analysis to abandon.

It would seem that in most cases it is more important, from an evidentiary standpoint, to determine the DNA profile than its source. However, determining only the DNA profile and abandoning the determination of the type of substance brings the possibility of later inquiries by law enforcement and the judiciary as to what substance was the source of the isolated DNA.

When a small amount of trace can lead to a situation where it is impossible to both determine the DNA profile and the type of biological substance in the investigated trace, it is advisable to agree with the ordering party which analysis the expert should perform first, and which should be abandoned, while informing about the consequences associated with this choice regarding the specifics of the case.

For specific identification of blood, methods that show the presence of heme, hemoglobin or its derivatives are used [11,13-15]. Blood confirmation analyses based on microcrystalline tests, such as Takayama's test for hemochromogen crystals, or microscopic identification of red blood cells, which have been known for years and described in textbooks, are becoming increasingly rare [11,14,15].

W celu identyfikacji nasienia zaleca się badanie obecności plemników w przypadku każdego wymazu z otworu naturalnego ciała. W przypadku krwi zalecane jest przeprowadzenie oznaczenia obecności hemoglobiny człowieka (ewentualnie jej pochodnych) lub glikoforyny A i beta spektryny erytrocytów człowieka.

Stosowanie testów swoistych jest bardzo istotne w aspekcie wykorzystania wyników badań śladów biologicznych dla celów sądowych, gdyż w niektórych sprawach jednoznaczne określenie rodzaju substancji biologicznej ma fundamentalne znaczenie procesowe. Przykładowo, w sprawie dotyczącej przemocy na tle seksualnym inną wartość dowodową będzie miał profil DNA ofiary na odzieży sprawcy, gdy okaże się, że pochodzi on z naskórka (substancja potowo-tłuszczowa, ślad kontaktowy), a zupełnie inną, gdy uda się wykazać, że źródłem DNA jest wydzielina z dróg rodnych ofiary. Ustalenie profilu DNA ze śladu, przy braku jednoznacznego określenia rodzaju substancji występujących w śladzie, może prowadzić do ograniczenia wartości dowodowej uzyskanych wyników. W optymalnej sytuacji, kiedy biegły dysponuje znaczną ilością materiału do badań, zazwyczaj nie ma problemu z ujawnieniem pełnego profilu DNA oraz ustaleniem, jaki jest rodzaj substancji biologicznej obecnej w śladzie, a tym samym jakie jest źródło ujawnionego DNA. W sytuacji ograniczonej ilości materiału (wyskrobiny z paznokci, ślady kontaktowe i inne mikroślady zawierające znikomą ilość materiału biologicznego, często dodatkowo zdegradowanego), kiedy niemożliwa jest jednoczesna pełna analiza określenia rodzaju substancji jak i profilu DNA, biegły staje przed poważnym wyborem, z której z analiz zrezygnować.

Wydaje się, że w większości spraw ważniejsze jest, z dowodowego punktu widzenia, określenie profilu DNA niż jego źródła. Jednak ustalenie wyłącznie profilu DNA i rezygnacja z określenia rodzaju substancji, niesie ze sobą możliwość późniejszych zapytań ze strony organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości, jaka substancja była źródłem wyizolowanego DNA.

Kiedy niewielka ilość śladu może prowadzić do sytuacji, gdy niemożliwe jest zarówno ustalenie profilu DNA jak i określenie rodzaju substancji biologicznej w badanym śladzie, zaleca się uzgodnienie ze zleceniodawcą, którą analizę biegły winien w pierwszej kolejności wykonać, a z której zrezygnować, informując jednocześnie o konsekwencjach związanych z tym wyborem, przy uwzględnieniu specyfiki sprawy.

W przypadku swoistej identyfikacji krwi stosowane są metody wykazujące obecność hemu, hemoglobiny lub jej pochodnych [11,13-15]. Coraz rzadziej przeprowadzane są znane od lat i opisywane w podręcznikach analizy potwierdzające obecność krwi oparte na badaniach mikrokrystalicznych, jak np. test Takayamy na obecność kryształów hemochromogenu, czy też mikroskopowa identyfikacja krwinek czerwonych [11,14,15].

Currently, the most commonly performed specific tests for human blood are immunochromatographic tests based on the use of highly specific monoclonal antibodies against human hemoglobin type A, as well as antibodies against glycophorin A or beta spectrin, which are transmembrane proteins of erythrocytes [5,6,14-16]. These tests are considered specific, although it should be taken into account that inhibition of glycophorin A expression on erythrocytes occurs in acute myeloid leukemia.

A number of methods have been described to specifically demonstrate the presence of heme, hemoglobin or its derivatives, based on the study of light absorption spectra. Spectral methods (spectrophotometric), with the exception of microspectroscopic and microcrystal methods, are characterized by moderate sensitivity compared to immunochromatographic methods and are therefore used less frequently than the latter [20,21].

It is left to the discretion of the expert to choose which method should be used to specifically identify the presence of blood, depending on the size of the trace and the procedures used in the laboratory.

It is recommended that a negative blood result should always be considered in terms of a false negative result and verified by a more sensitive specific method or by several non-specific methods.

Microscopic identification of spermatozoa is the only scientifically accepted method for confident identification of semen [11,22,34-35]. For this reason, it is recommended, whenever possible, and especially in the case of swabs from the natural orifices of the body, to test for the presence of semen by microscopic examination of preparations stained by the classic method using hematoxylin and eosin (HE), by the method known as Christmas Tree Stain using PIC/NF stains (Picroindigocarmine/nuclear Fast Red), or other. In order to increase the method's detectability, the heads of spermatozoa can be revealed using fluorescently labeled monoclonal antibodies, and the process can also be automated [37].

Microscopic examination for the presence of spermatozoa in potential semen traces should be a priority, as it offers the highest chance of confirming the presence of semen with certainty [38].

Detection of at least one whole spermatozoon or only the sperm head is sufficient to establish the presence of semen. The result of the test should account for the number of spermatozoa shown in the slides on a scale from 0, indicating a complete absence of spermatozoa, through 1+, 2+, 3+, up to 4+, indicating many spermatozoa visible in all microscopic fields viewed.

Obecnie najczęściej wykonywanymi testami swoistymi na obecność krwi człowieka są testy immunochromatograficzne oparte na zastosowaniu wysoce specyficznych monoklonalnych przeciwciał przeciwko hemoglobinie typu A człowieka, jak również przeciwciał przeciwko glikoforynie A czy beta spektrynie, stanowiących białka transbłonowe erytrocytów [5,6,14-16]. Testy te uważane są za specyficzne, choć należy wziąć pod uwagę, iż zahamowanie ekspresji glikoforyny A na erytrocytach ma miejsce w przypadku ostrej białaczki szpikowej.

Opisano wiele metod swoiście wykazujących obecność hemu, hemoglobiny czy też jej pochodnych, opartych na badaniu widm absorpcji światła. Metody widmowe (spektrofotometryczne), za wyjątkiem metod mikrospektroskopowych oraz mikrokryształicznych, charakteryzują się umiarkowaną czułością w porównaniu do metod immunochromatograficznych i dlatego stosowane są rzadziej niż te ostatnie [20,21].

Wybór metody, jaka powinna być zastosowana do swoistej identyfikacji obecności krwi pozostawia się do decyzji biegłego w zależności od wielkości śladu oraz procedur stosowanych w laboratorium.

Zaleca się każdorazowo rozpatrywanie negatywnego wyniku na obecność krwi w aspekcie wyniku fałszywie negatywnego i weryfikowanie go czulszą metodą swoistą lub kilkoma metodami nieswoistymi.

Identyfikacja mikroskopowa plemników jest jedyną naukowo zaakceptowaną metodą pewnej identyfikacji nasienia [11,22,34-35]. Z tego powodu zaleca się, zawsze, gdy tylko jest to możliwe, a przede wszystkim w przypadku wymazów z otworów naturalnych ciała, przeprowadzanie testu na obecność nasienia poprzez badanie mikroskopowe preparatów wybarwianych klasyczną metodą z wykorzystaniem barwników: hematoxyliny i eozyny – HE (*Haematoxylin Eosin*), metodą znaną jako Christmas Tree Stain z wykorzystaniem barwników PIC/NF (*Picroindigocarmine/nuclear Fast Red*) lub inną. W celu zwiększenia wykrywalności metody można ujawniać główki plemników z użyciem monoklonalnych przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie, jak również zautomatyzować proces [37].

Badanie mikroskopowe obecności plemników w potencjalnych śladach nasienia powinno być priorytetem, ponieważ daje najwyższą szansę pewnego potwierdzenia obecności nasienia [38].

Wykazanie przynajmniej jednego całego plemnika lub tylko główki plemnika jest wystarczające dla stwierdzenia obecności nasienia. Wynik badania powinien uwzględniać liczbę plemników wykazanych w preparatach w skali od 0, oznaczającego zupełny brak plemników, poprzez 1+, 2+, 3+, aż do 4+, oznaczającego wiele plemników widocznych we wszystkich oglądanych polach mikroskopowych.

In the case of semen, it is acceptable to abandon microscopic testing in favor of testing for the presence of seminal fluid markers. Obtaining positive results in at least two preliminary tests such as PSA/Sg/SAP and disclosing, after preferential lysis, the presence of a male DNA profile in the sperm fraction together provide a basis for inferring the possibility of the presence of semen in the examined trace.

It should be emphasized that the immunochromatographic test for the presence of semenogelin (Sg), i.e. a protein, which forms the plasma of human sperm, surrounding ejaculated spermatozoa and inhibiting their condensation, performed in research practice, can probably be considered a specific test. This is supported by the test manufacturer's data, according to which the presence of semenogelin is characteristic only for human seminal fluid and does not give cross-reactions with other body fluids in men and women or with semen of other mammals. However, it should be taken into account that the expression of Sg I and Sg II has been observed in a wide variety of human tissues, not only genital [39]. False-positive reactions when identifying semenogelin by immunochromatography have been reported in the urine of some women taking oral contraceptives [40], and even when using saline (0.9 % NaCl) for making swabs [41, part of co-authors' observations].

To date, there are no fully specific tests for disclosing the presence of human saliva. Enzyme tests for salivary alpha-amylase activity are only preliminary tests due to the presence of this enzyme in other biological fluids such as sweat, semen, urine. Claims by some manufacturers regarding the very high specificity of immunochromatographic tests in this regard contradict the results of studies that verify the specificity of these tests in practice [28].

Relatively recently, very promising methods based on profiling fluid and tissue-specific mRNA and miRNA molecules, or examining the methylation level of DNA sequences, have come into use [5-7]. It seems that one can successfully speak of tissue specificity with respect to numerous biomarkers already described [18,20,29,30 46,47].

For situations where it is necessary to choose which analysis in the disclosed trace should be performed, the expert should consider conducting a simultaneous RNA and DNA analysis, giving the opportunity to determine both the type of biological substance (RNA analysis) and DNA profile (STR analysis) in the investigated trace. By using a PCR method that amplifies both DNA and cDNA (complementary DNA) in both analyses, the sensitivity of the method increases radically. This results in a much higher chance of obtaining results in both analyses performed simultaneously than in each performed separately. Simultaneous RNA/DNA analyses are the subject of extensive international work by teams within the Collaborative EDNAP Exercises demonstrating the possibilities and advantages of this type of analysis [18,29]. In the absence of the possibility of

W przypadku nasienia dopuszcza się rezygnację z badań mikroskopowych na rzecz badań obecności markerów płynu nasiennego. Uzyskanie pozytywnych wyników w co najmniej dwóch testach wstępnych, jak np. PSA/Sg/SAP oraz ujawnienie po lizie preferencyjnej obecności męskiego profilu DNA we frakcji plemnikowej dają razem podstawę do wnioskowania o możliwości występowania nasienia w badanym śladzie.

Należy podkreślić, iż wykonywany w praktyce badawczej test immunochromatograficzny na obecność semenogeliny – Sg (*Semenogelin*), tj. białka, tworzącego plazmę nasienia człowieka, otaczającą ejakulowane plemniki i hamującą ich kondensację, można prawdopodobnie uznać za test specyficzny. Ma to oparcie w danych producenta testu, według których obecność semenogeliny jest charakterystyczna tylko dla płynu nasiennego człowieka i nie daje reakcji krzyżowych z innymi płynami ustrojowymi u mężczyzn i kobiet lub z nasieniem innych ssaków. Należy jednak wziąć pod uwagę, że ekspresję Sg I i Sg II obserwowano w bardzo wielu różnych tkankach człowieka, nie tylko genitalnych [39]. Fałszywie pozytywne reakcje przy identyfikacji semenogeliny metodą immunochromatograficzną odnotowano w moczu niektórych kobiet zażywających doustne środki antykoncepcyjne [40], a nawet w przypadku użycia soli fizjologicznej (0,9 % NaCl) do sporządzania wymazów [41, obserwacje własne części współautorów].

Nie ma, jak dotychczas, w pełni swoistych testów do ujawniania obecności śliny człowieka. Testy enzymatyczne na aktywność alfa-amylazy ślinowej są jedynie testami wstępnymi ze względu na obecność tego enzymu w innych płynach biologicznych, jak np. pot, nasienie, mocz. Zapewnienia niektórych producentów o bardzo wysokiej specyficzności testów immunochromatograficznych w tym zakresie stoją w sprzeczności z wynikami badań weryfikujących w praktyce swoistość tych testów [28].

Stosunkowo niedawno weszły do użycia bardzo obiecujące metody oparte na profilowaniu swoistych dla określonych płynów i tkanek cząsteczek mRNA i miRNA, czy też badaniu poziomu metylacji sekwencji DNA [5-7]. Wydaje się, że można z powodzeniem mówić o swoistości tkankowej w odniesieniu do wielu opisanych już biomarkerów [18,20,29,30 46,47].

W sytuacjach konieczności wyboru, która z analiz w ujawnionym śladzie powinna być przeprowadzona, biegły powinien rozważyć wykonanie jednoczesnej analizy RNA i DNA, dającej możliwość określenia zarówno rodzaju substancji biologicznej (analiza RNA) jak i profilu DNA (analiza STR) w badanym śladzie. Dzięki zastosowaniu w obu analizach metody PCR amplifikującej zarówno DNA, jak i cDNA (ang. *complementary DNA*), radykalnie wzrasta czułość metody. Skutkuje to znacznie wyższą szansą na uzyskanie rezultatów w obu analizach przeprowadzanych równocześnie, niż w każdej z nich przeprowadzanych oddzielnie. Równoczesne badania RNA/DNA są przedmiotem szeroko zakrojonych międzynarodowych prac zespołów

conducting simultaneous RNA/DNA analyses by the laboratory, the expert should consult with the ordering party having a full picture and scope of knowledge regarding the case in question, on the decision on which analysis should be performed.

Identification of the type of biological substance present on the physical evidence/object should be conducted based on at least one specific test or at least two non-specific tests, if such tests are available for the type of trace.

A different procedure may apply to contact (touch) traces, which, although virtually always present on physical evidence, are not usually discernible to the unaided eye. They are formed at the point of contact of the epidermis containing sweat and oily substance (sweat) and/or exfoliated cells of a person with a specific object, such as from the contact of a hand with a glass/bottle, or from the wearing/touching of clothing/objects by a person. In a number of cases, DNA is transferred as a result of secondary transfer from a specific object/person on which the person left it to another object/person with whom the person had no previous contact [8,9].

Contact traces contain insignificant amounts of biological material, which may be single cells or free extracellular DNA – cfDNA (cell free DNA), and for this reason should be subjected directly to genetic analysis without tests for the presence of biological substances.

The most commonly used methods of collecting contact traces are swabbing them with moist or dry swabs (preferably flocked) the use of special stripping tapes, using an electrostatic method, or cutting/collecting these traces along with the substrate [50].

Tests for the presence of glycogen-containing vaginal squamous epithelium (staining with Lugol's iodine), microscopic identification of endometrial cells, or identification of lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes type 4 and 5, are not currently considered specific for vaginal cells [51,52].

For preliminary identification of urine traces, a test with alternative light sources (ALS/FLS, so-called specialized light), including ultraviolet (UV) radiation, should be used. However, positive results by this method may not be obtained in many situations, such as with diluted urine traces. Additional preliminary tests for urea and creatinine may be helpful in this case, although these two compounds are also found in many other biological substances such as sweat, blood, saliva and semen.

The test for uromodulin, or Tamm-Horsfall protein (THP), synthesized in the kidneys and excreted in the urine, although specific for this excretion, is not specific for human urine and gives cross-reactions with the urine of different animal spe-

w obrebie grupy EDNAP (*Collaborative EDNAP Exercises*), pokazujących możliwości i zalety tego typu analiz [18,29]. W przypadku braku możliwości przeprowadzenia równoczesnych badań RNA/DNA przez laboratorium decyzję o tym, która analiza powinna być wykonana, biegły winien skonsultować z organem zlecającym, posiadającym pełny obraz i zakres wiedzy dotyczące przedmiotowej sprawy.

Identyfikacja rodzaju substancji biologicznej obecnej na dowodzie rzeczowym/obiekcie powinna być przeprowadzona, w oparciu o co najmniej jeden test swoisty lub co najmniej dwa testy nieswoiste, jeśli takie testy są dostępne dla danego rodzaju śladu.

Odmienne postępowanie może dotyczyć śladów kontaktowych (dotykowych), które choć praktycznie zawsze są obecne na dowodach rzeczowych, nie są zwykle dostrzegalne nieuzbrojonym okiem. Powstają one w miejscu zetknięcia (kontaktu) naskórka zawierającego substancję potowo-tłuszczową (pot) i/lub złuszczone komórki danej osoby z określonym obiektem, jak np. w wyniku zetknięcia dłoni ze szklanką/butelką, czy też na skutek noszenia/dotykania odzieży/obiektów przez daną osobę. W wielu przypadkach DNA przeniesiony zostaje w wyniku transferu wtórnego z określonego obiektu/osoby, na których zostawiła go dana osoba, na drugi obiekt/osobę, z którymi dana osoba nie miała wcześniej kontaktu [8,9].

Ślady kontaktowe zawierają nieznaczne ilości materiału biologicznego, który mogą stanowić pojedyncze komórki lub wolny pozakomórkowy DNA – cfDNA (cell free DNA) i z tego powodu należy poddawać je bezpośrednio analizie genetycznej z pominięciem testów na obecność substancji biologicznych.

Najczęściej stosowanymi metodami pobierania śladów kontaktowych jest ich wymazywanie wilgotnymi lub suchymi wymazówkami (najlepiej flokowanymi) zastosowanie specjalnych taśm zdejmujących ślad, użycie metody elektrostatycznej, czy też wycięcie/pobranie tych śladów wraz z podłożem [50].

Testy na obecność nabłonka płaskiego pochwy zawierającego glikogen (barwienie płynem Lugola), mikroskopowa identyfikacja komórek endometrium czy też identyfikacja izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej – LDH typu 4 i 5, nie są uważane aktualnie za specyficzne dla komórek pochwy [51,52].

Do wstępnej identyfikacji śladów moczu powinno się stosować test z użyciem alternatywnych źródeł światła (ALS/FLS, tzw. światło specjalistyczne), w tym promieniowania nadfioletowego (UV). Pozytywnych wyników przy zastosowaniu tej metody można jednak nie uzyskać w wielu sytuacjach, jak choćby w przypadku rozcieńczonych śladów moczu. Pomocne w tym przypadku mogą być dodatkowe testy wstępne na obecność mocznika i kreatyniny, choć te dwa związki występują również w wielu innych substancjach biologicznych, jak np. pot, krew, ślina czy nasienie.

cies such as dogs. [35]. The concentration of this protein in the urine of various individuals differs even several times, and its presence can furthermore be detected in human semen and even ketchup [19]. Another important limitation is that the blood co-occurring in the traces may inhibit the onset of an immune response and prevent the detection of the presence of urine in the trace.

Far-reaching caution is recommended in evaluating the results of tests conducted by means of immunochemical tests, especially when the result obtained is faintly positive.

Given the potential presence in extracts from biological traces on various substrates of many different inhibitors that give false-negative results, or substances that produce artifacts in the form of false-positive results, it is essential to verify the correct performance of the method used before conducting any of the tests. It should be tested on positive and negative controls. An example of a positive control is blood poured on Whatman paper, while a negative control is pure Whatman paper or water. The same is true for semen and other biological substances. In the case of immunochromatographic tests, it is sufficient to control one test from the batch. The results of these tests should be documented. In addition, the laboratory should determine how often such checks should be performed (before each analysis, once a week, etc.) [54].

Nevertheless, all tests used to identify the type of biological traces, like any other test method used in the laboratory, should undergo a process of intra-laboratory validation in accordance with the requirements applicable in this regard [1,55,56].

In the case of other biological substances, as well as azoospermic semen, after screening methods have been applied, the available methods that give the highest probability of specific identification should be used.

Preliminary classification of the species origin of hair should be performed by microscopic examination. The use of microscopic examination is also recommended for evaluation for further investigation of nuclear DNA (nDNA) and/or mitochondrial DNA (mtDNA).

Microscopic examinations of hair morphology are preliminary (screening) examinations and in no case constitute the basis for a definite opinion as to the origin of hair from a particular person.

For determining the species affiliation of traces (bones, hair, soft tissue fragments and other material of unknown species origin), sequencing of the cytochrome b gene of mitochondrial DNA is recommended [57]. In some cases which are doubtful or difficult to interpret, it is advisable to add mitochondrial DNA to cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene sequence profiling [58].

Test na obecność uromoduliny czyli białka Tamma-Horsfalla – THP (*Tamm-Horsfall protein*), syntetyzowanego w nerkach i wydalanego do moczu, choć charakterystyczny dla tej wydalin, nie jest swoisty dla moczu człowieka i daje krzyżowe reakcje z moczem różnych gatunków zwierząt, jak np. psów [35]. Stężenie tego białka w moczu różnych osób różni się nawet kilkukrotnie, a jego obecność można ponadto wykryć w nasieniu człowieka, a nawet w ketchupie [19]. Istotnym ograniczeniem jest też fakt, iż współwystępująca w śladach krew może hamować wystąpienie reakcji immunologicznej i uniemożliwić wykrycie obecności moczu w śladzie.

Zaleca się daleko idącą ostrożność w ocenie wyników badań prowadzonych testami immunochemicznymi, w szczególności wtedy, gdy uzyskany wynik jest słabo pozytywny.

Zważywszy na potencjalną obecność w ekstraktach ze śladów biologicznych na różnych podłożach wielu różnych inhibitorów dających wyniki fałszywie negatywne, czy substancji powodujących powstanie artefaktów w postaci wyników fałszywie pozytywnych, przed wykonaniem jakiegokolwiek z testów konieczne jest sprawdzenie prawidłowego działania stosowanej metody. Powinna być ona przetestowana na pozytywnych i negatywnych kontrolach. Przykładem kontroli pozytywnej jest np. krew wylana na bibule Whatman'a, natomiast kontroli negatywnej czysta bibuła Whatman'a lub woda, analogicznie dla nasienia lub innych substancji biologicznych. W przypadku testów immunochromatograficznych wystarcza skontrolowanie jednego testu z serii. Wyniki tych testów należy udokumentować. Laboratorium powinno ponadto określić, jak często tego typu kontrole powinny być wykonywane (przed każdą analizą, raz w tygodniu, itp.) [54].

Niezależnie od tego, wszystkie testy wykorzystywane do identyfikacji rodzaju śladów biologicznych, podobnie jak każda inna metoda badawcza zastosowana w laboratorium, powinny zostać poddane procesowi walidacji wewnątrzlaboratoryjnej zgodnie z obowiązującymi w tym zakresie wymaganiami [1,55,56].

W przypadku innych substancji biologicznych, a także nasienia azoospermicznego, po zastosowaniu metod przesiewowych, należy zastosować dostępne metody dające najwyższe prawdopodobieństwo swoistej identyfikacji.

Wstępna klasyfikacja gatunkowego pochodzenia włosów powinna odbyć się drogą badania mikroskopowego. Zaleca się również wykorzystanie badania mikroskopowego do oceny w kierunku dalszych badań w zakresie jądrowego DNA – nDNA (ang. *nuclear DNA*) i/lub mitochondrialnego DNA – mtDNA (ang. *mitochondrial DNA*).

Badania mikroskopowe morfologii włosa są badaniami wstępnymi (przesiewowymi) i w żadnym przypadku nie stanowią podstawy do jednoznacznego opiniowania pod kątem pochodzenia włosów od konkretnej osoby.

Do ustalania przynależności gatunkowej śladów (kości, włosów, fragmentów tkanek miękkich i innego materiału o nieznanym pochodzeniu gatunkowym) zaleca się sekwencjonowanie genu cytochromu b mitochondrialnego DNA [57]. W niektórych wątpliwych lub trudnych do interpretacji przypadkach zaleca się dodanie do profilowania sekwencji genu oksydazy cytochromowej I – COI – (cytochrome c oxidase subunit 1) mitochondrialnego DNA [58].

6. Reporting and interpretation of biological substance detection

From the biological traces examination report/opinion, it should be clear which traces were subjected to testing and whether the presence of a specific biological substance was identified with certainty, or if the tests performed prevented such a conclusion.

Information on the type of tests performed should appear in the report/opinion in each case, so that it is clear by what techniques and methods the reported results were obtained and/or an opinion was formulated for a particular trace.

The categorical determination of the presence of a specific biological substance is determined by the specificity of the test used. In the case of a certain (unequivocal) detection of a specific biological substance, the report should contain categorical statements such as “Spermatozoa, and thus semen was detected in the reproductive tract swab,” or “Hemoglobin/hemoglobin derivative was detected in the substance found on the shirt, indicating the presence of blood.”

In the case of an inconclusive indication of a specific biological substance based on preliminary tests, the report or opinion should state the possible presence of a specific biological substance, rather than unequivocally confirm its presence.

For example, a correctly formulated statement/conclusion would be “The demonstration of SAP activity in the trace may indicate the presence of seminal fluid,” or “The presence of saliva cannot be excluded in the substance found on the shirt, as high alpha-amylase activity was detected in it.”

When reporting the results of semen tests, it is important to distinguish between the finding of whole semen, which contains spermatozoa, and the presence of seminal fluid, which does not necessarily contain spermatozoa, such as in azoospermia.

The test results should be reported according to the following scheme, depending on the assay results: “Seminal fluid/seminal fluid markers were found in the reproductive tract swab and no spermatozoa were found,” or “Spermatozoa were found in the reproductive tract swab and thus whole semen.”

6. Raportowanie i interpretacja detekcji substancji biologicznych

Ze sprawozdania/opinii z badań śladów biologicznych powinno jednoznacznie wynikać, które ślady poddano badaniu oraz czy zidentyfikowano w sposób pewny obecność określonej substancji biologicznej, czy też przeprowadzone testy nie pozwoliły na takie wnioskowanie.

Informacja o rodzaju wykonanych testów powinna się każdorazowo znaleźć się w sprawozdaniu/opinii, tak aby było jasne, przy użyciu jakich technik i metod uzyskano raportowane wyniki i/lub sformułowano opinię w odniesieniu do konkretnego śladu.

Kategoryczność w zakresie stwierdzenia obecności określonej substancji biologicznej jest uwarunkowana swoistością użytego testu. W przypadku pewnego (jednoznacznego) stwierdzenia określonej substancji biologicznej raport powinien zawierać kategoryczne stwierdzenia typu: „W wymazie z dróg rodnych stwierdzono obecność plemników, a tym samym nasienia”, czy też „W substancji znajdującej się na koszuli stwierdzono obecność hemoglobiny / pochodnej hemoglobiny, co wskazuje na obecność krwi”.

W przypadku niejednoznacznego wskazania określonej substancji biologicznej w oparciu o testy wstępne, sprawozdanie lub opinia powinny zawierać stwierdzenie o możliwej obecności określonej substancji biologicznej, a nie jednoznacznie potwierdzać jej obecność.

Przykładowo prawidłowo sformułowane stwierdzenie/wnioskowanie brzmi: „Wykazanie aktywności SAP w śladzie może wskazywać na obecność płynu nasiennego”, czy też „W substancji znajdującej się na koszuli nie można wykluczyć obecności śliny, gdyż stwierdzono w niej wysoką aktywność alfa-amylazy”.

Przy podawaniu wyników testów na obecność nasienia należy rozróżnić stwierdzenie obecności pełnego nasienia, w którym znajdują się plemniki, od obecności płynu nasiennego, niekoniecznie zawierającego plemniki, jak np. przy azoospermii.

In the event that spermatozoa are not detected in microscopic preparations, or spermatozoa testing is not performed, obtaining independently of each other two positive results for Sg/PSA/SAP preliminary tests and the finding of a male DNA profile in the fraction of cells resistant to digestion after preferential lysis, entitles one to conclude/formulate an opinion that “the results indicate the presence of seminal fluid and the possibility of the presence of spermatozoa” in the tested samples/traces.

6.1. Non-specific tests

If testing for the presence of biological substances with non-specific tests, the result should be reported in three possible ways:

I. A positive result may indicate the presence/does not allow the exclusion of the presence of a specific substance;

II. A negative result does not allow the determination of the presence of a specific substance;

An ambiguous (doubtful, inconclusive) result does not allow the conclusion as to the presence of a particular substance. The reason for a positive/non-excluding result for the presence of a particular substance can be the presence of that substance, but also the presence of other substances that give similar/cross-reactions to it.

The reason for a negative test result for a particular substance may be the absence of that substance, but also insufficient quantity or quality of that substance.

An ambiguous result in a test for the presence of a specific biological substance based on a non-specific test should be reported whenever the test results cannot be interpreted with confidence, regardless of the reason for this, such as the lack of a proper reading of the control assay or a faintly visible stripe.

In a situation where combined results obtained for several tests are reported, for example, for a positive non-specific test result and a negative specific test result, this discrepancy of results should be reported in the report/opinion. The laboratory should have a formalized (written in the procedures) way of formulating conclusions drawn based on the divergent results of different types of tests, taking into account the fact that there is a discrepancy.

W zależności od wyników oznaczeń rezultaty badań należy raportować zgodnie z następującym schematem: „W wymazie z dróg rodnych stwierdzono obecność płynu nasiennego/markerów płynu nasiennego oraz nie stwierdzono obecności plemników”, bądź „W wymazie z dróg rodnych stwierdzono obecność plemników, a tym samym pełnego nasienia”.

W przypadku nie stwierdzenia obecności plemników w preparatach mikroskopowych lub też odstąpienia od badań na obecność plemników, uzyskanie niezależnie od siebie dwóch dodatnich wyników w zakresie testów wstępnych na obecność Sg/PSA/SAP oraz stwierdzenie obecności męskiego profilu DNA we frakcji komórek opornych na trawienie po przeprowadzeniu lizy preferencyjnej, uprawnia do wnioskowania/sformułowania opinii, że „wyniki wskazują na obecność płynu nasiennego oraz możliwość obecności plemników” w badanych próbach/śladach.

6.1. Testy nieswoiste

W przypadku badania obecności substancji biologicznych **testami nieswoistymi** należy raportować wynik na trzy możliwe sposoby:

I. Wynik pozytywny (dodatni) może wskazywać na obecność/nie pozwala na wykluczenie obecności określonej substancji;

II. Wynik negatywny (ujemny) nie pozwala na stwierdzenie obecności określonej substancji.

Wynik niejednoznaczny (wątpliwy, nierozstrzygający) nie pozwala na wnioskowanie, co do obecności określonej substancji.

Przyczyną wyniku pozytywnego/niewykluczającego obecności określonej substancji może być obecność tej substancji, ale również obecność innych substancji, dających w odniesieniu do niej zbliżone/krzyżowe reakcje.

Przyczyną negatywnego wyniku testu na obecność określonej substancji może być brak tej substancji, ale również niewystarczająca jej ilość lub jakość.

Niejednoznaczny wynik w przypadku badania obecności określonej substancji biologicznej w oparciu o test nieswoisty należy zaraportować zawsze, gdy nie można pewnie zinterpretować wyników testu, niezależnie od przyczyny tego stanu rzeczy, jak np. braku właściwego odczytu oznaczenia kontrolnego, czy słabo widocznego prążka.

W sytuacji, w której raportuje się wyniki łączne, uzyskane dla kilku testów, na przykład dla pozytywnego wyniku testu nieswoistego i negatywnego wyniku testu swoistego należy tę niezgodność wyników zaraportować w sprawozdaniu/opinii. Laboratorium powinno posiadać sformalizowany (zapisany w procedurach) sposób formułowania wniosków wyciąganych w oparciu o rozbieżne wyniki poszczególnych typów testów, uwzględniający fakt zaistnienia rozbieżności.

When the non-specific test result is positive and there is no material for further specific tests, this should be indicated in the report/opinion, such as the following: "Preliminary tests indicate the possible presence of blood/semen. Further confirming tests were not conducted due to the need to preserve the remaining sample/trace for DNA testing."

A positive non-specific test result for biological fluids and substances for which there are no specific tests should be concluded with the following sample statement: "A positive test result for substance X does not allow the exclusion of its presence (indicates its potential presence). Due to the lack of specific tests, it is not possible to confirm the presence of this substance in the tested trace/material".

In justified cases, it is permissible to refrain from conducting specific tests when the methods used are so sensitive that a negative result practically excludes the presence of the substance in question. For example, a negative test result with luminol entitles one to waive further blood identification with a specific test.

6.2. Specific tests confirming the presence of a biological substance

In the case of a positive result of a specific test confirming the presence of hemoglobin or glycophorin A or human beta spectrin, or the expert's observation of the presence of even one spermatozoon/sperm head in the trace, it is reasonable to submit one of the following conclusions in the test report:

I. Confirmation of the presence of human hemoglobin by a specific test gives grounds for the presence of human blood in the biological trace under investigation;

II. Confirmation of the presence of spermatozoa gives the basis for determining the presence of whole semen in the biological trace under examination.

In the case of a negative result of a specific test for the presence of human hemoglobin or glycophorin A (beta spectrin), or the failure to detect even one spermatozoon in the sample/trace, there are grounds for submitting one of the following conclusions in the test report:

I. Failure to detect the presence of hemoglobin with a specific test does not allow unequivocal confirmation of the presence of human blood in the biological trace examined;

II. Failure to detect the presence of spermatozoa does not allow unequivocal confirmation of the presence of whole human semen in the biological trace examined.

III. The inconclusive result of the determination of the specific test for the presence of human blood in the tested trace/sample leads to the submission of an inconclusive statement in

Gdy wynik testu nieswoistego jest pozytywny i brak materiału na dalsze testy swoiste, należy to wskazać w sprawozdaniu/opinii, np. w następujący sposób: „Badania wstępne wskazują na możliwą obecność krwi/nasienia. Dalszych testów potwierdzających nie prowadzono z powodu potrzeby zachowania pozostałej części próby/ślądu do badań DNA.”

Pozytywny wynik testów nieswoistych w przypadku płynów i substancji biologicznych dla których nie ma testów swoistych, powinien być zakończony następującym przykładowym wnioskiem: „Pozytywny wynik testów na obecność substancji X nie pozwala na wykluczenie jej obecności (wskazuje na jej potencjalną obecność). Ze względu na brak testów swoistych nie ma możliwości potwierdzenia obecności tej substancji w badanym śladzie/materialie”.

W uzasadnionych przypadkach dopuszcza się odstąpienie od wykonywania testów swoistych w sytuacji, gdy użyte metody są tak czułe, że ich negatywny wynik praktycznie wyklucza obecność danej substancji. Przykładowo negatywny wynik testu z użyciem luminolu uprawnia do odstąpienia od prowadzenia dalszej identyfikacji krwi z użyciem testu swoistego.

6.2. Testy swoiste, potwierdzające obecność substancji biologicznej

W przypadku pozytywnego wyniku oznaczenia testu specyficznego, potwierdzającego obecność hemoglobiny lub glikoforyny A czy beta spektryny człowieka, czy też obserwacji przez eksperta obecności choćby jednego plemnika/główki plemnika w śladzie, uzasadnione jest przedłożenie w sprawozdaniu z badania jednego z następujących wniosków:

I. Potwierdzenie obecności hemoglobiny człowieka za pomocą testu specyficznego daje podstawy do stwierdzenia obecności krwi człowieka w badanym śladzie biologicznym;

II. Potwierdzenie obecności plemników daje podstawę do stwierdzenia obecności pełnego nasienia w badanym śladzie biologicznym.

W przypadku negatywnego wyniku testu specyficznego na obecność hemoglobiny lub glikoforyny A (beta spektryny) człowieka, czy też nieujawnienia choćby jednego plemnika w próbie/śladzie, uprawnione jest przedłożenie w sprawozdaniu z badania jednego z następujących wniosków:

I. Niemożność wykrycia obecności hemoglobiny za pomocą testu specyficznego nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie obecności krwi człowieka w badanym śladzie biologicznym;

II. Niemożność wykrycia obecności plemników nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie obecności pełnego nasienia człowieka w badanym śladzie biologicznym;

III. Wynik niejednoznaczny oznaczenia testu specyficznego na obecność krwi człowieka w badanym śladzie/próbie prowadzi

the report, which reads as follows: “The test results obtained do not allow unequivocal determination of whether there is human blood in the tested trace/sample.”

7. New methods for identifying biological fluids and tissues

New methods for the identification of biological substances are based, among others, on the analysis of the expression of mRNA (messenger RNA), miRNA (micro RNA) profiles, epigenetic modifications, spectroscopy: Raman, NMR, fluorescence or Fourier transform, identification of proteins by mass spectroscopy, biosensors or bacterial markers, which are under active verification [7,46,59-67]. These methods make it possible to identify with a relatively high degree of certainty the presence of vaginal secretions, sweat, feces, epithelia or epidermis [68]. A number of them have been implemented into research practice for determining the source of biological substances such as tissue-specific miRNA markers or mRNA transcripts. These methods will be able to be implemented into routine laboratory practice after appropriate validation, the results of which should be published in a peer-reviewed journal, especially since it is possible to combine RNA profiling with DNA profiling [18,29,47]. However, RNA profiling also faces a number of serious problems such as the lack of a method for specific measurement of the amount of human RNA, which can lead to the formation of non-specific artifacts [46].

The above methods should not be considered competitive or mutually exclusive, but rather potentially complementary to the analytical techniques currently in use. They open the way for obtaining useful information for a much wider range of biological substances. The new testing strategies also offer higher sensitivity and the potential for greater standardization and automation, as well as the inclusion in the panel of routinely used tests of methods to identify other body fluids and biological substances that are not detected by commonly used methods. Recommendations for the new technologies described above will certainly be considered in the future work of the expert panel.

do przedłożenia w sprawozdaniu nierozstrzygującego wniosku, o następującej treści: „Uzyskane wyniki badań nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, czy w badanym śladzie/próbce znajduje się krew pochodząca od człowieka”.

7. Nowe metody identyfikacji płynów biologicznych i tkanek

Nowe metody identyfikacji substancji biologicznych, opierające się m.in. na analizie ekspresji profili mRNA (*messenger RNA*), miRNA (*micro RNA*), modyfikacji epigenetycznych, spektroskopii: Ramanowskiej, NMR, fluorescencyjnej czy Fourierowskiej, identyfikacji białek metodą spektroskopii mas, biosensorów czy markerów bakteryjnych, które są w fazie aktywnej weryfikacji [7,46,59-67]. Dzięki tym metodom staje się możliwe identyfikowanie ze stosunkowo dużą pewnością obecności wydzieliny z pochwy, potu, kału, nabłonków czy naskórka [68]. Szereg z nich zostało wdrożonych do praktyki badawczej w zakresie ustalania źródła substancji biologicznych, jak specyficzne tkankowo markery miRNA czy transkrypty mRNA. Metody te będą mogły być wdrożone do rutynowej praktyki laboratoryjnej po odpowiedniej walidacji, której wyniki powinny zostać opublikowane w recenzowanym czasopiśmie, tym bardziej, że możliwe jest połączenie profilowania RNA z profilowaniem DNA [18,29,47]. Profilowanie RNA napotyka jednak też na szereg poważnych problemów jak chociażby brak metody swobodnego pomiaru ilości RNA człowieka co może prowadzić do powstawania niespecyficznych artefaktów [46].

Powyższych metod nie należy uważać za konkurencyjne lub wzajemnie wykluczające się, a raczej za potencjalnie komplementarne, również w stosunku do obecnie używanych technik analitycznych. Otwierają one drogę do uzyskania przydatnych informacji dla znacznie szerszego zakresu substancji biologicznych. Nowe strategie badawcze oferują również wyższą czułość oraz możliwość większej standaryzacji i automatyzacji, a także włączenie do panelu stosowanych rutynowo testów metod identyfikacji innych płynów ustrojowych i substancji biologicznych, których nie wykrywa się w oparciu o powszechnie wykorzystywane metody. Rekomendacje dotyczące opisanych wyżej nowych technologii z pewnością będą przedmiotem rozważań w przyszłych pracach zespołu ekspertów.

References | Piśmiennictwo

1. PN-EN ISO/IEC 17025:2018-2. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących (www.pca.gov.pl)
2. DAB-10 Akredytacja laboratoriów badawczych – dostawców usług kryminalistycznych wykonujących czynności laboratoryjne. Polskie Centrum Akredytacji, wyd. 2, Warszawa, 15.12.2020 r. (www.pca.gov.pl/publikacje)
3. Zasady Dobrej Praktyki Laboratoryjnej. Załącznik nr 1 do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 czerwca 2003 r. (Dz.U. 2003 nr 116 poz. 1103)
4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 sierpnia 2021 r. w sprawie Dobrej Praktyki Laboratoryjnej i wykonywania badań zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (Dz.U. 2021 poz. 1422)
5. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int.* 2009; 188(1-3): 1-17.
6. An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. *BMB Rep.* Body fluid identification in forensics. 2012; 45(10): 545-553
7. Sijen T, Molecular approaches for forensic cell type identification: on mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 18: 21-32
8. Szkuta B, Harvey ML, Ballantyne KN, van Oorschot RAH. DNA transfer by examination tools-a risk for forensic casework? *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 16: 246-254.
9. Meakin G, Jamieson A. DNA transfer: review and implications for casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7(4): 434-443
10. Kodeks postępowania karnego. Ustawa z dnia 6 czerwca 1997 r., Dz. U. 1997 Nr 89 poz. 555
11. Gaensslen RE. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry. U.S. Department of Justice, Washington, DC, 1983
12. Lee WC, Koo BE. Forensic light sources for detection of biological evidences in crime scene investigation: a review. *MJOFS* 2010; 1: 17-27
13. Cassidy BM, Lu Z, Martin JP, Tazik SK, Kellogg KW, DeJong SA, Belliveau EO, Kilgore KE, Ervin SM, Meece-Rayle M, Abraham AM, Myrick ML, Morgan SL. A quantitative method for determining a representative detection limit of the forensic luminol test for latent bloodstains. *Forensic Sci Int.* 2017; 278: 396-403
14. Shaler RC, Modern forensic biology. In: R. Saferstein (Ed.), *Forensic Science Handbook*, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2002, pp. 529-546
15. Spalding RP, Identification and characterization of blood and bloodstains. In: James SH, Nordby JJ, Bell S (Eds). *Forensic Science: An Introduction to Scientific and Investigative Techniques*. CRC Press, Boca Raton, 2003, pp. 181-201
16. Kotowski TM, Grieve MC, The use of microspectrophotometry to characterize microscopic amounts of blood. *J. Forensic Sci.* 1986; 31(3): 1079-1085
17. Haas C, Klessner B, A. Maake C. Bär W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009; 3(2): 80-88
18. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Banemann R, Berti A, Borges E, Carracedo A, Carvalho M, Courts C, De Cock G, Dötsch M, Flynn S, Gomes I, Hollard C, Hjort B, Hoff-Olsen P, Hříbková K, Lindenbergh A, Ludes B, Maroñas O, McCallum N, Moore D, Morling N, Niederstätter H, Noel F, Parson W, Popielarz C, Rapone C, Roeder AD, Ruiz Y, Sauer E, Schneider PM, Sijen T, Court DS, Sviežená B, Turanská M, Vidaki A, Zatkalíková L, Ballantyne J. RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains—results of a third collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2) (2013) 230-239
19. de Beijer RP, de Graaf C, van Weert A, van Leeuwen TG, Aalders MCG, van Dam A. Identification and detection of protein markers to differentiate between forensically relevant body fluids. *Forensic Sci Int.* 2018; 290: 196-206
20. Haas C., E. Hanson, W. Bär, R. Banemann, A.M. Bento, A. Berti, E. Borges, C. Bouakaze, A. Carracedo, M. Carvalho, A. Choma, M. Dötsch, M. Duriančíková, P. Hoff-Olsen, C. Hohoff, P. Johansen, P.A. Lindenbergh, B. Loddenkötter, B. Ludes, O. Maroñas, N. Morling, H. Niederstätter, W. Parson, G. Patel, C. Popielarz, E. Salata, P.M. Schneider, T. Sijen, B. Sviežená, L. Zatkalíková, J. Ballantyne. mRNA profiling for the identification of blood—results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 5 (2011), pp. 21-26
21. Schweers BA, Old J, Boonlayangoor PW, Reich KA. Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (Rapid Stain Identification™ -Blood). *Forensic Sci Int Genet.* 2008; 2: 243-247
22. Jones EL Jr. The identification of semen and other body fluids, in: R. Saferstein (Ed.), *Forensic Science Handbook*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2005: 329-382
23. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, Gehrig C, Borer U, Thali M, Dirnhofer R, Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *J. Forensic Sci.* 1999; 44(5): 1057-1060
24. Denison SJ, Lopes EM, D'costa L, Newman JC, Positive prostate-specific antigen (PSA) results in semen-free samples. *Canadian Society of Forensic Science Journal* 2004; 37: 197-206
25. Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int.* 2005; 152(1): 1-12

26. Pang BC, Cheung BK. Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *Forensic Sci Int.* 2007; 169(1): 27-31
27. Casey DG, Price J. The sensitivity and specificity of the RSID™ saliva kit for the detection of human salivary amylase in the forensic science laboratory, Dublin, Ireland. *Forensic Sci Int.* 2010; 194(1-3): 67-71
28. Pang BC, Cheung BK. Applicability of two commercially available kits for forensic identification of saliva stains. *J Forensic Sci.* 2008; 53(5): 1117-1122
29. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Ballantyne KN, Banemann R, Bhoelai B, Borges E, Carvalho M, Courts C, De Cock G, Drobnic K, Dötsch M, Fleming R, Franchi C, Gomes I, Hadzic G, Harbison SA, Harteveld J, Hjort B, Hollard C, Hoff-Olsen P, Hüls C, Keyser C, Maroñas O, McCallum N, Moore D, Morling N, Niederstätter H, Noël F, Parson W, Phillips C, Popielarz C, Roeder AD, Salvaderi L, Sauer E, Schneider PM, Shanthan G, Court DS, Turanská M, van Oorschot RA, Vennemann M, Vidaki A, Zatkáliková L, Ballantyne J. RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet.* 2014; 8(1): 203-212.
30. Jakubowska J, Maciejewska A, Pawlowski R, Bielawski KP. mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7(2): 272-278
31. Lindenbergh A, de Pagter M, Ramdayal G, Visser M, Zubakov D, Kayser M, Sijen T. A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(5): 565-577
32. Richard ML, Harper KA, Craig RL, Onorato AJ, Robertson JM, Donack J. Evaluation of mRNA marker specificity for the identification of five human body fluids by capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(4): 452-460
33. Roeder AD, Haas C. mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification. *Int J Leg Med.* 2013; 127(4): 707-721
34. Watson N. *The Analysis of Body Fluids, Crime Scene to Court: the Essentials of Forensic Science.* Royal Society of Chemist, Cambridge, UK, 2004: 377-413
35. Greenfield A, Sloan MA. Identification of biological fluids and stains. In: James SH, Nordby JJ. (Eds), *Forensic Science: an Introduction to Scientific and Investigative Techniques*, CRC Press, Boca Raton, 2003: 203-220
36. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Roughé D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci.* 2001; 46(2): 349-351
37. De Moors A, Georgalis T, Armstrong G, Modler J, Frégeau CJ. Sperm Hy-Liter: an effective tool for the detection of spermatozoa in sexual assault exhibits. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7(3): 367-379
38. Suttipatit P, Wongwittayapanich S. Detection of prostate specific antigen and semenogelin in specimens from female rape victims. *J Forensic Leg Med.* 2018; 54: 102-108
39. Lundwall A, Bjartell A, Olsson AY, Malm J. Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in non-genital tissues. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8(9): 805-810
40. Laffan, Á., Sawyer, I., Quinones, I., & Daniel, B. (2011). Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. *Medicine, Science and the Law*, 51(1), 11-17
41. Hobbs M., Steiner M.J., Kimberly D. Rich M., Gallo F., Warner L., Macaluso M.: Vaginal swab specimen processing methods influence performance of rapid semen detection tests: a cautionary tale. *Contraception* 2010, 82(3) 291-295
42. Yu H, Diamandis EP. Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clin Chem.* 1995, 41(1), 54-58
43. Yu H, Berkel H. Prostate-specific antigen (PSA) in women. *J La State Med Soc.* 1999; 151(4): 209-213
44. Yu H, Diamandis EP. Prostate-specific antigen immunoreactivity in amniotic fluid. *Clin. Chem.* 1995; 41(2): 204-210
45. Schmidt S, Franke M, Lehmann J, Loch T, Stöckle M, Weichert-Jacobsen K. Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology* 2001; 57(4): 717-720
46. Harbison, SA, RI Fleming *Forensic body fluid identification: state of art. Research and Reports in Forensic Medical Science*, 2016; 6:11-23.
47. C. Haas, E. Hanson, M.J. Anjos, W. Bär, R. Banemann, A. Berti, E. Borges, C. Bouakaze, A. Carracedo, M. Carvalho, V. Castella, A. Choma, G. DeCock, M. Dötsch, P. Hoff-Olsen, P. Johansen, F. Kohlmeier, P.A. Lindenbergh, B. Ludes, O. Maroñas, D. Moore, M.-L. Morerod, N. Morling, H. Niederstätter, F. Noel, W. Parson, G. Patel, C. Popielarz, E. Salata, P.M. Schneider, T. Sijen, B. Sviežena, M. Turanská, L. Zatkáliková, J. Ballantyne RNA/DNA co-analysis from blood stains – Results of a second collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(1): 70-80
48. SOFT/AAFS Forensic Toxicology Laboratory Guidelines 2006 version. 8.2. Confirmatory tests pp: 10-12
49. de Beijer RP, de Graaf C, van Weert A, van Leeuwen TG, Aalders MCG, van Dam A Identification and detection of protein markers to differentiate between forensically relevant body fluids. *Forensic Sci Int.* 2018; 290:196-206
50. Hess S, Haas C. Recovery of Trace DNA on Clothing: A Comparison of Mini-tape Lifting and Three Other Forensic Evidence Collection Techniques. *J Forensic Sci.* 2017; 62(1): 187-191
51. Jones EL Jr, Leon JA. Lugol's test re-examined again: buccal cells. *J Forensic Sci.* 2004; 49: 64-67

52. Stombaugh PM, Kearney JJ. Factors affecting the use of lactate dehydrogenase as a means of bloodstain differentiation. *J Forensic Sci.* 1987; 23: 94-105
53. Hanson EK, Ballantyne J. Highly specific mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations. *Sci Justice.* 2013; 53: 14-22
54. SWGDAM Guidelines for the Collection and Serological Examination of Biological Evidence (https://docs.wixstatic.com/ugd/4344b0_b3deba7a272b4b268d7f522840607410.pdf)
55. Internal Validation Guide of Autosomal STR Systems for Forensic Laboratories, Promega 2013
56. Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process, ENFSI 2010
57. Branicki W, Kupiec T, Pawłowski R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *J Forensic Sci.* 2003; 48 (1): 83-87
58. Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci.* 2003 (Suppl 1): S96-S99
59. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Leg Med.* 2010; 124: 217-226
60. Doi M, Gamo S, Okiura T, Nishimukai H, Asano M. A simple identification method for vaginal secretions using relative quantification of *Lactobacillus* DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2014; 12: 93-99
61. Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Sci Int.* 2015; 249: 255-265
62. Sikirzhyskaya A, Sikirzhyski V, Lednev, IK. Raman spectroscopy coupled with advanced chemometrics for forensic analysis of semen and blood mixtures. *Spectroscopy.* 2013; 28: 25-29
63. Orphanou CM. The detection and discrimination of human body fluids using AFT-FT-IR spectroscopy. *Forensic Sci Int.* 2015; 252: e10-e16
64. Yang H, Zhou B, Deng H, Prinz M, Siegel D. Body fluid identification by mass spectrometry. *Int J Leg Med.* 2013; 127: 1065-1077
65. Scano P, Locci E, Noto A, Navarra G, Murgia F, Lussu M, Barberini L, Atzori L, De Giorgio F, Rosa MF, d'Aloja E. 1H NMR metabolite fingerprinting as a new tool for body fluid identification in forensic science. *Magn Reson Chem.* 2013; 51(8): 454-462
66. De Wael K, Lepot L, Gason F, Gilbert B. In search of blood-detection of minute particles using spectroscopic methods. *Forensic Sci Int.* 2008; 180: 37-42
67. Frascione N, Pinto V, Daniel B. Development of a biosensor for human blood: new routes to body fluid identification. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404: 23-28
68. Xu Y, Xie J, Cao Y, Zhou H, Ping Y, Chen L, Gu L, Hu W, Bi G, Ge J, Chen X, Zhao Z. Development of highly sensitive and specific mRNA multiplex system (XCVR1) for forensic human body fluids and tissues identification. *PLoS One.* 2014; 9(7): e100123

Date:

date of submission | data nadesłania: **06.05.2021**
acceptance date | data akceptacji: **05.12.2023**

Corresponding author:

Prof. Ryszard Pawłowski
Email: Richard@gumed.edu.pl
Dr hab. Renata Jacewicz
Email: renata.jacewicz@umed.lodz.pl

ORCID:

Ryszard Pawłowski: 0000-0003-2302-4761
Wojciech Branicki: 0000-0002-7412-5733
Tomasz Kupiec: 0000-0001-8510-5028
Tomasz Grzybowski: 0000-0001-6228-6460
Agnieszka Parys-Proszek: 0000-0002-8321-6143
Monika Abreu-Głowacka: 0000-0002-3090-4786
Kornelia Drożdżok: 0000-0001-6715-810X
Marzanna Ciesielka: 0000-0002-2685-8764
Marcin Woźniak: 0000-0003-4491-3824
Andrzej Ossowski: 0000-0002-6819-1638
Renata Jacewicz: 0000-0002-2263-1298