

Adam Sackiewicz, Anna Niemcunowicz-Janica, Witold Pepiński, Małgorzata Skawrońska, Michał Szeremeta, Iwona Ptaszyńska-Sarosiek, Magdalena Okłota

Ocena wizualizacji śladów biologicznych z użyciem alternatywnego źródła światła (ALS) w aspekcie identyfikacji genetycznej.

Część II. Analiza śladów nasienia*

Evaluation of visualization of biological stains with the use of alternative light source (ALS) for the purpose of genetic identification. Part II. Semen samples analysis

Z Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: dr hab. n. med. A. Niemcunowicz-Janica

Ujawnienie śladów nasienia na przedmiotach pochodzących z miejsca zdarzenia (np. odzież i pościel) stanowi ważny element dochodzenia w przypadku przestępstw seksualnych. Użycie alternatywnego źródła światła może być pomocne w ich wykrywaniu. Celem niniejszej pracy była ocena przydatności wizualizacji śladów nasienia ludzkiego, przy użyciu alternatywnego źródła światła (ALS), w aspekcie identyfikacji genetycznej. Badania wykazały, że doświadczalne plamy nasienia, znajdujące się na jasnym materiale, są najlepiej widoczne w świetle dziennym oraz w zakresie widma lampy łukowej do wartości rozcieńczenia nasienia wodą w stosunku 1:10. Pełne profile DNA *loci* zestawu AmpFISTR SGM Plus uzyskano z plam wykonanych z próbek nasienia rozcieńczonych w proporcji 1:1750, natomiast dla rozcieńczeń 1:2000 stwierdzono niepełne profile DNA. W przypadku zatarcia śladów nasienia najlepszy efekt wizualizacji uzyskano przy zastosowaniu ALS o długości fali 455 nm i filtra pomarańczowego.

Detection of seminal stains on items such as clothing and bedding is a significant element of investigation in sexual assault cases. The use of alternative light source may assist in their identification. The objective of the investigation was the evaluation of human semen visualization with the use of alternative light source for the purpose of genetic identification. The tests demonstrated that

experimentally prepared semen stains on the bright base could be best seen in the natural light and white light when the semen was diluted at a ratio 1:10. The complete typeability of AmpFISTR SGM Plus kit loci was evaluated in semen which was diluted at a ratio 1:1750 and typeability of AmpFISTR SGM Plus kit loci was incomplete in semen diluted at a ratio 1:2000. After washing with laundry detergents, semen stains were still recognizable under ALS wavelength 455 nm, while wearing orange goggles.

Słowa kluczowe:

alternatywne źródło światła, nasienie, fluorescencja

Key words:

alternative light source, semen, fluorescence

WPROWADZENIE

Praca stanowi kontynuację badań nad identyfikacją śladów biologicznych. W tej części przedstawiono ocenę wizualizacji śladów nasienia przy użyciu alternatywnego źródła światła w aspekcie identyfikacji genetycznej.

Z praktyki sądowo-lekarskiej wynika, że przestępstwa na tle seksualnym budzą wiele wątpliwości przed sądem i dlatego niezwykle istotne jest dokładne i prawidłowe ujawnienie oraz zabezpiecze-

* Poszerzona wersja plakatu, przedstawionego podczas XV Zjazdu Naukowego PTMSiK, Gdańsk 16-18.09.2010.

nie śladów w trakcie oględzin miejsca zdarzenia, osób pokrzywdzonych i podejrzanych oraz odzieży. W przypadku przestępstw seksualnych dochodzenie opiera się najczęściej na wykryciu i identyfikacji śladów nasienia sprawcy. Ujawnienie materiału biologicznego sprawcy czynu nierzadko jednak bywa utrudnione z uwagi na jego śladową ilość, przypadkowe bądź celowe zacieranie. W takich sytuacjach niezwykle pomocne okazuje się urządzenie emitujące alternatywne źródło światła, pod wpływem którego płamy nasienia wykazują charakterystyczną fluorescencję [1].

MATERIAŁ I METODY

W przeprowadzonych badaniach oceniano przydatność wizualizacji śladów nasienia przy użyciu alternatywnego źródła światła (ALS) w aspekcie identyfikacji genetycznej. Materiał do badań stanowiło świeże nasienie ludzkie. Określoną objętość nasienia rozcieńczono wodą w proporcjach: 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000, 1:1250, 1:1500, 1:1750, 1:2000. Tak przygotowane rozcieńczenia naniesiono na jałową gazę chirurgiczną koloru białego, która jest podłożem niekontrastowym w stosunku do materiału biologicznego. Następnie przygotowane próby poddano suszeniu w temperaturze pokojowej, około 21°C. Z zabezpieczonego materiału biologicznego wykonano serie zaplamień eksperymentalnych na wybranych podłożach: skórzanym pasku koloru brązowego, ciemnej bawełnianej koszulce, łazienkowej płytce ceramicznej, ciemnym dywaniku samochodowym, wzorzystej sukience. Zaplamienia te poddano suszeniu w temperaturze pokojowej oraz działaniu czynników zacierających, takich jak: moczenie w wodzie, czyszczenie powierzchniowe (zapieranie) przy zastosowaniu ciepłej wody i powszechnie dostępnych środków piorących. Obie serie zaplamień poddano oględzinom przy użyciu alternatywnego źródła światła (ALS) o długościach fali: pełnego zakresu widma lampy łukowej, światło UV 300-400 nm, światło VIS 415-555 nm oraz w trybie CSS emitowanego przez urządzenie Mini Crime Scope 400 -Spex Forensics, z wykorzystaniem zestawu filtrów optycznych dla obserwatora: żółtego, ciemno żółtego, pomarańczowego i czerwonego. Tryb CSS to opcjonalny tryb pracy oświetlacza umożliwiający jednoczesną emi-

sję światła o kilku długościach fali, co w założeniu producenta ma znacznie ułatwić wykrywanie niewidocznych i słabo widocznych śladów [2]. Obecność materiału biologicznego pochodzenia ludzkiego w wytypowanych metodą optyczną śladach, oznaczano jakościowo przy użyciu testu immunochromatograficznego PSA – Semiquant Cassette Test (Seratec). Izolację DNA z miejsc zaplamionych przeprowadzono metodą cząstek magnetycznych przy użyciu zestawu PrepFiler™ oraz metodą organiczną. Ilościową ocenę poziomu DNA w śladach przeprowadzono metodą Real Time PCR przy użyciu

Tabela 1. Ilościowa ocena DNA wyizolowanego z poszczególnych zaplamień przy użyciu zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit.

Table 1. DNA yields from serially diluted semen samples extracted using Quantifiler® Human DNA Quantification Kit.

Rozcieńczenia nasienia Semen dilutions	Uzyskane DNA (ng) Prepfilier DNA yields (ng) Prepfilier	Uzyskane DNA (ng) metoda organiczna DNA yields (ng) organic method
1:2	1480,24	1540,64
1:5	684,12	744,97
1:10	380,26	420,41
1:50	82,35	90,84
1:100	36,75	40,46
1:200	20,47	24,85
1:400	11,34	13,56
1:600	7,45	8,64
1:800	4,21	5,24
1:1000	3,89	4,17
1:1250	2,46	2,79
1:1500	1,53	1,85
1:1750	1,16	1,29
1:2000	0,61	0,86

zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit i aparatu 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Objętość pojedynczego preparatu po izolacji wynosiła 50µl. Amplifikację markerów zestawu AmpFISTR SGM Plus przeprowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700. Genotypowanie wykonano przy użyciu analizatora ABI 3130 (Applied Biosystems). Uzyskane wyniki przedstawiono w formie opisowej oraz udokumentowano na fotografiach.

WYNIKI

Doświadczalne zaplamienia na jałowej gazie chirurgicznej, w świetle dziennym, wykryto okiem nieuzbrojonym przy rozcieńczeniu nasienia wodą w stosunku 1:10. Emisja światła o długości fali 455 nm, przy zastosowaniu przez obserwatora filtra pomarańczowego, umożliwiła zaobserwowanie śladowej fluorescencji plamy nasienia rozcieńczonego wodą w stosunku 1:1000. Badanie poszczególnych zaplamień zawierających rozcieńczone nasienie w kierunku obecności PSA dało wynik pozytywny w przypadku rozcieńczenia nasienia wodą w stosunku 1:1000. Wyniki ilościowej oceny DNA wyizolowanego z poszczególnych zaplamień przy użyciu zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit przedstawiono w tabeli I. Pełne profile DNA stwierdzono dla plam wykonanych z próbek rozcieńczonych w proporcji 1:1750, natomiast dla rozcieńczeń 1:2000 uzyskano niepełne profile DNA. Zaplamienia zawierające nierozcieńczone nasienie, naniesione na ciemny dywanik samochodowy i wzorzystą bawełnianą sukienkę, uznano za niemożliwe do zaobserwowania w świetle dziennym okiem nieuzbrojonym. Zlokalizowanie materiału biologicznego na tych podłożach umożliwiła fluorescencja wzbudzona urządzeniem Mini Crime Scope, nawet po zadziałaniu czynników zacierających w postaci zapierania z użyciem powszechnie dostępnych środków piorących.

DYSKUSJA

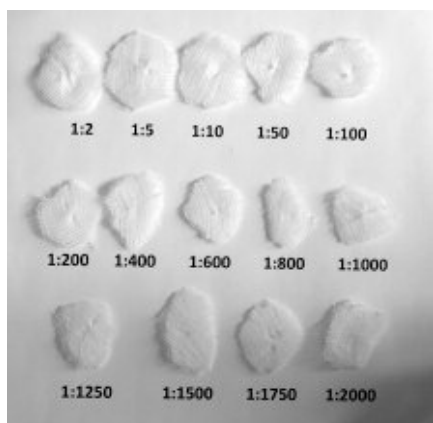
Wprowadzenie w latach osiemdziesiątych do badań sądowych techniki PCR stanowiło szybką oraz czułą metodę identyfikacji osobniczej ze skąpego lub zdegradowanego materiału biologicznego. Poszerzenie tej metody o tak zwany multipleks PCR

pozwoлиło na zbadanie kilkunastu systemów polimorficznych w jednej mieszaninie reakcyjnej [1]. Obecnie używane zestawy komercyjne charakteryzują się wysoką czułością i umożliwiają analizę DNA w znacznym stopniu zdegradowanego. Już ilość wyjściowego DNA, zawierająca się w granicach 1,0-2,5 ng, pozwala na uzyskanie pełnego profilu w zakresie badanych układów danego systemu [3]. Ślady biologiczne, takie jak: krew ślina, nasienie, stanowią dowody wykorzystywane przy rekonstrukcji zdarzeń kryminalnych [4]. Do ich ujawnienia od blisko 40 lat stosuje się różne źródła światła alternatywnego [5].

Wyschnięte nasienie jest substancją silnie fluorescującą [6], najlepiej widoczną przy długości fali około 450 nm z użyciem pomarańczowego filtra odcinającego [7, 8, 9]. Dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym ślady nasienia uwidaczniają się jako żółto zielonkawe plamy również pod wpływem lasera typu FLS emitującego wiązkę światła o długości fali 532 nm [10]. Badania prowadzone przez Vandenbergę i wsp. wykazały, że alternatywne źródło światła (Polilight) o długości fali 450 nm z równoczesnym użyciem przez obserwatora filtra pomarańczowego umożliwia detekcję plam nasienia rozcieńczonego wodą w stosunku 1:100 i naniesionego na biały poliestrowy materiał [7]. W naszych badaniach, na podłożu wykonanym z jałowej gazy chirurgicznej, przy analogicznych parametrach obserwacji z wykorzystaniem urządzenia Mini Crime Scope, za możliwe do ujawnienia uznano ślady nasienia rozcieńczonego wodą w stosunku nawet 1:1000. Kobus i wsp. wykazali, że stopień fluorescencji zależy od koloru, faktury i zdolności absorpcji materiału z jakiego wykonane jest podłoże [11]. Efekt fluorescencji zaobserwować można również w czasie użycia ALS w stosunku do plam moczu, smarów, kosmetyków i atramentu, co w przypadku typowania materiału biologicznego do dalszych badań identyfikacyjnych może wymagać zastosowania dodatkowych testów swoistych potwierdzających obecność nasienia w badanym śladzie [2]. Sensabaugh i wsp. wskazali na możliwość wykorzystania antygenu specyficznego dla gruczolę krokowego (PSA) jako markera do identyfikacji nasienia na dowodach rzeczowych pochodzących z miejsc przestępstw na tle seksualnym [12]. W ostatnich latach potwierdziły to badania Gorzkiewicz i wsp. [13].

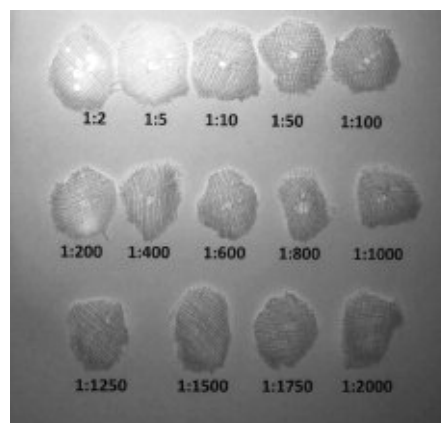
Przedstawiona w pracy metoda wizualizacji optycznej śladów nasienia charakteryzuje się wysoką czułością, stanowi również szybki i stosunkowo tani sposób na wstępne rozpoznanie niewidocznych nieuzbrojonym okiem zaplamień oraz wytypowanie materiału biologicznego do dalszych badań identyfikacyjnych. Badania wykazały, że barwa i struk-

tura podłoża, na którym występują zaplamienia w różnym stopniu wpływają na ich wygląd w świetle dziennym i intensywność fluorescencji. Pomimo zatarcia śladów nasienia, użycie ALS pozwala na zidentyfikowanie zaplamień i zabezpieczenie wartościowego materiału biologicznego.



Ryc. 1. Wizualizacja plam rozcieńczonego nasienia w świetle dziennym.

Fig. 1. Visualization of diluted seminal fluid in the natural light.



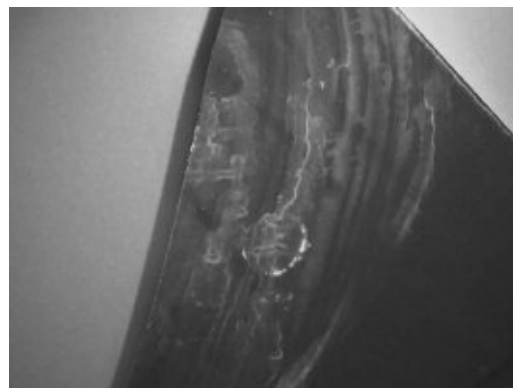
Ryc. 2. Wizualizacja plam rozcieńczonego nasienia na białej chuście chirurgicznej przy wzbudzeniu falą 455 nm i użyciu pomarańczowych gogli.

Fig. 2 Visualization of diluted seminal fluid on white bandage at 455 nm excitation, viewed through orange goggles.



Ryc. 3. Próbkę nasienia naniesiona na jasną płytkę ceramiczną po zmyciu ciepłą wodą (światło dzienne).

Fig. 3. A sample of semen on the white tile following washing in warm water (natural light).



Ryc. 4. Próbkę nasienia naniesiona na jasną płytkę ceramiczną po zmyciu ciepłą wodą przy wzbudzeniu falą 455 nm i użyciu pomarańczowych gogli.

Fig. 4. A sample of semen on the white tile following washing in warm water at 455 nm excitation, viewed through orange goggles.



Ryc. 5. *Próbka nasienia naniesiona na kolorową bawełnianą sukienkę po zapieraniu ciepłą wodą z detergentem (światło dzienne).*

Fig. 5. *A sample of semen on a colorful cotton dress following washing in warm water with detergent (natural light).*



Ryc. 6. *Próbka nasienia naniesiona na kolorową bawełnianą sukienkę po zapieraniu ciepłą wodą z detergentem po wzbudzeniu falą 455 nm i użyciu pomarańczowych gogli.*

Fig. 6. *A sample of semen on a colorful cotton dress following washing in warm water with detergent at 455 nm excitation, viewed through orange goggles*

PIŚMIENICTWO

1. Pawłowski R.: Medyczo-sądowe badanie śladów biologicznych. Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie 1997.

2. Mini Crime Scope 400 -Spex Forensics instruction manual. www.crimescope.com.

3. AmpFI STR SGM Plus PCR Amplification Kit User's Manual, Applied Biosystems.

4. Virkler K., Lednev I. K.: 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: 1-17.

5. Alternative Light Sources Analysis. *World of Forensic Science*. www.enotes.com.

6. Stoilovic M.: Detection of semen and bloodstains using the Polilight as a light source. *Forensic Sci. Int.* 1991. 51: 289-296.

7. Vandenberg N., van Oorschot R.: The use of Polilight® in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. *J. Forensic Sci.* 2006. 51: 361-370.

8. Ray B.: Use of alternate light sources for detection of body fluids. *SWAFS J.* 1992.14: 30-33.

9. Nelson D. G., Santucci K .A.: An alternate light source to detect semen. *Academic Emergency Medicine* 2002. 9: 1045-1048.

10. Seidl S., Hausmann R., Betz P: Comparison of laser and mercury-arc lamp for the detection of body fluids on different substrates. *Int. J. Legal Med.* 2008. 122: 241-244.

11. Kobus H. J., Silenieks E., Scharnberg J.: Improving the effectiveness of fluorescence for the detection of seminal stains on fabrics. *J. Forensic Sci.* 2002. 47: 819-823.

12. Sensabaugh G.: Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J. Forensic Sci.* 1978. 23: 106-115.

13. Gorzkiewicz M., Woźniak M., Grzybowski T.: Identyfikacja nasienia w zaplamieniach krwawych z użyciem alternatywnego źródła światła i przesiewowych testów biochemicznych. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2008. LVIII: 182-187.