

Biyolojik Delillerin Tespitinde Kullanılan Tarama ve Doğrulama Testleri ve Bu Konudaki Son Gelişmeler

Presumptive and Confirmatory Tests Used in Identification of Biological Evidence and the Latest Developments in This Topic

● Beytullah KARADAYI,^a
 ● Şükriye KARADAYI,^b
 ● Nurdan SEZGİN^c

^aAdli Tıp AD,
 İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
 Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
^bAltınbaş Üniversitesi
 Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu,
^cAydın Üniversitesi
 Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu,
 İstanbul

Received: 28.02.2018
 Received in revised form: 26.03.2018
 Accepted: 29.03.2018
 Available online: 14.09.2018

Correspondence:
 Şükriye KARADAYI
 Altınbaş Üniversitesi
 Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu,
 İstanbul,
 TÜRKİYE/TURKEY
 sukriyek@gmail.com

ÖZET Olay yerinde bulunan biyolojik örnekler, çoğu zaman olayın tüm aşamalarının aydınlatılmasında ve suçlu veya suçluların identifikasyonunda en güçlü delillerden biridir. Olayın gerçekleştiği yerdeki vücut sıvılarının yerinin saptanması ve sonrasında orijininin belirlenmesi için adli laboratuvarların rutin analizlerinde temeli mikroskopik, kimyasal, immünojenik ve spektroskopik yöntemlere dayalı olan bazı tarama ve doğrulama testleri uygulanmaktadır. Sonraki aşama ise gerekli görülen biyolojik deliller üzerinde kimliklendirme için DNA analizidir. Tarama ve doğrulama testlerinin en önemli avantajı delilin yerinin belirlenmesinin yanında, delil niteliği taşımayan örneklerin eliminasyonu sağlanarak gereksiz DNA analizi yapılmasının önüne geçilmesi ve böylece zaman kaybının ve ekonomik kayıpların önlenmesidir. Olay yeri inceleme uzmanlarının, adli biyoloji laboratuvarı çalışanlarının ve çeşitli dava dosyalarında bu tür deliller ile ilgili laboratuvar sonuçlarını yorumlayan adli tıp uzmanlarının biyolojik delillerle ilgili bilgilerinin yeterli düzeyde olması önemlidir. Rutin uygulamalarda her bir vücut sıvısının saptanmasında kullanılan ayrı testler bulunmaktadır. Çünkü, aynı yöntemle az miktardaki biyolojik örnekten tüm vücut sıvılarının saptanmasına yönelik yüksek güvenilirlikte bir test henüz rutin uygulamalara girmemiştir. Son yıllarda bu konuda çalışan araştırmacılar tarafından, yeni tekniklerin geliştirilmesine ve mevcut tekniklerin iyileştirilmesine yönelik oldukça umut verici çalışmalar yayımlanmıştır. Bu çalışmada, olay yerindeki biyolojik delillerin yerinin saptanması ve elde edilen biyolojik örneklerin orijininin belirlenmesi aşamalarında kullanılan mevcut tarama ve doğrulama testlerinin tanıtılması ile bu konudaki sorunların çözümüne yönelik yeni geliştirilmiş moleküler genetik (mRNA) ve spektroskopik (floreans, raman) temelli yöntemlerin tartışılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Adli bilimler; adli genetik; kanıta dayalı tıp; biyolojik delil

ABSTRACT Biological evidence at the crime scene is one of the most powerful proof for elucidation to all phases of the event and identification of the culprit. In routine forensic laboratory analysis, some presumptive and confirmatory tests based on microscopic, chemical, immunological and spectroscopic methods are used to determine the body fluids at the scene and identification of the origin. The next step is DNA analyzing for personalization of necessary biological evidence. The most important advantage of scanning and verification tests is to determine the location of the evidence and to prevent the unnecessary DNA analysis by eliminating the samples which cannot use as evidence, thus to prevent the time and economic loss. It is important for crime scene investigators, forensic biology laboratory assistants, and forensic medical experts who interpreting the laboratory results about this kind of evidence in various cases to have an adequate knowledge about biological evidence. There are different tests for the detection of each type of body fluids in routine applications. But there is no high reliability test into the routine applications yet, which can determine all the body fluids from the small amounts of biological samples with the same method. In recent years, encouraging researches about the development of new techniques and improvement of existing ones were published by researchers who work in this area. In this study, it is aimed to present the current screening and validation tests used to determine the site of the biological evidence at the scene and to determine the origin of the obtained biological samples. Additionally, it is aimed to discuss of the methods based on newly developed molecular genetics (mRNA) and spectroscopy (fluorescence, raman).

Keywords: Forensic sciences; forensic genetic; evidence-based medicine; biological evidence

Olay yerinden elde edilen biyolojik örneklerin, insana mı ait olduğu ve eğer öyleyse hangi biyolojik sıvı ya da doku tipine ait olduğunun saptanması olay yerinin rekonstrüksiyonu için önemlidir. Rutin uygulamalarda biyolojik örneklerin orijininin saptanmasında kullanılan majör komponentlerin belirlenebilmesi için mikroskopik, kimyasal, immünolojik ve enzimatik yöntemlerden faydalanılmaktadır (Tablo 1). Ancak, son yıllarda henüz rutin uygulamalarda yerini almasa da mevcut yöntemlere kıyasla daha güvenilir ve pratik yöntemler üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada, vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılan mevcut geleneksel biyoanalitik yöntemler ile son 10 yıl içinde adli bilimlerdeki yeni gelişmelerin ve yönelimler ışığında geliştirilen yeni metotların irdelenmesi amaçlanmıştır. Kan için kullanılan luminol ve kristallendirme testleri ile semenin varlığını konfirme etmek için spermatozoanın mikroskopik identifikasyonu gibi geleneksel tekniklerin bazıları yıllar içinde çok küçük değişiklikler göstermişlerdir.¹⁻³ Tanımlayıcı testler olan kanda “hem”, semende “asit fosfataz [acid phosphatase (AP)]” ve tükürükte “amilaz” belirlenmesi gibi yöntemler, vücut sıvılarının doğasının daha iyi anlaşılması ve tehlikeli kimyasallara maruziyetin azaltılması gibi teknolojiye ilerlemelerle yıllar içerisinde geliştirilmiştir. Son yıllarda ise farklı vücut sıvılarında spesifik mRNA belirteçlerinin saptanmasına yönelik moleküler genetik

teknikler ile floresans ve raman spektroskopisinin kullanıldığı birkaç yeni teknik adli amaçlı incelemeler için önerilmiştir.⁴⁻⁶

Olay yerinde kan, meni ve tükürük kadar yaygın bulunmasa da vajinal sıvı, idrar, ter gibi diğer vücut sıvılarına da rastlanmaktadır. Fakat olay yerinde daha az bulunmaları, mevcut tekniklerle yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik oranlarının yüksek olması ve adli önemi daha fazla olan diğer vücut sıvılarına daha çok yer ayırabilmek için bu çalışmada bu sıvıların identifikasyon yöntemlerine değinilmeyecektir.

TARAMA (PRESUMPTIVE) TESTLERİ

Tarama testleri, olay yerinde çoğunlukla örnek alınacak bölgenin yerinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflik oranları yüksektir ve biyolojik örneğin orijini konusunda kesin bilgi vermezler. En önemli avantajı daha geniş alanlarda uygulanabilir olması ve çıplak gözle görülmesi mümkün olmayan kanıtların yerinin saptanmasında kolaylık sağlamasıdır. Ayrıca, hangi doğrulama testlerinin kullanılacağına yönelik yol göstericidir. Fakat bilinmelidir ki; tarama testleri bir olasılık belirtir, kesinlik göstermez.

Tarama testleri ile ilgili en önemli risk, uygulama sırasında biyolojik örneğin bozulma olasılığıdır. Olay yeri araştırmalarında biyolojik kanıta zarar vermeden, örnek alınması için uygun olan yerin belirlenmesi çok önemlidir. Bu yüzden yıkıcı olmayan tarama yöntemleri için en önemli kriter, bu testlerin uygulanması sırasında biyolojik delilin DNA yapısının korunmasıdır. Kan, semen, tükürük, vajinal sıvı, idrar ve ter gibi tüm vücut sıvıları DNA içermekte ve kimliklendirme için gerekli bu değerli delillerin korunması çok büyük önem taşımaktadır.⁷ Geleneksel tarama metotlarının en önemli dezavantajlarından bir diğeri de bu testlerin her birinin spesifik vücut sıvılarını saptamak için oluşturulmuş olmasıdır (Tablo 2). Bu yüzden niteliği bilinmeyen lekenin identifikasyonu için, çoklu doğrulama testlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

KAN

Olay yerinde sıklıkla karşılaşılan ve adli açıdan en önemli biyolojik delillerden biri kandır. Luminol

TABLO 1: Kan, semen ve tükürüğün tanımlanmasında kullanılan majör komponentler.

Kan	Semen	Tükürük
- Hemoglobin	- Asit fosfataz	- Amilaz
- Fibrinojen	- Prostat-spesifik antijen	- Lizozim
- Eritrosit	- Spermatozoa	- Musin
- Albümin	- Kolin	- Bukkal epitel hücreler
- Glukoz	- Spermin	- Tiyosiyanat
- İmmüoglobulinler	- Semenogelin	- Potasyum
	- Çinko	- Bikarbonat
	- Sitrik asit	- Fosfor
	- Laktik asit	- Glukoz
	- Fruktoz	- İmmüoglobulinler
	- Üre	
	- Askorbik asit	
	- İmmüoglobulinler	

TABLO 2: Rutin uygulamalarda vücut sıvılarının (kan, meni, tükürük) tanımlanmasında sık kullanılan tarama ve doğrulama testleri.²

Vücut sıvısı	Komponent	Sınıflandırma	Metot	
Kan	Tam sıvı	Işık kaynakları	Pollight	
		Kemilüminesans	Luminol, floresein	
	Hemoglobin	Kimyasal	Benzidin, Kastle-Meyer, O-toluidin, TMB/Hemastix1	
		Kristal test	Teichman, Takayama	
		Spektroskopik	UV-Vis, Floresans	
		Kromatografik	PC, TLC	
		Elementler	Spektroskopik	SEM-EDX
			İzozimler	LDH
		Antikorlar	İmmünojenik	Heme Select, ABACard, Hema Trace, Hexagon OBTI
			İmmünojenik	ELISA
Meni	Işık kaynakları	Kimyasal	Wood lamba, Bluemaxx BM500, Pollight1	
		İmmünojenik	SAP, LAP, GDA, CAP, g-GTP	
		Kristal test	GGT, ELISA	
		Kemilüminesans	Floresan test kimyasalı	
	Elektroforez	Kolin oksidaz	Kolin oksidaz/luminol	
		İzotakforez	İzotakforez	
		Kromatografik	HPLC, PC, TLC	
		Elektroforez	Kapiller tüp elektroforezi	
		Kristal test	Barberio test, Puanen test	
		Kimyasal	Çinko kâğıt strip testi	
		Spektroskopik	SEM-EDX	
		Mikroskopik	Christmas ağacı lekesi	
		İmmünojenik	PSA, SVSA	
			Radyoimmün test	
	Tükürük	Işık kaynakları	Uv ışık,	
		Kimyasal	Starch-iyodin, phadebas1	
		İmmünojenik	ELISA immünodifüzyon	
Spektroskopik		SEM-EDX		

testi, şüpheli kan lekelerinin yerinin belirlenmesinde yaklaşık 50 yıldır kullanılan ve ilk uygulanan tarama testlerindedir.⁸ Sprey formunda olay yerinde uygulanabilen luminol çözeltisi kandaki hematin ile reaksiyona girerek ultraviyole (UV) ışık altında güçlü floresans mavi ışık vermektedir.^{9,10} Bu lüminesans ışımaya en iyi karanlık ortamda görülmekte ve bu görünüm birkaç dakika sürmektedir, yani bu kısa süre içerisinde fotoğraflanabilmektedir. Eski kan lekeleri taze kan lekesine göre luminolde daha uzun ve daha yoğun lüminesans vermeye eğilimlidir ve tekrar uygulanarak (sprey olarak) luminol ile görüntülenebilmektedir. Hassasiyet, lüminasyon süresi ve sonraki DNA analizle-

rine etkileri bakımından avantaj ve dezavantaj içeren formülasyonları mevcuttur.^{11,12} Bu test, şüpheliler tarafından temizlenen olay yerlerinde dahi kullanılabilir. Bazı formlarının DNA üzerine bozucu etki yaptığı ileri sürülmüştür.¹¹ Luminol testi diğer tarama testleriyle karşılaştırıldığında, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçları daha az göstermesi ve diğer reaktiflere göre daha az tehlikeli olması sebebiyle popüler bir testtir.¹³ Ancak, karanlık bir ortamda kullanılması ve koruyucu kıyafet ve gözlük gerekliliği dezavantajdır.¹⁴ Ayrıca, bakır içeren pirinç, bronz gibi alaşımlarla yalancı pozitiflik verebilmektedir. Bu tür maddelerin kullanıldığı (özellikle kilit, kapı kolları ve diğer de-

mirbaşlarda) alanlarda dikkatli olunmalıdır. Kemi-lüminesans (kimyasal ışımaya) temelli diğer teknik, biyolojik örnekteki DNA'ya zarar vermeden pozitif sonuçlar veren Bluestar'dır.¹⁵ Bu teknik luminol ile karşılaştırıldığında, daha hassas ve daha stabil olduğu öne sürülmektedir.¹²

Şüpheli kan örneğinin identifikasyonunda uzun zamandır kullanılan peroksidaz enzimatik aktivitesi ile "hem" grubunun etkileşimini temel alan çeşitli katalitik testler bulunmaktadır.¹⁰ Bunların içinde en çok kullanılanlardan biri benzidin testidir. Pozitif sonuçta kan, etanol/asetik asit solüsyonu ile reaksiyona girdiğinde mavi bir renk görünmektedir.^{9,10} Bu yöntemin uygulanmasında kimyasal oksidanlar ve meyve/sebze peroksidazları sebebiyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilmektedir.^{9,16} Fakat, yöntemin asıl dezavantajı benzidin reaktifinin karsinogen oluşudur.^{10,16,17} Bu sebeple benzidin testinin kullanımı son yıllarda sınırlandırılmıştır. Kan için en çok bilinen tarama metodlarından biri de Kastle-Meyer testi olarak da bilinen fenolftalein testidir. Kandaki hemoglobin ile fenolftaleinin etkileşime girmesi sonucu (peroksidaz reaksiyonu) pembe renk meydana gelmektedir.¹⁰ Bu test benzidin reaksiyonu gibi bazı maddelere karşı (malt ekstraktı, bazı meyve suları ve bazı ağır metal tuzları) yanlış pozitif sonuçlara sebep olabilmektedir, fakat karsinogenik değildir.⁹ Luminol kadar hassas olmamasına rağmen, 10.000'de 1 dilüsyonda kanı saptayabildiği bildirilmiştir.^{18,19} Kan tespitinde kullanılan en popüler yöntemlerden bir diğeri de lökomalaşit testidir.¹⁷ Asidik koşullar altında katalizlenmiş "hem" in reaksiyon sonucu yeşil bir renge dönüşmesiyle gerçekleşmektedir.¹⁰ Fenolftaleine benzer şekilde hassasiyet 10.000'de 1'dir.¹⁹ Diğer tüm kan testleri gibi türe spesifik değildir ve şüpheli kanın insan ya da diğer bir canlı olduğunu göstermez.²⁰

Katalitik olmayan ve immünolojik temele dayandırılan bazı tarama testleri de mevcut olup, yukarıda bahsedilen tarama testleriyle birlikte kullanılabilir. Bunlardan bazıları, primat kanını tanımlamak için kullanılan Hema Select, ABACard Hema Trace ve Hexagon OBTI gibi immünolojik temelli testlerdir. Hexagon OBTI ile eski ya da degrade materyallerden sonuç almak

mümkündür, fakat yanlış negatif sonuç verebileceği de gözden kaçırılmamalıdır.^{10,19}

Alternatif ışık kaynakları [Alternative light source (ALS)], UV, görünür veya infrared (IR) ışık kullanarak cisimlerin daha parlak (floresans) ya da daha koyu (absorbe) görünmesine neden olan ışık kaynaklarıdır. Belirli dalga boyundaki ışık demeti biyolojik örnekler üzerine yansıtıldığında bu örneklerin etkileştiği dalga boyu ile ilgili olarak absorpsiyona göre belli bir görünüm vermektedir. Kan lekelerinin saptanması için kullanılan en basit test, UV ışık veren lambaların kullanıldığı ALS'lerdir. Bu metod, özellikle arka planı koyu renk olan lekeler için daha başarılıdır.¹⁷ ALS, olay yerindeki gizli lekelerin saptanmasına olanak sağlamaktadır. Kan lekesi herhangi bir kimyasal kullanılmadığında belirli dalga boylarında floresans özellik göstermekte, fakat daha koyu görünmektedir. Geniş bir dalga boyu aralığında (300-900 nm) yüksek bir absorpsiyon değerine sahiptir. Bu UV ışık, görülebilir ve IR ışığın tümünü kapsamaktadır. ALS, özellikle karanlık yüzeylerde kontrastı artırarak kanın görünür olmasını sağlamaktadır. Absorpsiyonun en yüksek olduğu aralık 395-435 nm, en yüksek noktası ise hemoglobin nedeni ile 415 nm'dir. Bu yöntem sayesinde, boya ile kaplı olan kan lekelerini bile saptamak mümkündür. Ancak, bazı dalga boyları örnekteki DNA kanıtına zarar verme riski taşıdığından, ışık kaynakları çok dikkatli kullanılmalıdır. Yapılan bir çalışmada, 30 saniye ya da daha fazla süre 255 nm dalga boyundaki ışığa maruziyet sonunda, biyolojik örnekten yeterli DNA'nın elde edilemediği bildirilmiştir.²¹ Diğer bir deneysel çalışmada, UV ışığa 5 güne kadar maruziyet sonunda restriksiyon parça uzunluk polimorfizm paternlerinin zayıfladığı öne sürülmüş, ancak araştırmada kullanılan dalga boyu belirtilmemiştir.²²

SEMEN

Mikroskobik yöntemler içinde sperm tespiti için geçmişte kullanılan en bilinen test Barberio testidir. Bu yöntemde meni pikrik asidin sulu solüsyonuna maruz kaldığında mikroskopta sarı kristaller görülmektedir. Bu testin floresans yöntemlere nazaran daha güvenilir olduğu düşünülmektedir.⁹

Meni için kullanılan diğer tarama testi, şüpheli lekenin mikroskopta incelenmesi temeline dayanan kolin testidir. Fakat rutin analizlerde düşük hassasiyeti ve yanlış negatiflik olasılığından dolayı kullanımını sınırlıdır.²³ Kolin saptanması için ilave metot kolin oksidazın reaksiyonunu temel alan, kemilüminesans testidir.^{24,25}

Meni incelemesi için kullanılan ve temeli immünolojik reaksiyona dayanan tarama testlerinden en önemlisi AP testidir. Bu enzim organik fosfatların hidrolizini katalizleme yeteneğine sahiptir, sodyum alfa naftil fosfattan fosfat grubunu ayırmakta ve böylece bir renk değişikliği meydana gelmektedir.²⁶ AP testinin dezavantajı; ısı, nem, çürüme ya da kimyasallara maruziyet sebebiyle enzimin degrade olabilmesidir.²⁷ Meni incelemesinde kullanılan diğer immünolojik temelli tarama testi, AP testi ile karşılaştırıldığında daha az popüler olan lösin aminopeptidazdır. Bu yöntemde yanlış pozitif sonuç görülme ihtimali daha yüksektir.

Taramalı elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak X-ışını mikroanalizi ile sodyum, potasyum, sülfür, klor ve kalsiyum ile diğer eser elementlerin saptanması mümkündür. Bu elementler, farklı vücut sıvılarında çeşitli oranlarda bulunmaktadır ve bilinmeyen bir lekenin element oranı, onu diğer sıvılardan ayırabilmektedir. Klor, meni örneklerinde saptanan en büyük piktir. Fakat kalsiyum da bir identifikasyon markırı olarak kullanılabilir.²⁸ Bu teknikler, substrat interferansı sebebiyle ihtimali testler olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Kan gibi semen de ALS sistemleri ile saptanabilmektedir. Olay yerinde meni ve diğer vücut sıvılarının aranmasında bu basit ve yıkıcı olmayan metodun kullanımı rutin bir prosedürdür.¹⁶ Kuru meni lekesi çok güçlü fotolüminesans etki göstermektedir. Meni belirli bir dalga boyunu absorbe etmekte ve daha uzun bir dalga boyu olarak yaymaktadır. 300-480 nm'de emilen ışık, 400-700 nm'de geri yayılıma uğramaktadır. Spesifik emilim ışığıyla beraber gerekli gözlük veya filtre kullanıldığında meni izleri net bir şekilde fotolüminesans etkisi nedeni ile görülebilmektedir. Gözlük veya filtreler, görüşü engelleyen güçlü emilim ışığının dalga boyunu bloke ederek net görüş sağlamak içindir. Semen en iyi floresans etkisinin 420-450

nm arasında, turuncu filtre ile sağlandığı bildirilmiştir.²⁹ Bazı klinik uygulamalarda da kullanılan Wood lambası (WL), yaklaşık 320-400 nm dalga boyu aralığında ışık veren basit, ucuz, güvenilir ve kullanımı kolay bir araçtır. Ancak, WL diğer sıvılara karşı test edildiğinde, çok spesifik değildir ve bazen meni lekelerini saptayamayabilmektedir. Ayrıca merhemler ve kremlerle yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir.³⁰ Diğer ticari ALS olan Bluemaxx BM500 lekeyi benzer bir yol ile test etmekte ve meni lekesini oldukça yüksek bir hassasiyetle belirleyebilmektedir.³¹

TÜKÜRÜK

Tükürük için en popüler ve çoğunlukla kabul gören ihtimali testler amilaz aktivitesini temel almaktadır. Amilazın insan vücudunda iki farklı formu bulunur. Tükürükte, göğüs sütünde ve terde bulunan amilaz, 1 no.lu kromozomdaki AMY1 lokusu tarafından kodlanır iken; pankreas, meni ve vajinal sekresyonda AMY2 lokusu tarafından kodlanmaktadır.^{16,26} AMY1 tükürükte diğer vücut sıvılarından daha fazla olmasına rağmen, tükürük için spesifik olmaması sebebiyle ihtimali test kategorisinde yer almaktadır.²⁶ Tükürük identifikasyonunda en yaygın kullanılan test Phadebas'tir ve muhtemel tükürük leke alanının saptanması için adli bilimlerde kullanılan bir tarama testidir. Test, tükürükte mevcut bir sindirim bileşeni olan enzim amilazına tepki verecek şekilde tasarlanmıştır.^{32,33} İdrardaki amilazı saptamak için kullanılan ticari test stribi Rapignost-Amilaz, tükürük örneklerinde de kullanılabilir.¹ Bu metot basittir ve reaksiyon süresi olarak sadece 30 dk yeterlidir.³⁴

Tükürük analizi için kullanılan immünolojik metotlar, geniş bir kullanım alanına sahip değildir. Monoklonal antikorlarla kombine olarak kullanılan horseradish peroksidaz konjugat, bir "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" metodu olarak tükürük lekelerindeki amilaz aktivitesini saptamak için kullanılmaktadır.³⁵

Tükürük tespitinde mikroskobik yöntemler de kullanılabilir. SEM-EDX ile şüpheli meni örneklerindeki sodyum, potasyum, fosfor, sülfür, kalsiyum gibi diğer eser elementler saptanarak tükürük tespit edilebilmektedir.

Kuru salya neredeyse renksizdir ve çıplak gözle saptanması zordur. Vandenberg ve ark. tarafından, Polilight ışık kaynağı kullanılarak çıplak gözle görülemeyen tükürük lekelerinin yerinin saptanabileceği gösterilmiştir.³⁶ Araştırmacılar, genel olarak Polilight sisteminin nispeten güvenli, basit, noninvaziv, zararsız ve adli çalışmalarda kullanmak için uygun bir teknik olduğunu ileri sürmüşlerdir. Tükürük lekeleri semene göre daha düşük yoğunlukta floresans etkisi göstermektedir. UV ışığı altında mavimsi beyaz renkte görünmekle beraber diğer lekelerden ayırt edilemez.⁹ En iyi görüntü 450 nm'de turuncu gözlük/filtre ya da 555 nm girişim filtresi ile elde edilmektedir. Tükürük örnekleri katı partiküllerin yokluğu sebebiyle meni örneklerinden daha zor ayırlmaktadır.²⁷

DOĞRULAMA (CONFIRMATORY) TESTLERİ

Doğrulama testleri biyolojik materyalin orijinini belirlemede kullanılan tek veya kombine metotlar olarak uygulanabilmektedirler (Tablo 2). Biyolojik materyalin tanımlanması aşamasında örneğe ya da içerdiği bir maddeye spesifik reaksiyon vermektedirler. Yanlış pozitiflik yok denemez; fakat tarama testlerine oranla çok daha düşüktür. Dezavantajı; tarama testlerine göre daha pahalı olması, ilave cihaz gerekebilmesi ve analiz süresinin daha uzun olmasıdır.

KAN

Bilinmeyen bir kan lekesini tanımlama için, tarama testleri ile pozitif bir sonuç elde edildiğinde çeşitli doğrulama testleri uygulanmaktadır. Bu testler; mikroskopik, spektroskopik, immünolojik ve kromatografik metotlar olarak sınıflandırılabilir. Mikroskopik yöntemlerin en basiti, sıvı kanda doğrudan kan hücrelerinin saptanmasıdır. Kırmızı ve beyaz hücrelerin görsel olarak tanımlanması numunenin kan olduğunun kanıtıdır.⁹ Fakat diğer daha popüler konfirmasyon testleri, mikroskopik tekniklerin gelişimi sayesinde hücre tanımlanması ile yer değiştirmiştir.¹⁷ Bu alanda en sık kullanılan yöntem TEM'dir. Çok küçük ya da seyreltilmiş lekeler bile bu metotla saptanabilmektedir.³⁷

Belli kimyasal reaktiflerle muamele edilen kan lekeleri mikroskop altında izlenebilen bir kristal-

lenme reaksiyonu göstermektedirler. Kristallenme testleri için en popüler iki test, Teichman ve Takayama testleri olarak bilinmektedir.^{10,17} Teichman testi, bir halojenür ve glasiyal asetik asit varlığında kurutulmuş bir lekenin ısıtılması suretiyle hematini oluşması temeline dayanmaktadır.^{9,17} Takayama testi ise alkali koşullar altında, piridin ve glukoz varlığında hemokromojen oluşması prensibine dayanmakta ve mikroskop altında somon pembesine benzer kristaller görülmektedir.

İmmünolojik yöntemlerden olan RSID™-Blood (Rapid Stain Identification of Human Blood) testi, eritrosit membranında bulunan insan glikoforin A'sını araştırmak için iki spesifik antikor kullanan testtir. Bu antikorlar strip test analizi kullanılarak şüpheli örnek üzerine uygulanmaktadır. Bu test sonucunda numunenin kesin olarak insan kanı olup olmadığı belirlenebilmektedir. Fakat test uygulandıktan 10 dk sonra değerlendirilmeli ve uygun hacim ve dilüsyonda örnek kullanılmasına dikkat edilmelidir. Ticari olarak satılan immünolojik temelli diğer bir yöntem ABACard HemaTrace testidir. Test stripleri Anti Human Hb antikorlarını içermekte ve insan kanında hemoglobin varlığını ortaya koymaktadır. Bu tür antikorlu stripler şüpheli numune ile muamele edildiğinde, eğer örnek hemoglobin içeriyorsa reaksiyon görülmekte ve stripin sonuç penceresinde pembe renkli bir çizgi pozitif sonuca işaret etmektedir. ABACard testi bazı hayvan kanlarıyla çapraz reaksiyon verebilmesi sebebiyle kanda doğrulama için ilk tercih olarak çoğunlukla RSID™-Blood testi kullanılmaktadır. ELISA tekniği de kanın tanımlanmasında kullanılan diğer bir immünolojik yöntemdir.^{38,35}

Spektroskopik metotların, bir lekedeki kanın varlığının konfirmasyonu için yüksek derecede güvenilir oldukları düşünülmektedir. Hemoglobinin çok farklı türevleri, yaklaşık 400 nm'de güçlü karakteristik bir absorpsiyon bantına sahiptir.¹⁷ Ancak; güneş ışığına maruziyet, ısıtma ya da pas gibi faktörlerden spektral sonuçlar etkilenebilmektedir. Diğer bir spektroskopik metot ise UV ışık ile eksitasyon sonrası hematoporfirin floresansını temel almaktadır. Bu metot özellikle okside metaller üzerindeki 10 yıllık kan lekeleri için başarılı bulunmuştur. En iyi sonuç, kan lekesindeki tuzlu

ekstraktın analizlenmesi ile elde edilmektedir ve burada porfirin bileşiklerinin biyolojik sistemlerde sıklıkla bulunması sebebiyle yanlış pozitiflik olabileceği unutulmamalıdır.⁹ Ayrıca, spektroskopik testlerin kullanımı pratik yöntemler daha çok tercih edildiğinden ötürü sınırlıdır.

Kromatografik metotlar da (kâğıt ve ince tabaka kromatografisi) hemoglobin ve türevlerinin ayırımında kullanılabilen diğer bir tekniktir. Bu tekniğin en önemli dezavantajı, uzun bir ön hazırlık süresi bulunmasıdır.⁹ Bundan dolayı bu testlerin şu an adli laboratuvarlarda rutin kullanımı bulunmamaktadır.

SEMEN

Meni saptanması için en güvenilen ve en çok kullanılan metot, sperm hücrelerinin mikroskopik yöntemle identifikasyonudur. Proteinaz K solüsyonu kullanımı sonrasında epitel hücreleri denatüre olduğundan, bu solüsyondan etkilenmeyen sperm daha fazla görünür hâle gelmektedir.²⁶ Mikroskopik tekniklerin en önemli dezavantajı meni vericisinde doğal nedenler sebebiyle azospermi olduğu durumlarıdır.

Sperm aranan meni örneği için en popüler kimyasal doğrulama yöntemi prostat spesifik antijen (PSA) ya da yaygın kullanılan adıyla P30 testidir. Bu yöntem ile kontamine örneklerde, yıkanmış kumaşlarda ve çürümüş cesetlerde çalışılabilir. Özellikle azospermik erkeklerin meni örneklerinde diğer sperm tespit yöntemleri ile sonuç alınamayan vakalarda pozitif reaksiyon elde edilebilmektedir.

Sperm tespiti için diğer kullanımı olan metotlar; immünoelektroforez, ELISA ve radyolojik olarak işaretli Protein A içeren immunoassay teknikleri ya da membran aspirasyon testi olarak bilinen metotlardır.^{39,40} Son yıllarda antijen-antikor reaksiyonuna dayalı olan çok daha hızlı ve kullanımı kolay olan test kitleri kullanıma sunulmuştur. Bu kitler geleneksel ELISA metotlarına göre daha ucuzdur ve ticari olarak en çok kullanılanları RSID™-Semen ve ABACard test kitleridir.⁴¹ Bu testler 10⁶ kez seyreltilmiş bir menide bile PSA'yı saptayabilmektedir. Fakat, erkek idrar örneklerinde yanlış pozitif sonuçlar verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.⁴²

Meni saptanmasında kullanılabilen diğer izoenzimler g-glutamil transpeptidaz, kreatin fosfokinaz ve çeşitli esterazlardır. Fakat bu metotların, daha popüler olan PSA kadar etkinliği kanıtlanmamıştır.¹⁶

TÜKÜRÜK

Tükürük için doğrulama testi kategorisinde değerlendirilebilecek yöntemler daha çok son yıllardaki çalışmalara dayandığı ve henüz rutin uygulamalara geçmiş metotlar olmadığından, bu konu hakkındaki son gelişmelere bir sonraki bölümde değinilecektir.

TARAMA VE DOĞRULAMA METOTLARI ÜZERİNE YENİ GELİŞMELER VE SON ÇALIŞMALAR

Son yıllarda araştırma konusu olan ve pek çoğu henüz rutin kullanıma girmemiş tekniklerin hemen hemen hepsi konfirmasyon yöntemleri üzerinedir. Bu alanda yapılan son çalışmalarda üç yöntem ön plana çıkmaktadır. Bunlar; floresan spektroskopisi, raman spektroskopisi ve mesajcı ribonükleik asit (mRNA) çalışmalarını temel alan yöntemlerdir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda şüpheli lekenin orijininin belirlenmesi için floresans spektroskopisinin güvenilir ve hassas bir teknik olduğu ileri sürülmektedir.^{43,44} Bu tekniğin uygulanması sırasında biyolojik örnek herhangi bir kimyasal reaktif ile muamele edilmediğinden, reagen hasarı olmaz. Fakat biyolojik örneğin UV ışığa maruziyetinden kaynaklanan fotodegradasyon olasılığı sebebiyle, tekniğin yıkıcı olmama özelliği tartışmalıdır.⁴⁵ İdrardaki lipitler, proteinler, nükleik asitler veya kandaki hem ya da kurumuş meni gibi vücut sıvılarındaki çoğu komponent floresan özellik göstermektedir. Sıvıların her biri bireysel kompozisyonlara sahiptir ve onların kimyasal parmak izi olarak emisyon spektrumunda karakteristik özellikleri bulunmaktadır. Örneğin; 260 nm dalga boyunda kan, meni, tükürük ve idrardaki emisyon spektrumu birbirinden farklıdır. Bu teknik lekeli bir materyaldeki çok büyük bir alanı çok hızlı bir şekilde taraması ve hassas olması sebebiyle idealdir.

Elde edilen örneklerin yaşına bağlı olarak çeşitli biyolojik materyallerin floresan analizinin yapıldığı bir çalışmada, örnekler nemli iken floresanın düşük olduğu gözlenmiştir. Floresanın, örnekler kuruduktan sonra sıvının depolandığı alt tabakadan bağımsız olarak analiz edilen maksimum süreye (60 gün) kadar değişmeden kaldığı bildirilmiştir. Böylece, olay yeri inceleme uzmanlarının bir alternatif ışık kaynağı kullanarak, olay yerindeki biyolojik sıvıları, suç meydana geldikten haftalar sonra bile saptayabileceği söylenebilmektedir.⁴⁶

Raman spektroskopisi, uygulama sırasında biyolojik örneğe zarar vermeyen ve olay yeri incelemesinde örneğin; orijinin belirlenmesi için son yıllarda önerilen biyoanalitik tekniklerden biridir.⁴⁷ Adli bilimlerde çeşitli uygulamalar için değerlendirilmiş ve biyolojik materyallerin identifikasyon analizleri için uygun olarak kabul edilmiştir.^{48,49} Raman spektroskopisi, floresans spektroskopisi ile karşılaştırıldığında, daha düşük bir hassasiyete sahip olmasına rağmen kimyasal ve biyokimyasal olarak çok daha yüksek spesifikliğe ve ayırım gücüne sahip olduğu bulunmuştur.⁵⁰ Bu tekniğin temeli partikül saçma tekniğiyle; katı, sıvı ve gaz örnekler lazer ışınımı gönderilmesi esasına dayanmaktadır. Örnek hazırlama basamağı içermemesi ya da bu basamağın çok kısa olması ve test edilen materyal için pikogram düzeyinde materyalin yeterli olması büyük avantajdır. Her bir farklı vücut sıvısının Raman spektrumu, içerdiği spesifik biyolojik komponentlere bağlı olarak farklı pikler içermektedir.⁵¹ Yöntem üzerinde çalışan araştırmacılar, raman mikrospektroskopisinin kan, semen, tükürük, vajinal sekresyon ve ter gibi vücut sıvılarının ayırımında oldukça başarılı olduğunu, ancak yöntem üzerinde biraz daha çalışılması gerektiğini ifade etmişlerdir.^{45,47} Gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise Raman spektroskopisinin örnek üzerine yıkıcı etki yapmadan insan ve köpek menisini ayırabildiği gösterilmiştir.⁴⁷

Bant üzerindeki kanın mikroskobik parçacıklarını tanımlamada bir araç olarak kullanılan mikrospektrofotometri yöntemi, Raman spektrometrisine benzetilmesine rağmen olumsuz çevresel faktörler tarafından etkilenebilmesi sebebiyle, yaygın olarak kullanılmayan bir yöntemdir. İki

metodun da şüpheli örnekler üzerinde duyarlılık oranları benzerdir.⁴⁸

Orphanou'nun 2015 yılında yaptığı bir çalışmada; insan kanı, tükürük, semen ve vajinal salguları saptamak için zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümü kızılötesi [attenuated total reflection fourier transform infrared (ATR FT-IR)] spektroskopisi uygulamasının kullanılabilirliği araştırılmıştır. Araştırmacı, ATR FT-IR spektroskopisinin benzersiz spektral dokuya dayalı vücut sıvıları arasında tespit ve ayırt etmede başarılı olduğunu ileri sürmüştür. Bu ön çalışma sonuçları, ATR FT-IR spektroskopisinin adli bilimler için hızlı ve güçlü bir uygulama olması nedeni ile, biyolojik delillerin rutin doğrulayıcı taramasında yararlanılacak potansiyele sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır.⁴⁴

Tüm vücut sıvılarının identifikasyonunda dokuya spesifik mRNA yöntemlerinin kullanılabilmesine yönelik son yıllarda sayıları gittikçe artan sayıda bilimsel makale yayımlanmıştır.⁵²⁻⁵⁸ Yöntem üzerinde çalışan araştırmacılar; mRNA'ların dokuya spesifik ekspresyon olmaları, değişik dokulara ait mRNA belirteçlerinin aynı anda çalışabilmesi ve az miktardaki biyolojik örneğin analiz için yeterli olması gibi avantajlarından dolayı yöntemin geleneksel testlere alternatif olabileceğini ileri sürmüşlerdir.⁵⁴⁻⁵⁸ RNA'nın bu formu hücredeki DNA'dan ribozomlara protein bilgisi taşımaktadır. RNA izolatları üzerinde mRNA'nın ekspresyonunu gerçekleştirmek leke kimliğine ilişkin bilgi elde etmeyi sağlamakta ve sonrasında yapılan DNA analizi donörün kimliğini açığa çıkarmaktadır.⁵⁴ Şu ana kadar kan, semen, tükürük, menstrüel kan ve vajinal sekresyon gibi farklı vücut sıvılarının adli amaçlı identifikasyonu için kullanılabilirliğinin test edildiği çok sayıda mRNA belirteci bildirilmiştir.⁵³⁻⁵⁸ Bu yöntemle her bir vücut sıvısı için sadece bir işaretleyici kullanarak kan ve semen tam olarak tanımlanabilmektedir. İki markır kullanarak, tek bir markır ile tam olarak belirlenemeyen tükürük ve vajinal sıvılar saptanabilmektedir. Ayrıca, tek reaksiyonda 4 farklı vücut sıvısını tanımlamak için toplam 10 markır yeterli olabilmektedir. Bu konuda, NanoString nCounter® yöntemi, tek reaksiyonda her bir vücut sıvısını yüksek doğrulukla

tanımlamada gelecek vadeden bir sistem olarak ön plana çıkmaktadır.⁵²

Son yıllarda Avrupa DNA Profili Grubu [European DNA Profiling Group (EDNAP)] bünyesinde, vücut sıvılarının tanımlanması için mRNA spesifik markırları üzerinde ortak çalışmalar gerçekleştirilmeye başlanmıştır.⁵⁹ Bu kapsamda yürütülen çalışmalar sonucunda, EDNAP tarafından kan, semen ve tükürük için spesifik mRNA markırları belirlenmiş ve multipleks sistemler oluşturulmuştur.⁶⁰

Yukarıda bahsedilen metotların birçoğu gelişme aşamasındaki metotlar olmaları sebebiyle, şu an adli amaçlı olarak rutin analizlerde kullanımları oldukça sınırlıdır. Bu metotların adli bilimler laboratuvarlarında rutin uygulamalarda kullanımı için validasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Umut ediyoruz ki bu teknikler yakın zaman içerisinde adli komisyonlar tarafından kabul edilecek ve vücut sıvılarının identifikasyonu için yaygın şekilde kullanılacaktır.

Aşağıdaki bölümde, araştırmacıların vücut sıvılarının identifikasyonu için yukarıdaki yöntemleri de içeren son yıllarda yayımladıkları çalışmalar kısaca anlatılmaktadır.

KAN

Juusola ve Ballantyne tarafından, 2000'li yılların başında RT-PCR metodu, kan içeren farklı vücut sıvılarını identifiye etmek için önerilmiştir.⁵⁷ Sonraki yıllarda araştırmacılar bu tekniklerini geliştirmek için çalışmışlar ve kan için spesifik olan idareci gen (Housekeeper) ile birlikte *ALAS2* ve *SPTB* genlerini saptamak için üçlü bir sistem geliştirmişlerdir.⁴

Diğer bir RT-PCR çalışması Nussbaumer ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada, kandaki RNA markırını alfa lokus 1 (HBA)'in saptanmasına odaklanılmıştır.⁶

Zubakov ve ark. eski kan lekeleri üzerinde stabil RNA işaretleyicilerini oluşturmak için tam genom gen ekspresyonunun kapsamlı olarak analizini gerçekleştirmişlerdir. Kan için başlangıçta yaklaşık 1.000 olası markır seçildikten sonra, onların GNF SymAtlas'la karşılaştırılmasıyla seçenekler artırılmıştır. Gen markırları, kanda yüksek ekspres-

yon ve diğer sıvılarda düşük ekspresyon temel alınarak belirlenmiştir. Sonuçta, bunlardan dokuzu bu parametreler baz alınarak seçilmiş ve 180 güne kadar eski lekelerde pozitif sonuçlar alındığı bildirilmiştir.⁵⁸

Son yıllarda, insan kanının konfirmasyonu için yeni bir teknik daha geliştirilmiştir. Bu yöntem, kanda spesifik sialoglikoprotein saptayan ilk testtir ve test diğer benzer metotlarda karşılaşılan Hook etkisi gibi, yüksek dozdan kaynaklanan problemlerin üstesinden gelmeyi amaçlamaktadır. Bu teknikteki esas teori, insan kanını bağlamak için bir antikor kullanılmasıdır.⁶¹

Şüpheli kanın identifikasyonu için tamamen farklı bir yöntem de Trombka tarafından geliştirilmiştir.⁶² Bu metodda elementel analiz için geliştirilmiş taşınabilir bir X-ray floresans (XRF) cihazı kullanılmaktadır. Cihazın, hemoglobindeki demir varlığını saptayabilmesi ve cihazın taşınabilir olması sebebiyle, olay yerindeki araştırmalar için değerli veriler sunacağı öne sürülmüştür. Bilinen diğer tekniklerle karşılaştırıldığında yıkıcı olmayan bir tekniktir ve örneğin; DNA yapısının korunmasında çok yardımcıdır.

Kan için kullanılan ve yıkıcı olmayan diğer bir tarama testi Chun-Yen Lin tarafından geliştirilmiştir.⁶³ Bu teknikte gizli ve eser miktardaki kanı identifiye etmek için IR kullanılmıştır. Bu teknik, UV ışık içeren diğer tekniklere benzerdir. Siyah kumaş üzerindeki 1-8 oranında sulandırılmış kan lekelerinin IR ışık altında saptanabildiği bildirilmiştir. Bu teknik diğer testlere oranla daha hassas olmasına rağmen, bazı kumaş türlerinde kullanılamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Daha önceki bölümlerde de bahsettiğimiz gibi, luminol ve floresan yaygın olarak olay yerinde görünmeyen kanı ortaya çıkarmak için tarama testlerinde kullanılan kimyasallardır. Yeni bir kimyasal olan BlueStar aynı amaç için kullanılabilir. Daha önceki araştırmalar göstermiştir ki; luminol ve floresan, kısa ardışık tekrar [short tandem repeat (STR)] analizine engel olmamaktadır. 2015 yılında Jakovich tarafından, DNA analizlerine BlueStar etkisinin olup olmadığını göstermek için bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada, kan lekeli halılara

luminol, floresan ve BlueStar püskürtülmüş ve daha sonra örnekler swab yöntemi ile toplanmış olup, örnekler üzerinde STR analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir halıdan alınan swablardan çalışılan 13 STR lokusundaki tüm profiller elde edilmiş ve bu da BlueStar'ın, luminol ve floresan gibi STR analizini engellemediği gösterilmiştir.⁶⁴

Potansiyel kan lekesi tespiti için luminol duyarlılığının Polilight yöntemine göre daha fazla olduğu bilinmektedir. Fakat Vandenberg ve ark. tarafından, kan lekesinin boya ile kapanmış olabileceği gibi durumlarda Polilight tekniğinin daha başarılı olduğu bildirilmiştir.³⁶

SEMEN

Semen tespiti için ortaya konulan yeni metotların çoğunluğu, kanda olduğu gibi mRNA temellidir. Adli bilimlerde RNA'nın kullanılması ile ilgili Bauer'in derlemesi, meninin saptanması ile ilgili metotları da ayrıntılı olarak içermektedir.⁵³ Bu yöntem kapsamında, Alvarez tarafından tanımlanan izolasyon metotları meni örnekleri için de kullanılabilir. ^{45,54}

Protamin 1 (PRM1) ve Protamin 2 (PRM2) semene spesifik markırlardır.⁵⁴ Juusola ve Ballantyne tarafından, şüpheli kan örneklerinin saptanması için önerilen revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu [reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)] metodu, bu araştırmacılar tarafından meni örneklerine de uygulanmıştır. Bu yöntem meniye spesifik gen PRM1 ve PRM2'nin saptanması esasına dayanmaktadır.⁵⁷ Aynı teknik için araştırmacılar sonraki yıllarda patent geliştirmişlerdir.⁵⁶ Bu yöntemde meni örnekleri için duyarlılık, vücut sıvıları arasında en yüksek olanıdır ve pozitif sonuçlar için ihtiyaç duyulan RNA 200 pg'dan daha azdır.

Nussbaumer tarafından, şüpheli semen lekelerindeki kallikrein 3 (KLK 3) markırı üzerine odaklanılan RT-PCR metodu geliştirilmiştir.⁶ Araştırmacı; yöntemin kan, vajinal sekresyon, tükürük gibi diğer vücut sıvılarıyla çapraz reaksiyon göstermediğini ileri sürmüştür.

Pang ve Cheung ise iki yeni ticari hızlı leke identifikasyon yöntemi olan RSID-semen testi ile

ABAcad testi karşılaştırmışlardır. RSID-semen testi, monoklonal anti-insan semenogelin (Sg) antikorunu kullanarak Sg saptanmasını temel almaktadır. Her iki test de aynı immünokromatografik membran tekniği temellidir. Araştırmacılar RSID-semen testi, 1:100.000 dilüsyonlu meni örneğinde Sg saptanmasında daha hassas bulmuşlar ve testin diğer vücut sıvıları ile karşılaştırıldığında yanlış pozitiflik göstermediğini bildirmişlerdir.⁶⁵

Trombka ve ark., kanda olduğu gibi meni identifikasyonunda da tarama testleri için yıkıcı olmayan bir metot geliştirmişlerdir. Yöntem bir NASA teknolojisi olan ve olay yerinde de kullanılabilen taşınabilir XRF cihazı ile meni örneğindeki çinko seviyesi saptanması temeline dayanmaktadır.⁶²

TÜKÜRÜK

Kan ve meni için kullanılan metotların çoğu tükürük için de kullanılabilir. Alvarez tarafından, tükürük örneklerindeki bazı markırlar için DNA ve mRNA izolasyon metotları tanımlanmıştır.⁵⁴

Juusola ve Ballantyne tarafından, kan ve semen tespitinde olduğu gibi tükürük için de RT-PCR metodu önerilmiştir. Bu yöntemde tükürük için spesifik gen olan statherin ve HTN3 tespiti temel alınmıştır. Araştırmacılar tarafından, ilerleyen süreçte teknik için patent geliştirilmiştir.⁵⁶

2008 yılında Zubakov, stabil RNA markırlarını oluşturmak için eski tükürük lekelerindeki tam genom gen ekspresyonunu gerçekleştirmiştir. Başlangıçta, tükürük için yaklaşık 500 markır seçildikten sonra, onların GNF SymAtlas doku bankası ile karşılaştırılması ile opsiyonel olarak genişletilmiştir. Gen markırları olarak kanda yüksek ekspresyon ve diğer vücut sıvılarında düşük ekspresyon gösterenler seçilmiştir. Sonunda bu parametreler temel alınarak 5 tanesi seçildikten sonra, 180 güne kadar eski lekelerden pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir.⁵⁸

Quarino tarafından, tükürük lekelerini saptamak için monoklonal anti-insan tükürük amilaz antikorunun kullanımıyla bir ELISA metodu geliştirilmiştir.⁶⁶ Tükürük amilazı 405 nm'deki absorp-

siyonu ile örnekten kantitatif olarak saptanabilen ve burada absorpsiyon ve amilaz aktivitesi arasında direkt ilişki bulunmaktadır. Sonuçlara göre; tükürük örneklerinin %100'ü ve diğer vücut sıvılarının ancak %13'ü absorpsiyon göstermiştir.

Karl Reich ve ark. tarafından, tükürük varlığının kofirmasyonu için hızlı, doğru ve yüksek hassasiyetli bir metot olarak lateral akış test sribi geliştirilmiştir. Bu teknikte, monoklonal ya da poliklonal olabilen insan tükürük amilazına karşı 9 antikor kullanılmıştır. Bu test türe spesifiktir ve çok farklı örnek tiplerine uygulanabilmektedir. Test sribi immünokromatografik yapıdadır ve bukkal swaplardan, plastik şişelerden, plastik ve seramik fincanlardan, soda kutularından pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, dışkı ve göğüs sütü ile çapraz reaksiyon oluşturduğu bildirilmiştir.⁶⁷

Diğer bir çalışmada SaligAE¹ testi, immünokromatografik RSIDTM-Saliva testi ve Phadebas¹ testi karşılaştırılmıştır.⁶⁸ RSIDTM-Saliva ile 1:10.000, SALigAE¹ testi ile 1:2.000 ve Phadebas¹ testi ile 1:100'e kadar dilüe edilen örneklerde tükürüğün saptanabilmesi bildirilmiştir.⁶⁸ Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada ise SALigAE testinin Phadebas testinden daha duyarlı olduğu ve tükürük için alternatif bir kolorimetrik test olduğu bildirilmiştir.⁴⁸

SONUÇ

Bu çalışmada, vücut sıvılarının tanımlanmasında mevcut geleneksel biyoanalitik yöntemler ile son 10 yıl içinde adli bilimlerdeki yeni gelişmeler ve yönelimler ışığında geliştirilen yeni metotlar özetlenmiştir. Böylelikle, mevcut her bir metodun avantajları ve dezavantajları değerlendirilmiştir. Vücut sıvılarının tanımlanmasında dokuya spesifik mRNA'ların kullanılabilmesine yönelik gerçekleştirilen son 10 yıl içindeki çalışmaların bulguları ol-

dukça umut vericidir. Aynı şekilde, olay yerinde eser miktarda bulunan vücut sıvılarının hızlı bir şekilde ve bozulmaya uğramadan, yeni biyospektroskopik metotların kullanımı ile analizi de makalede tartışılmaktadır. Fakat, yeni biyospektroskopik teknikler ve mRNA temelli geliştirilen teknikler hâlâ gelişmektedir ve henüz yeterli düzeye gelmemiştir. Yıllar içerisinde bu tekniklerin daha da geliştirileceği ve adli laboratuvarlar tarafından kabul göreceği düşünülmektedir. Özellikle yeni biyospektroskopik yöntemler kullanılarak geliştirilen teknikler sayesinde, olay yerinde basit ve otomatik cihazlar ile hızlı sonuçlar alınması mümkün olacaktır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı, Nurdan Sezgin; **Tasarım:** Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı; **Denetleme/Danışmanlık:** Beytullah Karadayı; **Analiz ve/veya Yorum:** Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı, Nurdan Sezgin; **Kaynak Taraması:** Beytullah Karadayı, Nurdan Sezgin; **Makalenin Yazımı:** Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı, Nurdan Sezgin; **Eleştirel İnceleme:** Beytullah Karadayı; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Beytullah Karadayı, Şükriye Karadayı.

KAYNAKLAR

- Weber K. [The use of chemiluminescence of luminol in forensic medicine and toxicology. I. identification of blood stains]. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 1966;57(3):410-23.
- 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.
- Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci* 2001;46(2):349-51.
- Juusola J, Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci* 2007;52(6):1252-62.
- Haas C, Klessner B, Maake C, Bär W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and real-time PCR. *Forensic Sci Int Genet* 2009;3(2):80-8.
- Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschinek I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Sci Int* 2006;157(2-3):181-6.
- Best MA. Statistical presentation of forensic data. In: Rapley R, Whitehouse D, eds. *Molecular Forensics*. 1st ed. England: John Wiley & Sons Ltd West Sussex; 2007. p.185-95.
- Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* 2007;72(3):896-913.
- Gaensslen RE. Sourcebook in Forensic Serology Immunology and Biochemistry. In: Barberio M, eds. *A new Micro-chemical Reaction of the Sperma and its Application in Medico-legal Investigations*. 1st ed. Washington, DC: U.S. Department of Justice; 1983. p.112-3.
- Spalding RP. Identification and characterization of blood and bloodstains. In: James SH, Nordby JJ, eds. *Forensic Science: an Introduction to Scientific and Investigative Techniques*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2003. p.181-201.
- Quinones I, Sheppard D, Harbison S, Elliot D. Comparative analysis of luminol formulations. *Can Soc Forensic Sci J* 2006;40(2):53-63.
- Łuczak S, Woźniak M, Papuga M, Stopińska K, Sliwka K. [A comparison of the Bluestar and luminol effectiveness in bloodstain detection]. *Arch Med Sadowej Kryminol* 2006;56(4):239-45.
- Castelló A, Alvarez M, Verdú F. Accuracy, reliability, and safety of luminol in bloodstain investigation. *Can Soc Forensic Sci J* 2002;35(3):113-21.
- Li R. *Forensic Biology: Identification and DNA Analysis of Biological Evidence*. Identification of Blood. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. p.237.
- Blum LJ, Esperanca P, Rocquefelle S. A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. *Can Soc Forensic Sci J* 2006;39(3):81-100.
- Sensabaugh GF. Isozymes in forensic science. In: Rattazzi MC, Scandalios JG, Whitt GS, eds. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*. 1st ed. New York: Alan R Liss Inc; 1982. p.247-60.
- Shaler RC. Modern forensic biology. In: Saferstein R, ed. *Forensic Science Handbook*. 2nd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 2002. p.529-46.
- Tobe SS, Watson N, Daéid NN. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci* 2007;52(1):102-9.
- Johnston E, Ames CE, Dagnall KE, Foster J, Daniel BE. Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI. *J Forensic Sci* 2008;53(3):687-9.
- Watson N. The analysis of body fluids. *Crime Scene to Court: The Essentials of Forensic Science*. 2nd ed. Cambridge, UK: Royal Society of Chemist; 2004. p.377-413.
- Andersen J, Bramble S. The effects of fingerprint enhancement light sources on subsequent PCR-STR DNA analysis of fresh bloodstains. *J Forensic Sci* 1997;42(2):303-6.
- McNally L, Shaler RC, Baird M, Balazs I, De Forest P, Kobilinsky L. Evaluation of deoxyribonucleic acid (DNA) isolated from human bloodstains exposed to ultraviolet light, heat, humidity, and soil contamination. *J Forensic Sci* 1989;34(5):1059-69.
- Noppinger K, Morrison R, Jones NH, Hopkins H 2nd. An evaluation of an enzymatic choline determination for the identification of semen in casework samples. *J Forensic Sci* 1987;32(4):1069-74.
- Suzuki O, Matsumoto T, Oya M, Katsumata Y, Asano M. A new enzymatic method for the demonstration of choline in human seminal stains. *J Forensic Sci* 1981;26(2):410-5.
- Manabe F, Tsutsumi A, Yamamoto Y, Hashimoto Y, Ishizu H. The identification of human semen by a chemiluminescent assay of choline. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1991;45(3):205-15.
- Greenfield A, Sloan MA. Identification of biological fluids and stains. In: James SH, Nordby JJ, eds. *Forensic Science: an Introduction to Scientific and Investigative Tech-*
- niques. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2003. p.203-20.
- Jones Jr EL. The identification of semen and other body fluids. In: Saferstein R, ed. *Forensic Science Handbook*. 2nd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 2005. p.329-82.
- Seta S. Application of scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray microanalysis to the criminal identification of body fluid stains. *Int Crim Police Rev* 1997; Issue 307:119-23.
- Chuen LW, Ee KB. Forensic light sources for detection of biological evidences in crime scene investigation: a review. *Malays J Forensic Sci* 2010;1(1):17-28.
- Santucci KA, Nelson DG, McQuillen KK, Duffy SJ, Linakis JG. Wood's lamp utility in the identification of semen. *Pediatrics* 1999;104(6):1342-4.
- Nelson DG, Santucci KA. An alternate light source to detect semen. *Acad Emerg Med* 2002;9(10):1045-8.
- Mullen C. Amylase: phadebas test, saliva. In: Jamieson A, Moenssens A, eds. *Wiley Encyclopedia of Forensic Science*. 1st ed. England: John Wiley & Sons Ltd. 2009.
- Roda N, Lee SB, Barloewen B, Mehmet T. DNA typing compatibility with a One Step Saliva Screening Test. *Themis: Research Journal of Justice Studies and Foren Sci* 2014;2(1):223-35.
- Tröger HD, Schuck M, Tutsch-Bauer E. [Detection of saliva traces using test strips]. *Forensic Sci Int* 1984;25(2):143-6.
- Komuro T, Mukoyama R, Mukoyama H. [Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to the medico-legal identification]. *Nihon Rinsho* 1995;53(9):2322-9.
- Vandenberg N, van Oorschot RA. 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(2):361-70.
- Dixon TR, Samudra AV, Stewart WD Jr, Johari O. A scanning electron microscope study of dried blood. *J Forensic Sci* 1976;21(4):797-803.
- Kashyap VK. A simple immunosorbent assay for detection of human blood. *J Immunoassay* 1989;10(4):315-24.
- Rao DV, Kashyap VK. Dot blot immunoassay for detection of human semen. *J Immunoassay* 1992;13(4):537-44.
- Matsuzawa S, Itoh Y, Kimura H, Kobayashi R, Nakagawa T, Ohno S. Rapid detection of human seminal plasma proteins by membrane aspiration test (MAT). *Forensic Sci Int* 1994;64(2-3):119-24.

41. Maher J, Vintiner S, Elliot D, Melia L. Evaluation of the BioSign PSA membrane test for the identification of semen stains in forensic casework. *N Z Med J* 2002;115(1147):48-9.
42. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, Gehrig C, Borer U, Thali M, et al. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *J Forensic Sci* 1999;44(5):1057-60.
43. Zapata F, Ossa AF, Garcia-Ruiz C. Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *TeAC Trends in Analytical Chemistry* 2015;64(1):53-63.
44. Orphanou CM, Walton-Williams L, Mountain H, Cassella J. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Sci Int* 2015;252:e10-6.
45. Williams E, Lin MH, Harbison S, Fleming R. The development of a method of suspension RNA-FISH for forensically relevant epithelial cells using LNA probes. *Forensic Sci Int Genet* 2014;(9):85-92.
46. Miranda GE, Prado FB, Delwing F, Daruge E Jr. Analysis of the fluorescence of body fluids on different surfaces and times. *Sci Justice* 2014;54(6):427-31.
47. Virkler K, Lednev IK. Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids. *Forensic Sci Int* 2008;181(1-3):e1-5.
48. Harbison SA, Fleming RI. Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science* 2016;6:11-23.
49. Zapata F, Gregório I, García-Ruiz C. Body fluids and spectroscopic techniques in forensics: a perfect match? *J Foren Med* 2015;1(1):1-7.
50. Sikirzhyskaya A, Sikirzhyski V, McLaughlin G, Lednev IK. Forensic identification of blood in the presence of contaminations using Raman microspectroscopy coupled with advanced statistics: effect of sand, dust, and soil. *J Forensic Sci* 2013;58(5):1141-8.
51. Grasselli JG, Snavely MK, Bulkin BJ. *Chemical Applications of Raman Spectroscopy*. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; 1981. p.198.
52. Park JL, Park SM, Kim JH, Lee HC, Lee SH, Woo KM, et al. Forensic body fluid identification by analysis of multiple RNA markers using NanoString technology. *Genomics Inform* 2013;11(4):277-81.
53. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(1):69-74.
54. Alvarez M, Juusola J, Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem* 2004;335(2):289-98.
55. Juusola J, Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int* 2003;135(2):85-96.
56. Ballantyne J, Juusola J. Messenger RNA Profiling: Body Fluid Identification using Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). USA: Research Foundation of The University of Central Florida Inc; 2007;52(6):1252-62.
57. Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int* 2005;152(1):1-12.
58. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med* 2008;122(2):135-42.
59. Haas C, Hanson E, Bär W, Banemann R, Bento AM, Berti A, et al. mRNA profiling for the identification of blood-results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5(1):21-6.
60. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Banemann R, Berti A, Borges E, et al. RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains--results of a third collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* 2013;7(2):230-9.
61. 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(3):243-7.
62. Trombka JI, Schweitzer J, Selavka C, Dale M, Gahn N, Floyd S, et al. Crime scene investigations using portable, non-destructive space exploration technology. *Forensic Sci Int* 2002;129(1):1-9.
63. Lin AC, Hsieh HM, Tsai LC, Linacre A, Lee JC. Forensic applications of infrared imaging for the detection and recording of latent evidence. *J Forensic Sci* 2007;52(5):1148-50.
64. Jakovich CJ. STR analysis following latent blood detection by luminol, fluorescein, and BlueStar. *Journal of Forensic Identification* 2015;65(4):693-8.
65. 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.
66. Quarino L, Dang Q, Hartmann J, Moynihan N. An ELISA method for the identification of salivary amylase. *J Forensic Sci* 2005;50(4):873-6.
67. Old JB, Schweers BA, Boonlayangoor PW, Reich KA. Developmental Validation of RSID™-Saliva: A Lateral Flow Immunochromatographic Strip Test for the Forensic Detection of Saliva. *J Forensic Sci* 2009;54(4):866-73.
68. Pang BC, Cheung BK. Applicability of two commercially available kits for forensic identification of saliva stains. *J Forensic Sci* 2008;53(5):1117-22.