

# Ultraviyole Işınları ve Çeşitli Sıcaklık Koşullarının Zamana Bağlı Olarak Kan Lekelerinden ABO Grup Tayinine Etkileri

THE EFFECTS OF UV RAYS AND DIFFERENT THERMAL CONDITIONS ON ABO GROUPING FROM BLOOD STAINS RELATIVE TO TIME

Dr. Zerrin ERKOL,<sup>a</sup> Dr. Lale DÖNBAK,<sup>b</sup> Ayşe ALTUN,<sup>c</sup> Hüsniye DAĞ,<sup>c</sup>  
Dr. Behnan ALPER,<sup>c</sup> Dr. Serpil SALAÇIN<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Adli Tıp AD, Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi, BOLU

<sup>b</sup>Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, KAHRAMANMARAŞ

<sup>c</sup>Adli Tıp AD, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, ADANA

<sup>d</sup>Adli Tıp AD, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İZMİR

## Özet

Bu çalışmada, ultraviyole ışınları ve çeşitli sıcaklık koşullarının zamana bağlı olarak kan lekelerinde ABH antijenlerinin gösterilebilirliğine etkisi araştırılmıştır.

Çalışma toplam 55 kan örneği ile gerçekleştirilmiştir. Gönüllü vericilerden alınan taze kan örneklerinin her birinden dört ayrı gazlı bez üzerinde kan lekeleri oluşturulmuş ve oda ısısında kuruması sağlandıktan sonra lekeler kağıt zarflar içine konarak buzdolabı koşulları (+4°C), oda ısısı (+22°C) ve etüvde (+37°C) 1 yıl, güneş ışığında bir hafta bekletilmiştir. Taze kan örneklerinde ABO grupları mikropate yöntemiyle, kan lekelerinde ise absorpsiyon-elüsyon yöntemiyle mikropatelere çalışılmıştır.

+4°C, +22°C ve +37°C'de bekletilen 1 yıllık kan lekelerinin ABO kan grupları doğru olarak saptanabilmiş, en iyi aglutinasyonlar +4°C ve +22°C'de bekletilen lekelerden elde edilmiştir. Güneş ışığında 1 hafta bekletilen kan lekelerinde zamana bağlı olarak A, B ve H antijenik aktivitelerinde bir azalma olduğu, ancak bu oranın H antijenik aktivitesinde daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Ultraviyole ışınları ve yüksek sıcaklığın zamana bağlı olarak kan lekelerinde ABH antijenik aktivitesine, özellikle H antijenik aktivitesine olumsuz etki yaptığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Kan lekeleri, ABO gruplaması, absorpsiyon-elüsyon yöntemi, kimliklendirme

## Abstract

In this study the time depending effects of ultraviolet light and various temperatures upon ABO grouping of blood stains were investigated.

Study performed by using 55 blood samples. Blood stains were prepared from fresh blood samples taken from volunteer donors a to four different cotton cloths. Air-dried blood stains were placed in envelopes and stored at (+4 C), room temperature (+22 C) and etuve (+37 C) for one year and at sun light for one week. ABO grouping of fresh blood samples were studied by microplate method. ABO groups of blood stain samples were determined by absorbtion-elution method in microplates.

ABO groups of blood stains stored at +4 C, +22 C and +37 C for one year were determined correctly. The best results obtained from the blood stains stored at +4 C and +22 C. In blood stains stored at sun light for one week, time depending effect of ultraviolet light upon antigenic activities of diminishing was especially on H antigenic activity.

In this study, it was seen that ultraviolet light and high temperature have negative effect on ABH antigenic activities especially on H antigenic activity.

**Key Words:** Blood stains, ABO grouping, absorbtion-elution method, individualization

Türkiye Klinikleri J Foren Med 2005, 2:48-52

**E**ritrosit antijenleri adli amaçlı olarak paternite araştırmaları ve biyolojik materyaller ile bunlara ait leke ve artıkların kimliklendirilmesinde uygulama alanı bulmuştur.<sup>1-6</sup>

Geliş Tarihi/Received: 31.12.2004 Kabul Tarihi/Accepted: 17.05.2005

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Zerrin ERKOL  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi, İzzet Baysal Tıp Fakültesi,  
Adli Tıp AD, Gököy, BOLU  
zerrinerkol@yahoo.com  
zerrinerkol@hotmail.com

Copyright © 2005 by Türkiye Klinikleri

Kan lekelerinden kan gruplarının saptanmasında absorpsiyon-inhibisyon, absorpsiyon-elüsyon ve mixed-aglutinasyon gibi klasik aglutinasyon yöntemlerinin yanısıra son zamanlarda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), elektroforez ve DNA (Deoxyribonucleic Acid) teknolojisinden yararlanılarak da lekelerden kan grubu antijenlerinin ayırt edilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.<sup>7-12</sup> Ancak maliyetlerinin yüksek olmasının yanı sıra bu konuda uzmanlaşmış

kişilere gereksinim duyulması nedeniyle, bu ileri teknolojik yöntemlerin yaygın olarak kullanımları sınırlı kalmaktadır.

Absorbsiyon-elusyon yöntemi, lekede kan gruplaması amacıyla kullanılan diğer klasik yöntemlere göre daha hassas olması ve az miktarlardaki eski materyallerden gruplamaya olanak tanınması nedeniyle adli seroloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>1,2,6</sup>

Bu çalışmada; biri münferit araştırma olarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda (Ç.Ü.T.F. Adli Tıp AD) gerçekleştirilen, diğeri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı (G.Ü.T.F. Adli Tıp AD) ile ortak proje olarak yürütülen iki ayrı projenin çalışma sonuçları sunulmuştur. Münferit araştırma pilot çalışma olarak yürütülmüş ve Ç.Ü.T.F. Adli Tıp AD laboratuvarında kan lekelerinden ABO gruplaması için tüp test absorbsiyon-elusyon yönteminin oturtulması ve bu yöntemle 1 yıllık kan lekelerinde ABH antijenlerinin gösterilebilirliğinin ortaya konulması amacıyla planlanmıştır. Ortak proje kapsamında ise; ultraviyole ışınları ve çeşitli sıcaklık koşullarının (+4°C, +22°C ve +37°C) zamana bağlı olarak kan lekelerinde ABH antijenlerinin absorbsiyon-elusyon yöntemiyle gösterilebilirliğine etkisi araştırılmıştır.

### Gereç ve Yöntemler

Pilot çalışma, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu'nun TF.95.60 no'lu proje maddi desteği ile gerçekleştirilmiştir. Ortak projede maddi destek Gaziantep Üniversitesi Araştırma Fonu'ndan TF.95.03 no'lu proje desteği ile, makine, teçhizat ve diğer laboratuvar malzemeleri Ç.Ü.T.F. Adli Tıp AD tarafından sağlanmış ve deneysel çalışmalar bu bölümün adli seroloji laboratuvarında yürütülmüştür. Projelere, Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu'nun görüşü alınarak başlanmıştır. Her iki proje kapsamında toplam 55 kan örneği ile çalışılmıştır. Çukurova yöresinde yaşayan her iki cinsiyetten rastgele seçilen gönüllü vericilerden kan almadan önce çalışma ile ilgili bilgilendirilmiş onam formu okutulmuş ve imzalanmıştır.

Pilot çalışmada, 20 kan örneği ile çalışılmıştır. Bireylerden 4'er cc venöz kan örneği alınarak,

2'er cc'si ile steril gazlı bezler üzerinde kan lekeleri oluşturulmuştur. Oda ısısında kurutulan kan lekeleri, deneysel çalışmalar yapılana kadar kağıt zarflar içinde oda ısısında saklanmıştır. Pilot çalışmada taze kanda ve kan lekelerinde ABO gruplaması için Diagast'ın mikroplate kullanımına uygun anti-A (70117T), anti-B(70217X), anti-H (920807) ve anti-AB (50314H) antiserumları kullanılmıştır. Taze kanda ABO grupları, daha önce Ç.Ü.T.F. Adli Tıp AD'da belirlenen çalışma koşullarına uygun olarak mikroplate yöntemiyle saptanmıştır.<sup>13</sup>

Kan lekelerinden ABO grup tayini için; tüp-test absorbsiyon-elusyon yöntemi kullanılmıştır. Yöntem oturtma çalışmaları, 1 günlük kan lekeleri kullanılarak yapılmış ve laboratuvar koşullarına uygun parametreler saptanmıştır.<sup>6</sup> Bu yöntemde; etiketlenmiş tüplere 5x2 mm uzunluğunda lekeli lifler ve gazlı bezin lekesiz kısmından alınan kontrol lifleri konmuştur. Lifler üzerine antiserumlardan 1'er damla damlatılarak absorbsiyon işlemi +4°C'de 17 saat bekletilerek yapılmış, antiserum fazlasının soğuk serum fizyolojik ile yıkanmasını takiben, elusyon işlemi 56°C'de 15 dakika bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Eluatlar ve %0,5'lik indikatör eritrosit süspansiyonlarının reaksiyonları lamalar üzerinde mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Deneysel çalışmalar, her bir kan lekesinde 1. günden başlayarak, 1 haftalık aralıklarla 1 yılın sonuna kadar yürütülmüştür.

Ortak projede, taze kanda ve kan lekelerinde ABO gruplaması için Diagast anti-A (950055), anti-B (950056), anti-H (920807) ve anti-AB (950435) antiserumları kullanılmıştır. Taze kanda ABO grupları antiserumların temin edildiği firma tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek mikroplatelerde çalışılmıştır. Kan lekelerinden ABO grup tayininde pilot çalışmadan farklı olarak

tüp yerine mikroplate kullanılmıştır. +4°C, +22°C ve +37°C'lerde bekletilen kan lekelerinde 1. gün, 1. hafta, 1. ay ve sonrasında 1 aylık aralıklarla 1 yılın sonuna kadar, direkt güneş ışığına bırakılan lekelerde ise; 6 saat, 1 gün ve bir haftalık lekelerde deneyler tekrarlanmıştır.

### Bulgular

Pilot çalışma ve ortak proje kapsamında, taze kanda mikroplate yöntemiyle ABO grup tayini yapılan 55 kan örneğinin ABO fenotipleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Pilot çalışmada, taze kanda ABO grupları saptanmış olan 1 yıllık kan lekelerinde A, B ve H antijenleri doğru olarak gösterilebilmiştir. 1 yıllık lekeler de dahil olmak üzere tüm pozitif reaksiyonlar makroskobik olarak değerlendirilebilecek kadar güçlü izlenmiştir.

Ortak projede, taze kanda ABO grupları saptanmış kan lekelerinde, ABH antijenlerinin 4 ayrı sıcaklık ortamında zamana bağlı olarak gösterilebilirliği mikroplatelerde absorpsiyon-elusyon yöntemi ile araştırılmıştır. 35 kan örneğinden hazırlanan kan lekelerinde +4°C, +22°C ve +37°C'de 1 yıllık bekletme süresinin kan lekelerinden ABO grup tayinine etkisi araştırılırken, bu grup içinde yer alan 15 örnekte ise; 1 hafta direkt güneş ışığına maruz kalmanın etkisi araştırılmıştır.

+4°C, +22°C ve +37°C'de bekletilen 1 yıllık kan lekelerinde ABO grupları doğru olarak saptanabilmiştir. En iyi aglutinasyonlar +4°C ve +22°C'de bekletilen lekelerde elde edilmiştir. 1 yıllık lekelerde zamana bağlı olarak antijenik aktivitede bir miktar azalma görülmekle birlikte, +37°C'de bekletilen lekelerde ABH antijenik aktivitesinin diğer ortamlara oranla daha hızlı azaldığı, en büyük etkinin H antijenik aktivitesine

olduğu gözlenmiştir.

Temmuz ayında direk olarak güneş ışığına (32.2-36.6°C) 1 hafta maruz bırakılan 15 kan lekesinin ABO grupları doğru olarak saptanabilmiştir. Güneş ışığında bekleme süresi arttıkça ABH antijenik aktivitesinde bir azalma olduğu, H antijenik aktivitesinde ise bu oranın daha hızlı olduğu gözlenmiştir.

### Tartışma

Adli seroloji laboratuvarlarına gönderilen materyallerde yapılan çalışmalar; doku parçalarının, biyolojik sıvı ve bunlara ait lekelerin identifikasyonu, tür orjininin saptanması, kimden kaynaklanmış olabileceğinin ortaya konulması (kimliklendirilmesi) ve paternite araştırmaları şeklinde genel olarak gruplandırılabilir.<sup>2,4,7,14</sup>

Kimliklendirme ve paternite araştırmalarında ilk basamakta eritrosit antijenlerinin gösterilmesine yönelik çalışmalar önemini korumaktadır. Günümüzde kan lekelerinden ABO grup tayini için absorpsiyon-elusyon yönteminin çeşitli modifikasyonları kullanılmaktadır. Ayrıca yöntemin hassaslığını arttırmaya yönelik çalışmalar da yapılmaktadır.<sup>15-17</sup> Absorpsiyon-elusyon yönteminde; direkt granül halindeki lekeler ve lifler ile çalışılabilirlikle birlikte, ekstraksiyon ve transfer teknikleri de kullanılabilir.<sup>2,18-21</sup> Yöntemde, absorpsiyon aşamasında, kan lekelerinde bulunan antijenlerin uygun antikorları bağlanması sağlanmakta, elusyon aşamasında ise lekelerdeki antijenlere bağlanmış antikorlar yüksek sıcaklıkta elue edilmektedir. Eluata, uygun indikatör eritrosit süspansiyonlarının ilave edilmesiyle lekedeki antijenlerin varlığı indirekt olarak gösterilmektedir.<sup>22,23</sup>

Ortak projede, absorpsiyon-elusyon yönteminin çok sayıda tüp yerine tek bir mikroplatede yapılması; etiketleme, absorpsiyon, yıkama, elusyon, eluata indikatör hücre ilavesi aşamalarındaki manipülasyonun azalması ve bu aşamalara harcanan sürenin kısılması gibi kolaylıklar sağlamıştır. Lekelerde eritrosit antijenlerinin gösterilmesinde kullanılan yöntemin hassasiyeti ve lekenin yaşı kadar lekenin bulunduğu ortam

**Tablo 1.** Kan örneklerinin ABO fenotipleri.

Fenotip	Örnek sayısı	%
A	24	43,63
B	8	14,54
O	14	25,46
AB	9	16,37
Total	55	100

koşulları da büyük rol oynamaktadır. Mantar, bakteri, toz, deterjanlar, ısı, aşırı nem, lekenin dekompozisyonu lekelerde antijenik aktivitenin kaybolmasına, değişmesine neden olarak yanlış pozitif veya negatif sonuçların elde edilmesine yol açabilmektedir.<sup>24-27</sup>

Olası kontaminasyonlar lekenin bulunduğu çevre koşullarına ek olarak, olay yerinde lekelerin prosedüre uygun örneklenmemesinden de kaynaklanabilmektedir. Biyolojik materyallerin olay yerinde uygun olarak tanımlanması, dökümantasyonu, örneklenmesi, saklanması ve ilgili laboratuvara gönderiliş şekli yapılacak test sonuçlarını etkileyebileceği gibi, açılmış olan davanın yönünü de belirlemesi bakımından önem taşımaktadır. Bu nedenle olay yeri incelemelerinin ve tespit edilen materyallerin bu konuda özel eğitim görmüş kişiler tarafından örneklenmesi gerektiği ve lekenin makroskopik muayenesinin ayrıntılarıyla belirtilmesi gerektiği önemle vurgulanmaktadır.<sup>3,27,28</sup> Çünkü yapılacak deneyler; lekenin bulunduğu ortam koşulları, örnekleme şekli ve örneklenebilen leke miktarına bağlıdır.

Çeşitli araştırmacılar, kontamine olmamış çok eski kan lekelerinde ABH antijenlerinin gösterilebileceğini belirtmektedirler. Ayrıca kan lekelerinde absorpsiyon-elusyon yönteminin çeşitli modifikasyonlarıyla ABH antijenlerinin yanı sıra M, N, S, s, D, C, c, E, e, Cw, K, Fya, Fyb ve Jka antijenlerinin gösterilebileceği bildirilmektedir.<sup>1-3,22,23</sup> Ancak ABH antijenleri dışındaki diğer antijenlerin antijenik uç sayılarının az olması nedeniyle fazla miktarlarda lekeli materyal gerektirmeleri, lekede çok dayanıklı olmamaları ve reaksiyon sonuçlarının net olarak değerlendirilmesindeki güçlük nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır. Biyolojik materyaller olay yerinde çeşitli fiziksel ve kimyasal koşullara maruz kalabilmektedir. Bu nedenle lekeler üzerinde yapılacak çalışmalarda saptanan sonuçlar, ortam koşulları ile birlikte değerlendirildiği takdirde daha sağlıklı olacaktır.<sup>26</sup> değişik sıcaklıklar (20°C, 40°C, 60°C ve 80°C), pH (3.0, 5.0, 7.0, 9.0) ve nemliliğin (%50, %100) zamana bağlı olarak kan lekelerinden ABO grup tayinine etkisi araştırmışlardır. Çalışılan

çevre koşullarının, zamana bağlı olarak lekelerdeki ABH antijenik aktivitesini azalttığı, en büyük etkinin H antijenik aktivitesi üzerine olduğunu bildirmişlerdir.

Ultraviyole ışınları ve çeşitli sıcaklık koşullarının kan lekelerinden ABO grup tayinine etkilerinin araştırıldığı bu çalışma sonucunda; +37°C'de bekletilen 1 yıllık kan lekelerinde ve güneş ışığında 1 hafta bekletilen lekelerde, zamana bağlı olarak H antijenik aktivitesinin diğer antijenlere oranla daha hızlı azaldığı saptanmıştır. H antijenik aktivitesindeki bu hızlı azalmanın H antijeninin yapısal özelliklerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

#### KAYNAKLAR

1. Dood BE. Identification by trace evidence in Champs FE, eds. Gradwhol's legal medicine, 3<sup>rd</sup> ed. Chicago: Jhon Wrigh and Sons Ltd, 1976. p.147-65.
2. Gaensslen RE. Sourcebook in forensic serology, immunology and biochemistry, Washington, US Government Office 1984. p.305-10.
3. Grunbaum BW. Handbook for forensic individualization of human blood and bloodstains, Gottingen, Sartorius GmbH 1981. p.160-76.
4. James SH. The identification and individualization of blood in Eckert WG, James SH, eds. Interpretation of blood stain evidence at crime scenes, London: Elsevier, 1989. p.115-40.
5. Knight B. Blood identification in Tedeshi CG, Eckert WG, Tedeshi LG, eds. Forensic medicine, vol II. London:W.B. Saunders Company, 1977. p.810-7.
6. Saferstein R. Forensic sciences handbook, New Jersey, Simon and Scheuster Company, 1982. p.317.
7. Daniels G. Molecular blood grouping. Vox Sang 2004;87:63-6.
8. Sato M, Higashide K, Katsumata Y. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay used to differentiate type AB specimen from a mixture of type A and type B specimens. Forensic Sci Int 1990;46:231-42.
9. Salaçin S, Kellece L, Altun A, et al. Adli amaçlarla kan ve semen lekelerinin identifikasyon ve kimliklendirilmesinde kullanılan yöntemler. Arşiv 1994;3:25-34.
10. Ferri G, Bini C, Ceccardi S, Pelotti S. ABO genotyping by minisequencing analysis. Transfusion 2004;44:943-4.
11. Itoh Y, Kobayashi R. Evaluation of ABO and Lewis genotypes using primer extension preamplification. Forensic Sci Int, 2000;11:139-41.
12. Doi Y, Yamamoto Y, Inagaki S, Shigeta Y, Miyaishi S, Ishizu H. A new method for ABO genotyping using a multiplex-single-base primer extension reaction and its application to forensic casework samples. Leg Med (Tokyo), 2004;6:213-23.

13. Çekin N. Mikroplate yöntemi ile kan gruplarının saptanması. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1994.
14. Buttler JM. Forensic DNA Typing. London: Academic Press, 2001.
15. Ohmori T, Sato H. Improvement of absorbtion-elution test using commercially available anti-A, anti-B monoclonal antibodies-ABO blood typing from hair samples. Nippon Hoigaku Zasshi, 1999;53:338-44.
16. Sakharov RS, Fudolowa MV. Use of proteases to improve the sensitivity of ABO antigen detection by absorbtion-elution test in analysis of human exretion traces. Sud Med Expert, 1999;42:29-32.
17. Kobayashi T, Yokota M, Mitani T, Akane A. Effects of solvent displacement on sensitivity and specifity of monoclonal antibodies for ABO blood grouping of forensic specimens with an absorbtion-elution test. Leg Med (Tokyo) 1999;1:68-75.
18. Kind SS. Absorbtion-elution grouping of dried blood smears. Nature 1960;185:397-8.
19. Kind SS. Absorbtion-elution grouping of dried blood stains on fabrics. Nature 1960;187:789-90.
20. Martin PD. A manuel method for the detection of Rh antigens in dried bloodstains. J Forensic Sci Soc 1977;17:139-42.
21. Salle PJ, Metzger DA, Stolorow MD. Attempts to determine the lewis phenotypes of dried blood stains. J Forensic Sci 1984;29:75-9.
22. Gaensslen RE, Lee HC, Pagliero EM, et al. Evaluation of antisera for bloodstain grouping I. ABH, MN and Rh. J Forensic Sci 1985;30:632-54.
23. Gaensslen RE, Lee HC, Pagliero EM, et al. Evaluation of antisera for bloodstain grouping II. Ss, kell, duffy, kidd and Gm/Km. J Forensic Sci 1985;30:655-76.
24. Kashyap VK, Raju DVK, Bhatya RYP. Fungal contamination of blood stains and their secretory substances. Adli Tıp Derg 1988;4:121-6.
25. Pereira M, Martin PD. Problems involved in the grouping of saliva, semen and other body fluits. J Forensic Sci Soc 1976;16:151-4.
26. Rao DV, Raju DVK, Kashyap VK. Effect of physico-chemical factors on stability of ABH antigens. Adli Tıp Derg 1989;5:145-50.
27. Kind SS, Lang BG. An investigation into the possible sources of adventitious ABH substances bloodstain grouping. J Forencis Sci Soc 1976;16:155-61.
28. Lee HC, Ladd C. Preservation and collection of biological evidence. Croatian Med J 2001;42:225-8.