

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SEMEN LEKESİNDEN ABO GRUP TAYİNİNDE KULLANILAN
ABSORBSİYON-İNİHİBSİYON VE ABSORBSİYON-ELÜSYON
METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI HAKINDA BİR ÇALIŞMA

744483

Ebru İBİŞ

Disiplinler Arası Adli Tıp Anabilim Dalı
Adli Biyoloji
Yüksek Lisans Tezi

Danışman:
Doç. Dr. Yaşar BİLGE

Ankara - 2004

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Disiplinlerarası Adli Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde
yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi:07/06/2004



Doç. Dr. Yaşar BİLGE
Ankara Üniversitesi



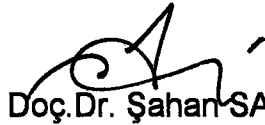
Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Engin TURAN
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK
Ankara Üniversitesi



Doç. Dr. Şahan SAYGI
Gölhane Askeri Tıp Akademisi

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında gösterdikleri ilgi, anlayış ve yetişmemdeki emekleri için;

Danışmanım Doç. Dr. Yaşar BİLGE'ye

Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdür Yardımcısı Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na

Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Serdar GÜNALP'e

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Sorumlusu Uz. Dr. Kazım SOYLU'ya

Saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmam sırasındaki yardımlarından dolayı İstatistik uzmanı Sn. Nazmiye KURŞUN'a ve Biyolog arkadaşlarım Başak DUMAN, Ebru ARSLAN ve Seyna SÜZEN'e teşekkür ederim.

Ebru İBİŞ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	11
TESEKKUR	111
İCİNDEKİLER	IV
GRAFİK VE TABLOLAR	VI
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Cinsel Saldırıların Olay Yeri Bulunabilecek Deliller	6
2.2. Semen'in Özellikleri	7
2.3. Semen Lekelerini Belirleme Yöntemleri	8
2.3.1. Spermatozoa'ların Tespiti	9
2.3.1.1. Corin Stokes Tekniği	9
2.3.1.2. Baccchi Tekniği	10
2.3.2. Kimyasal Testler	10
2.3.2.1. Çinko Testi	11
2.3.2.2. Asit Fosfataz Testi	11
2.3.2.3. Prostat Spesifik Antijen Testi	12
2.4. DNA Analizi	13
2.5. Semen Lekesinin İnsana Ait Olup Olmadığının Tespiti	14
2.6. Semenden Kan Grubu Analizi	14
2.6.1.1. Kan Grubu Substansları	14
2.6.2. Semen Lekelerinden ABO Grup Tayininde Kullanılan Yöntemler	20
2.6.2.1. Absorbsiyon-İnhibisyon Testi	20
2.6.2.2. Absorbsiyon-Elüsyon Testi	21
2.6.2.3. Mixed Aglutinasyon Yöntemi	22
2.6.2.4. ELİSA Yöntemi	22
3. GEREÇLER VE YÖNTEM	23
3.1. Gereçler	23
3.2 Yöntem	23
4. BULGULAR	27

5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ	38
ÖZET	39
SUMMARY	41
KAYNAKLAR	42



GRAFİK VE TABLOLAR

- Tablo 2.1.** Biyolojik materyallerdeki DNA miktarları
- Tablo 2.2.** ABO sisteminde başlıca kan grup antijenleri ve antikorları
- Tablo 2.3.** ABO kan gruplarının değişik toplumlardaki (%) dağılımları
- Şekil 3.1.** Absorbsiyon-inhibisyon yönteminde kullanılan porttüp şeması
- Şekil 3.2.** Absorbsiyon-elüsyon yönteminde kullanılan porttüp şeması
- Tablo 4.1.** A grubu örneklerden elde edilen bulgular
- Tablo 4.2.** B grubu örneklerden elde edilen bulgular
- Tablo 4.3.** AB grubu örneklerden elde edilen bulgular
- Tablo 4.4.** O grubu örneklerden elde edilen bulgular
- Tablo 4.5..** Deneylerden alınan sonuçların yüzde olarak olarak gösterilmesi
- Grafik 4.1.** A grubu örneklerden elde edilen sonuçların % değişim grafiği
- Grafik 4.2.** B grubu örneklerden elde edilen sonuçların % değişim grafiği
- Grafik 4.3.** AB grubu örneklerden elde edilen sonuçların % değişim grafiği
- Grafik 4.4.** O grubu örneklerden elde edilen sonuçların % değişim grafiği

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Cinsel saldırı vakalarında olay yerinde semen, idrar, kan gibi biyolojik materyallere sıklıkla rastlanmaktadır. Bunlar içerisinde semen çoğunlukla yatak, koltuk gibi eşyalar üzerinde olabileceği gibi saldırgana veya mağdura ait giysiler üzerinde de leke halinde bulunabilir.

Adli tıp ve kriminal laboratuvarlarında yürütülen semen lekesi identifikasyonu'na yönelik çalışmalar saldırganın kimliğinin belirlenmesine yardımcı olması bakımından önem taşır. Olay yerinde bulunan lekenin öncelikle çeşitli biyokimyasal marker'lar kullanılarak (P₃₀, Asit Fosfataz, Çinko v.b) yada farklı boyama teknikleriyle (Baechi, Corin Stockes v.b) semen lekesi olup olmadığı saptanır (Gök, 1984; Keating, 1989). Daha sonra lekedeki kan grubu substansları tespit edilerek saldırganın kan grubunu belirlemeye yönelik çalışmalar yapılır.

Semen lekelerinden ABO grup tayini için kullanılan yöntemler aynı zamanda kan, tükürük, idrar, ter ve süt gibi diğer vücut sıvılarının da ABO gruplandırmasında kullanılır (Kind, 1960; Soyza, 1991). Tıp ve teknolojideki gelişmelere paralel olarak vücut sıvılarına ait lekelerden grup tayini için pek çok yeni yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte geçtiğimiz 60 yıl içinde laboratuvarlarda en yaygın olarak kullanılanlar absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon'dur. Her iki yöntem de küçük miktardaki lekelerden ABO gruplandırmasına olanak sağlaması bakımından Adli Seroloji'de önem taşır.

Absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon yöntemleriyle vücut sıvılarına ait lekelerden ABO gruplandırmasının yapılabilmesi için

kişinin sekretör özellikte olması gerektiği belirtilmektedir (Wintrobe, 1967; Öztürel, 1971; Fowler ve Scott, 1985). Ancak Pereira ve Davies'in yaptığı iki ayrı araştırmada özellikle non-sekretör kişilerin vücut sıvılarını gruplandırmada absorbsiyon-elüsyon'un absorbsiyon-inhibisyon'dan daha hassas olduğu, bunun yanısıra Davies'in elüsyon yöntemiyle yaptığı deneylerde yalancı B (+) reaksiyonlar saptandığı rapor edilmiştir (Pereira, 1976; Davies, 1984). Mudd'un tükürük ve semen lekeleriyle yaptığı bir çalışmada ise absorbsiyon-inhibisyon yönteminin sekresyon lekelerinden ABO grup tayininde diğer yöntemlere göre daha az başarılı olduğu belirtilmiştir (Mudd, 1989).

Bu çalışmadaki amaç semen lekelerinden ABO kan grubu tiplemesinde küçük miktarda örnekle çalışmaya elverişli, düşük maliyetli ve yaygın olarak kullanılan; ancak farklı çalışmalarda birinin diğerinden daha hassas olduğu belirtilen absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon yöntemlerinin aynı leke örneklerine uygulanarak hangisinin daha hassas olduğunun ve birbirinden farklarının olup olmadığının belirlenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

Ana toplumsal sorunlardan olan cinsel suçlar her geçen yıl artmaktadır. Ancak bu artış, suçlardan çok ortaya çıkarılan suç oranının artması ile gerçekleşmektedir. Ülkemizde hukuksal boyutta bir cinsel davranışın suç olarak nitelendirilmesinde aşağıdaki ortak kavramlar kullanılmaktadır;

Irza Geçme:

Rıza ve muvafakati olmayan ve yaşı dolayısıyla rızası kabul edilmeyen dişi veya erkeğin vajinasına veya anüsüne failin cinsiyet organı olan penisinin, cinsel teması sağlayacak şekilde girmesi "ırza geçme " olarak tanımlanmıştır (Gök, 1983).

Irza Tasaddi:

Cebir, şiddet, tehdit ile cinsel birleşme amacı gütmeyen mağdura karşı icra edilen tüm cinsel hareketlerdir (Soyaslan, 1996).

Bir davranışın suç olarak nitelendirilmesi için gereken koşullar şu şekilde tanımlanmıştır;

a-Davranışın rızası olmayan bir kişiye yönelik olması,

b-Yasalarda belirtilen yaş gruplarındaki kişilere karşı yapılması,

c-Mental veya beden hastalığı olan kimselere yapılması,

d-Zor kullanılması,

e-Kiřiyi alkol, uyutucu, uyutucu, bir madde etkisi altında bırakarak yapılması,

f-Hile ve kandırma yolu ile gerçekleştirilmesi (A.T.U.D.,1999).

Yukarıdaki cinsel saldırı tanımlarında da görüldüğü gibi, rızanın olup olmadığının veya var ise geçerli olup olmadığının belirtilmesi bir hareketin saldırı niteliğinde olup suç sayılması bakımından önemlidir. Türk Ceza Kanunu'nun 414-418. maddelerinde ırza geçme ve ırza tasaddi eylemleri ile ilgili hükümler yer almaktadır;

414.Madde (Mefruz Cebirle Irza Geçme): Her kim 15 yaşını bitirmeyen bir küçüğün ırzına geçerse 5 seneden aşağı olmamak üzere ağır hapis cezasına mahkum olur.

Eğer fiil cebir ve şiddet veya tehdit kullanmak suretiyle veya akıl veya bedenen hastalığından veya failin fiilinden başka bir sebepten dolayı veya failin kullandığı hileli vasıtalarla fiile mukavemet edemeyecek bir halde bulunan bir küçüğe karşı işlenmiş olursa ağır hapis cezası 10 seneden aşağı olamaz.

415.Madde: Her kim 15 yaşını bitirmeyen bir küçüğün ırz ve namusuna tasaddiyi mutazzammın bir fiil ve harekette bulunursa iki seneden dört seneye ve bu fiil ve hareket yukarıdaki maddenin ikinci fıkrasında yazılı şartlar içinde olursa üç seneden beş seneye kadar hapsolunur.

416.Madde (Zorla Irza Geçme Tasaddi): 15 yaşını bitiren bir kimsenin cebir ve şiddet veya tehdit kullanmak suretiyle ırzına geçen veyahut akıl ve beden hastalığından veya kendi fiilinden başka sebepten veya kullandığı hileli vasıtalarla dolaylı fiile mukavemet edemeyecek

bir halde bulunan bir kimseye karşı bu fiili işleyen kimse 7 seneden aşağı olmamak üzere ağır hapis cezasıyla cezalandırılır.

Yine bu suretle ırza ve namusa tasaddiyi tazammun eden diğer bir fiil ve harekette bulunursa 3 seneden 5 seneye kadar hapsolunur.

Reşit olmayan bir kimse ile rızasıyla cinsi bir münasebette bulunanlar fiil daha ağır cezayı müstelzim bulunmadığı takdirde 6 aydan 3 seneye kadar hapis cezasıyla cezalandırılır.

417.Madde (Cezayı Arttıran Şahsa Bağlı Haller): Yukarıdaki maddelerde yazılan fiil ve hareketler birden ziyade kimseler tarafından işlenir veya usulden biri veya veli ve vasi veya mürebbi ve muallimleri ve hizmetkarları veya terbiye veya nezaret veya muhafızları altında bırakılan veya buna düşar olanların üzerlerine hüküm ve nüfuzu olan kimseler tarafından vuku bulursa kanunen muayyen olan ceza yarısı kadar arttırılır.

418.Madde (Cezayı Arttıran Fiile Bağlı Sebepler): Yukarıdaki maddelerde yazılı fiil ve hareketler mağdurun ölümünü mucip olursa faile idam cezası verilir.

Eğer bu fiil ve hareketler bir marazın sirayetini veya mağdurun sıhhatine sair büyük bir nakisa irasına veya maluliyet veya mayubiyetini müstelzim olursa cezanın yarısı ilave edilerek hükmolunur (Önder, 1994).

Bu tanım maddelerine göre cinsel saldırılarda delillerin belirlenmesi gerekmektedir.

2.1.Cinsel Saldırılarda Olay Yerinde Bulunabilecek Deliller

Cinsel suçların ana grubunu oluşturan ırza geçme ve ırz ve namusa tasaddi eylemlerinin ne yazık ki çok küçük bir oranı (%5-10'u) adli makamlara yansıtılmaktadır (Yavuz, 1996). Bu suçların mağdurlarının neredeyse tamamına yakını savunma güçleri az olan çocuk ve kadınların oluşturduğu göz önüne alındığında birey ve toplum sağlığı açısından, olayı aydınlatmaya yardımcı olacak her türlü delilin toplanması ve laboratuvarda faile ait özellikleri belirlemeye yönelik incelemelerde kullanılması önem kazanmaktadır.

Kriminal olaylarda, olay yerinde bulunabilecek kan, meni, tükürük, ter, süt, gözyaşı, vajen ifrazatı, verniks kaseosa, mekonyum, gaita, idrar ve bunların lekeleri ile kıllar, tırnak, kemik, doku ve organ parçaları biyolojik delilleri oluştururlar. Adli Tıp Kurumu Kanunu'na göre bunları inceleme görevi Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesine verilmiştir. Ülkemizde 2001 yılında yürürlüğe giren Adli Tıp Kurumu Kanunundaki 4810 sayılı yasanın 20.maddesinde Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi'nin görevleri tanımlanmıştır. Bu maddeye göre Biyoloji ihtisas dairesinin görevi mahkemeler ile hakimlikler ve savcılıklar tarafından gönderilen her türlü biyolojik örnek ve biyolojik örnek taşıması muhtemel materyalin mikrobiyolojik, hematolojik, serolojik ve genetik yönden incelemelerini yapmak ve sonucunu bir raporla tespit etmek olarak belirlenmiştir (<http://www.atk.gov.tr/tr/pages/mevzuat/yasa/atk.htm>, 30.04.2004).

Özellikle cinayet, tecavüz ve cinsel saldırı gibi olaylarda kan, semen, tükürük gibi lekeler bazen bireyselleştirmede kullanılacak tek delil olmaktadır. Bu nedenle olayın aydınlatılması için çok küçük miktarlarda

bile olsa vücut sıvılarının ve bunlara ait lekelerin uygun şekilde toplanarak laboratuvara gönderilmesi büyük öneme sahiptir. Olay yerinde biyolojik deliller koltuk, perde, giysiler ve suç aletleri gibi eşyalar üzerinde olabileceği gibi duvar, cam, döşeme gibi sabit nesneler üzerinde de bulunabilirler.

Vücut sıvılarına ait lekelerin yeri, şekli, rengi ve boyutları kaydedildikten sonra fotoğrafı çekilmeli, leke taşınabilir eşyalar üzerindeyse eşyanın tümü laboratuvara gönderilmelidir. Sıvı haldeki örnekler pipet yardımıyla steril tüplere alınmalı ve buz içinde taşınmalıdır. Kurumuş lekeler spatülle kazınarak petri kaplarına aktarılırken, kazınmaya uygun olmayan lekeler serum fizyolojikle ıslatılmış pamuğa emdirilmeli ve bir an önce laboratuvara ulaştırılmalıdır. Delillerin toplanmasında kullanılan malzemelerin steril olması ve toplayan kişinin eldiven, maske, bone takması laboratuvar aşamasında yanlış sonuçlar alınmasına yol açabilecek muhtemel kontaminasyonların önlenmesi bakımından önem taşır (Tunalı, 1995; Aykaç, 1993; Bilge, 2002).

2.2 Semen'in Özellikleri

Semen normalde prostat, testis, cowper bezleri ve vesikula seminalis'e ait salgılardan oluşan, % 90 nispetinde su içeren beyazımtırak, jelatinöz, kendine has kestane çiçeği-eskimsi bir kokusu ve viskozitesi olan bir sıvıdır. Sağlıklı bir insanda bir ejakülatta 3-4 ml. Semenle birlikte 400-600 milyon spermatozoa atılır. Taze ejakülatta sperm hücresi mikroskop altında 40-50 mikron uzunluğunda, baş, boyun, kuyruktan oluşan hareketli bir iribaşa benzeyen bir yapı olarak görülür.

Ejekülatta spermatozoa'dan başka prostoglandinler, epitel döküntüleri, lipitler, proteinler, pigment granülleri ve hiyalin cisimler bulunur. Semen' in normal pH' ı 7.2-7.5 arasında olup ortalama 20 dk' da sıvılaşır (Bozkırlı, 1987; Aykaç, 1993).

2.3 Semen Lekelerini Belirleme Yöntemleri

Cinsel saldırı ve tecavüz olaylarında eşyalar ya da giysiler üzerinde çoğunlukla semen lekelerine rastlanır ancak kimi zaman idrar, kan, vajinal salgılar gibi diğer vücut sıvılarıyla semen karışmış olabilir (Kobus ve ark., 2002). Bu nedenle olay yerinde bulunan lekenin öncelikle semen lekesi olup olmadığı araştırılır; daha sonra bireyselleştirmeye yönelik çalışmalar yapılır.

Semen lekeleri beyaz kumaşlarda kenarları daha sarı renkte harita görünümünde izler bırakır, kumaşın lekeli kısımları serttir. Beyaz renkli kumaşlarda leke gözle tespit edilecek kadar belirgin olmakla birlikte koyu renkli kumaşlarda semen lekesi floresan metoduyla tespit edilebilir. Büyük yada çok sayıda örneğin inceleneceği durumlarda floresan metodunun diğer kimyasal yöntemlere göre daha hızlı ve kullanışlı olduğu belirtilmiştir (Tunalı, 1995; Kobus, 2002). Kurumuş semen lekelerini incelemek için laboratuvarlarda rutin çalışmalarda değişik dalga boylarında ışık yaymaya en uygun ışık kaynağı olarak Polilight kullanılmıştır. Lekeli materyalde asit fosfataz testi veya DNA analizi yapmak için en uygun bölgeyi belirlemek amacıyla da Floresan metodundan yararlanılır. Yöntemin esası U.V. ışığı kullanılarak semen lekesinin floresan verme özelliğinin tespit edilmesidir. Stoiloviç, yaptığı bir çalışmada 350 nm(U.V.) ile 500 nm(mavi-yeşil) dalga

boyundaki ışık altında semen'in güçlü floresan özellik gösterdiğini ve yayılım spektrumunun geniş olduğunu belirtmiştir (Stoiloviç, 1991). Ayrıca güçlü floresan özellik gösteren parlak yada yüksek absorbansa sahip çok koyu renkteki kumaşlar ile deterjan içeren materyallerle yapılan deneylerde bu metodun lekeyi tespit etmede yetersiz olduğu saptanmıştır. İdrar, kan, vajinal salgılarla karışmış lekeli kumaşlarla yapılan çalışmalarda da çeşitli vücut salgılarının semeni maskeleyip floresan özellikte kayıplara neden olabileceği; bu gibi durumlarda semen lekesinin tespiti için kimyasal testlerin uygulanması gerektiği belirtilmiştir (Kobus ve ark., 2002).

2.3.1 Spermatozoaların tesbiti :

Sperm lekelerinin en iyi teşhis yöntemi mikroskop altında spermatozoaların tespit edilmesidir. Hazırlanan preparatlarda spermatozoa görülmesi amacıyla muhtelif boyama metodları kullanılır;

2.3.1.1. Corin Stokes Tekniği:

Boya solüsyonunu hazırlamak için 0.50gr. eritrosine 100ml. amonyak karıştırılır. Kumaşın lekeli kısımlarından birkaç adet lif çekilerek üzerine 1 damla saf su damlatılır, lifler didiklendikten sonra boya solüsyonu damlatılarak birkaç dakika bekletilir. Lifler saf suyla yıkanmanın ardından kurutularak Kanada balsamı ile monte edilir ve mikroskopla incelendiğinde lifler üzerinde ve aralarında spermatozoaların pembe renkte boyanmış oldukları görülür.

2.3.1.2. Baecchi Tekniği :

Ekstraksiyona tabi tutulmuş leke sedimentinden lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutulur ve 1 ünite %1'lik asitfuksin, 1 ünite %1'lik metilen mavisi ve 40 ünite %1'lik HCl ile hazırlanan boya ile 1 dk. Boyandıktan sonra %1'lik HCl çözeltisi ile yıkanıp kurulanır. Ksilolle rengi açılan numunenin üzerine sediryağı konularak lamel kapatılır. Hazırlanan preparat mikroskop altında incelendiğinde spermatozoaların baş kısımlarının kırmızı, kuyruk kısımlarının ise mavi renge boyandıkları görülür (Tunalı, 1995).

Semen lekeli materyaller ve vajinal swab örneklerinde spermatozoaların tespit edilmesi için Corin Stockes ve Baecchi tekniklerinin yanı sıra Gram, Hematoksilen-Eosin ve Oppitz boyama yöntemleri de kullanılmaktadır. Willot ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada seksüel ilişkiden sonra vajinada spermatozoa'nın canlı olarak bulunabildiği en uzun sürenin 36-72 saat, görülebildiği en uzun sürenin ise 6-7 gün olduğu belirtilmiştir (Willot ve Allard., 1982). Semen lekelerinin spermatozoa ihtiva etmediği durumlar olabilir; azospermik kişilerin semeninde sperm hücresi bulunmadığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra alkolizm, toksinler, ilaçlar ve x-ışınlarının da geçici azospermiye neden olabileceği saptanmıştır (Kamanev ve ark., 1989).

2.3.2. Kimyasal Testler

Bir lekenin semen lekesi olduğunun en kesin kanıtı spermatozoa'ların tespit edilmesidir. Ancak lekede spermatozoa tespit

edilemediği durumlarda çeşitli kimyasal testler uygulanarak semen lekesi olup olmadığı belirlenebilir.

2.3.2.1. Çinko Testi:

Semen lekelerinin yüksek düzeyde Çinko ihtiva ettiğini ilk olarak Suzuki ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada tespit etmişlerdir (Suzuki., 1983). Semende tespit edilen çinkonun kaynağı prostat sekresyonudur. Cinsel saldırı vakalarında lekelerin Triton x-100 içerisinde çözülmesiyle oluşan pembe-turuncu renk lekede çinkonun varlığını ispatlar. Daha sonraları çinko tayini için spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir (Hoofit ve Voorde., 1990; Hoofit ve ark., 1992).

2.3.2.2. Asit Fosfataz Testi:

İlk olarak 1943' te Pollack tarafından semende asit fosfataz'ın tespit edilmesinin ardından adli vakalarda spermatozoa bulunmayan lekelerde asit fosfataz tespitine yönelik pek çok metod geliştirilmiştir (Kendi ve ark., 1993). Renk reaksiyonu oluşumunun esas alındığı testlerde koyu renkli giysilerden sonuç alınamamaktadır. Semen yanı sıra vajinal sıvı, kan, idrar, tükürük gibi diğer vücut sıvılarında da asit fosfatazın varlığı bilinmektedir ancak semendeki miktarının çok fazla olduğu çeşitli araştırmalarda ispatlanmıştır (Hoofit ve ark., 1992). Ayrıca elektroforez ve radyoimmunoassay gibi yöntemlerle prostatik asit fosfatazın daha spesifik olarak tespiti de yapılabilmektedir (Hekman ve Rumke, 1969; Kloosterman, 1984). Soğuk ortamda ve kuru olarak muhafaza edilen lekeli örneklerde asit fosfatazın uzun süre aktif kaldığı saptanmıştır (Kendi ve ark., 1993). Vücut sıvılarına ait lekelerde semenin tespitine yönelik çalışmalarda asit fosfataz testi en çok uygulanan yöntemdir. Asit

fosfatazla birlikte spermatozoanın da tespit edilmesi lekenin semen lekesi olduğunu doğrular (Keating, 1989).

2.3.2.3. Prostat Spesifik Antijen (P₃₀) Analizi:

Seminal protein P₃₀, insan seminal plazmasına spesifik bir protein olarak ilk kez 1978'de Sensebaugh tarafından bulunmuştur. 26500 D molekül ağırlığında bir glikoprotein olan P₃₀'un, azospermik kişilerde de varlığının saptanması semene spesifik bir marker olması bakımından adli vakalardaki önemini arttırmıştır. Cinsel saldırı vakalarında azospermik olguların incelendiği bir araştırmada azospermi'nin görülme sıklığı %1.9 olarak tespit edilmiştir (Willot, 1982). Kamanev' in yaptığı bir araştırmada 256 kez seyreltilmiş semen lekeleri ve 12 yıl bekletilmiş lekelerde enzim-immunoassay yöntemleri ile P₃₀' un saptanabildiği belirtilmiştir (Kamanev, 1989). Ancak Jhonson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada deterjanla kontamine olmuş semen lekeleriyle yapılan P₃₀ tayininde yanlış negatif sonuçlar alındığı açıklanmıştır (Bilge, 2003). Vajinal swablarda ilişkiden 21 saat sonra bile belirlenebilen P₃₀, tecavüz olaylarında sık başvurulanan bir marker olma özelliğini sürdürmektedir.

Lekenin seminal orijinli olup olmadığının araştırılmasında çinko, asit fosfataz ve P₃₀ tespiti' nin yanısıra bu yöntemlere göre daha az spesifik olduğu belirtilen Barberio, Puran, Florence testleri ile Kreatin Fosfokinaz, Gamaglutamil transpeptidaz, Laktat Dehidrogenaz, Lösin Aminopeptidaz, 19-Hidroksi prostoglandin F tespiti gibi çeşitli kimyasal yöntemler de geçmişte semen lekelerinin tespit edilmesi amacıyla adli tıp'ta kullanılmıştır (Acar, 1994; Tunalı, 1995).

2.4.DNA Analizi :

DNA analizi kanıt niteliğindeki kan, semen, saç, kemik ve diğer dokulara ait biyolojik materyallerdeki DNA ile suçlu yada mağdurdan alınan biyolojik materyalden izole edilen DNA'nın karşılaştırılması esasına dayanır. Son yıllarda Adli çalışmalarda insan popülasyonlarındaki genetik polimorfizmleri belirlemeye yönelik pek çok moleküler teknik uygulanmaya başlamıştır. Bunlar arasında Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLP), Polymerase Chain Reaction (PCR), Short Tandem Repeats (STR) ve Mitokondriyal DNA analizi gibi yöntemler vardır. Kan, semen, ve vajinal sıvıların karıştığı örneklerde DNA bantlarını ayırmak oldukça zordur (Lee ve ark., 1994). Tablo 2.4.'de biyolojik materyallerdeki DNA miktarları gösterilmektedir.

<u>Örnek Tipi</u>	<u>DNA Miktarı</u>
Kan	20.000-40.000 ng/ml
Kan lekesi(1cm ²)	250-500 ng
Semen	150.000-300.000 ng/ml
Postcoital vajinal swab	10-3.000 ng
Saç (köklü)	1-750 ng/root
Tükrük	1.000-10.000 ng/ml
Oral swab	1000-1500 ng
İdrar	1-20 ng/ml
Kemik	3-10 ng/mg bone

Tablo 2.1. Biyolojik materyallerdeki DNA miktarları (Lee ve ark, 1994).

Adli çalışmalarda pek çok biyolojik materyalden çok az miktarda DNA izole edilebilmesi yada örnekteki harabiyet ve/veya kontaminasyon nedeniyle RFLP analizi yapılamamaktadır. Kan, semen ve vajinal sıvılara ait lekelerden izole edilen degrede olmuş DNA 'nın çok küçük miktarlarından (10-20 ng.) bile çalışmaya elverişli olan PCR metodunun adli çalışmalar için daha uygun olduğu belirtilmektedir (Pfitzinger ve ark., 1993).

2.5. Semen Lekesinin İnsana Ait Olup Olmadığının Tespiti :

Semen lekesinin insana ait olup olmadığının anlaşılması için insan semeninin tavşan peritonuna zerk edilmesiyle elde edilen ve sadece insan seminal sıvısıyla reaksiyon veren presipitan serumlar kullanılır. Kan lekelerinde olduğu gibi presipitasyonun meydana gelmesiyle sonucun müsbet olduğu anlaşılır (Wintrobe, 1967).

2.6.Semenden Kan Grubu Analizi

2.6.1.1.Kan Grubu Substansları:

ABO kan grubu sistemi ilk kez Karl Landsteiner tarafından 1901 yılında tanımlanmıştır. Bu sisteme göre bireyler eritrositleri üzerinde A ve B antijenlerinin bulunup bulunmamasına göre A, B, AB ve O olmak üzere 4 gruba ayrılırlar (Race, 1968; Akçay, 1969; Wintrobe, 1969; Aksoy, 1975). A grubunun başlıca A₁ ve A₂ olmak üzere alt grupları vardır. A ve B antijenlerinin eritrositlerde bulunuşu genetik kontrol altındadır. Üreme hücrelerinin oluşumu sırasında kromozomlar ikiye bölünür ve her üreme

hücresi kromozomun sadece bir dizisini alır. Bu nedenle üreme hücrelerindeki kromozomlar yalnızca bir kan grubu geni taşır. Ancak birey anne-babanın birisinden A_1 , A_2 , B, O veya diğlerinden de A_1 , A_2 , B veya O geni alır ve bireyin kan grubu fenotipi bu şekilde oluşur. Bu sisteme göre A_1 , A_2 , B, A_1B , A_2B ve O olmak üzere 6 çeşit fenotip oluşabilmektedir. A ve B kan grubu antijenleri dışında bu antijenlerle benzer kimyasal özellikleri taşıyan H substansı da tüm bireylerde bulunmaktadır. H substansı O, A_2 ve A_2B kanlarda daima bulunmakta, daha az olarak ta sırasıyla A_1 , A_1B , B' de yer almaktadır. Eritrositler ne kadar fazla H substansı içerirlerse o kadar az A ve /veya B antijeni içermektedirler. Buda H substansının neden en çok O grubu bireylerde bulunduğunu açıklamaktadır (Darmady ve Davenport , 1958; Başaran, 1999).

Eritrositlerde bulunmayan kan grubu antijenlerine karşı plazmada antikorlar mevcuttur. Uygun antijenle antikor bir araya geldiklerinde aralarında bağlar oluşur ve reaksiyon hücrelerin aglütinasyonu veya presipitasyonu şeklinde ortaya çıkar. ABO gruplarında bulunan antijen ve antikorlar Tablo-1 'de gösterilmiştir. ABO kan grubu antijenleri eritrosit yüzeyinin yanı sıra semen, tükürük, gözyaşı, ter, idrar, feçes, vajinal sekresyon, mukus gibi vücut sıvıları, dokular ve kılarda da bulunur (Wintrobe, 1967; Pereira, 1976; Davies, 1978; Fowler, 1985; Chase, 1986).

ABO sisteminin oluşumundan 9. kromozomun uzun kolunda bulunan iki genetik lokus sorumludur. Bu lokuslardan birinde H ve h olmak üzere iki allelik gen, diğlerinde ise A_1 , A_2 , B ve O olmak üzere 4 majör allel vardır. Hh genini kalıtımı ABO sisteminden bağımsızdır.

Ancak ABO sisteminin oluşabilmesi için baskın olan H genini mutlaka bulunması gerekir. Çok nadir olarak hh genine sahip insanların eritrositleri hiçbir antijenik yapı taşımaz fakat plazmalarında antikor vardır. Bu yapıya sahip olan bireyler “Bombay Fenotipi” olarak adlandırılırlar (Başaran, 1999).

Kan Grubu	Eritrositteki Antijen	Plazmadaki Antikor
A ₁	A+ A ₁	Anti-B
A ₂	A+H	Anti-B (Anti-A ₁)
B	B (+H)	Anti-A
0	H	Anti-A Anti-B
A ₁ B	A+ A ₁ +B	-
A ₂ B	A+ B (+H)	(Anti-A ₁)

Tablo 2.2. ABO sisteminde başlıca kan grup antijenleri ve antikorlar (Başaran,1999)

Doğada pek çok bitki ve hayvanda insan eritrosit antijenlerini aglütine eden antikorlar bulunmaktadır. *Ulex Europeus* bitkisinden Anti-H, *Dolichos biflorus*'tan Anti-A₁, *Vicia graminea*'dan Anti-N, *Marasmius oreades*'ten Anti-B izole edilerek aglütinasyon deneylerinde kullanılan test serumları elde edilmektedir (Büyükyüksel, 1974).

ABO kan gruplarının dağılımı toplumdan topluma oldukça değişmektedir. Aralarında Türkiye'nin de bulunduğu kimi toplumlara ilişkin ABO kan grubu sıklıkları Tablo-2.6.1.2'de gösterilmiştir.

	A	B	AB	0
Türkiye	42.1	16.4	5.9	35.6
A:B:D (Beyaz)	36.4	13.5	4.5	45.6
Çin	25.1	34.2	10.0	30.7
İngiltere	41.7	8.6	3.0	46.7
Japonya	17.3	13.6	4.9	63.9
Almanya	41.9	11.1	4.2	42.8
İtalya	40.8	8.9	3.6	46.7

Tablo 2.3. ABO kan gruplarının değişik toplumlardaki (%) dağılımları (Başaran,1999)

ABH antijenlerinin iki farklı formu vardır. Birincisi beyin dışındaki tüm dokularda ve eritrositlerde yer alan, alkolde çözünebilir form; ikincisi ise sekretör bireylerin vücut sıvıları ve dokularında bulunan, ancak eritrositlerde bulunmayan suda çözünebilir formdur (Wintrobe, 1967). Bir bireyin suda çözünebilir tipte kan grubu substanslarını vücut sıvılarına salgılayabilme yeteneğine “sekretörlük” adı verilir. ABO antijenlerini yalnızca eritrositlerinde taşıyan ve vücut sıvılarından kan grubu belirlenemeyenlere non-sekretör bireyler denir. Sekretörlük yeteneği bir çift allel gen tarafından kontrol edilmektedir (Se, se). Bu genler ABO genlerinden bağımsız olarak kalıtılmaktadır. Se se ve Se Se grup kişiler sekretör, se se grup kişiler non-sekretördür. Sekretörlük Mendeliyen kalıtımla aktarılır (Başaran, 1999). İnsanların yaklaşık % 25'i non-sekretördür (Race, 1968; Öztürel, 1971; Tunalı., 1995). Ülkemizde yapılan bir araştırmada ise toplumdaki non-sekretörlük oranı

% 27,5 olarak tespit edilmiştir (Tunalı ve ark., 1986). İlk kez 1939 yılında bazı Japon araştırmacılar tarafından bulunan Lewis antijenlerinin de sekretörlük özelliği ile bağlantılı olduğu anlaşılmış ve Le (a+) kişilerin ABO antijenleri için non-sekretör olduğu belirlenmiştir. Buna göre Le (a+b-) fenotipteki bireyler non-sekretör, Le (a-b+) olanlar sekretör ve Le (a-b-) olanlar her zaman olmasa bile genellikle sekretördürler (Race, 1968). Absorbsiyon-elüsyon tekniği ile Le^a ve Le^b antijenlerinin 1 yıllık kan lekelerinde tespit edilebildiği bazı çalışmalarda belirtilmekle birlikte bu antijenlerin semende çok az miktarda bulunması kurumuş semen lekelerinde tespitini zorlaştırmaktadır (Basler, 1986; Soyza ve Garland, 1988).

Semendeki antijenik yapıları belirlemek için elektroforez tekniği ile yapılan çalışmalarda suda çözünabilir ve çözünemez tipte fraksiyonlar elde edilmiştir. Bunlar arasında glikopeptid yapıda kan grubu antijenleri de bulunmaktadır (Scacciati ve Mancini, 1975). Daha sonraları immünelektroforez ve mikrokataforezle yapılan deneylerde ABH antijenlerinin hem seminal sıvıda hem de spermatozoa'nın membran yüzeyinde bulunduğu saptanmış ve seminal sıvıdaki bu antijenlerin orijininin erkek üreme sistemine ait bezlerin sekresyonu olduğu anlaşılmıştır (Hekman, 1969; Quinlivan, 1969). Seminal sıvıdaki antijenler kişi sekretörse serolojik yöntemler kullanılarak tespit edilebilir ancak spermatozoa'nın kan grubu antijenlerini belirlemek için kataforetik metodların uygulanması gerekir, bunun için kişinin sekretör özellikte olması gerekmemektedir (Ackerman, 1969). Kerek'in immunofloresan ve mixed aglütinasyon yöntemleri ile yaptığı deneylerde de antijenik materyalin spermatozoa'dan çok seminal sıvıda var olduğu belirlenmiştir (Kerek, 1974). Semen lekelerindeki kan grubu

antijenlerinin dayanıklılığını tespit etmek için mikropate hemaglütinasyon yöntemi ile yapılan bir çalışmada -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kuru halde saklanan lekelerdeki A, B, H düzeylerinin 10 ayda yarıya düştüğü; 37°C 'de saklanan lekelerdeki yarılanma süresinin ise 1 ay olduğu belirlenmiştir. Ayrıca nem, sıcaklık ve ışık faktörlerinin semen lekelerindeki antijenleri hızlı bir şekilde harab edici etkisinin olduğu saptanmıştır (Baechtel, 1985). Bazı kaynaklarda ise kuru halde soğuk ortamda muhafaza edilen 2 yıllık semen lekelerinden ABO grup tayininde başarılı olunduğu belirtilmiştir (Öztürel, 1971).

Semen lekelerinden Lewis tiplendirmesinde klasik hemaglütinasyon metodları kullanılmakla birlikte eritrositlerdeki Lewis antijen miktarının az olmasına bağlı olarak deney sonunda oluşan aglütinasyonların zayıf ve kolay bozulan yapıda olduğu belirtilmiştir. Pek çok insan kan örneklerinden Le (a-, b-) olarak tiplendirilse de diğer vücut sıvıları ile yapılan araştırmalarda Le (a-, b+) oldukları tespit edilmiştir. Le^a ve Le^b aktiviteleri arasındaki bu farklılığın sekretör bireylerde ABO gruplarıyla ilişkili olduğu; A_2 ve O grubu kişilerin Le^a ve Le^b antijen düzeyleri arasındaki farklılığın çok olmasına karşın en az A_1 ve B grubu bireyler arasında tespit edildiği belirtilmiştir (Soyza, 1991).

ABO kan grubu genetik polimorfizmlerinin fenotipik görünümünün dokular arasında değişebileceği ender durumlar da vardır. Pereira'nın yaptığı çalışmalarda aynı bireye ait vücut sıvılarında birine antijen sekresyonu yapılırken başka bir sıvıya çok az sekresyon yapılabileceği veya hiç yapılamayacağı durumlar tespit edilmiştir (Pereira, 1976).

Kan grupları tıpta, özellikle transfüzyon ve transplantasyon uygulamalarında çok önemlidir. Ayrıca adli tıpta babalığın reddi ve kimlik belirleme gibi araştırmalarda yararlanılan en önemli genetik işaretlerden biridir.

Vücut sıvılarından ABO kan grubu tayininde kullanılan pek çok yöntem olmakla birlikte az miktarda örnekle çalışmaya olanak sağlayan ve kolay uygulanabilir yöntemler Adli Seroloji çalışmalarında önem kazanmıştır.

2.6.2.Semen Lekelerinden ABO Grup Tayininde Kullanılan Yöntemler

2.6.2.1.Absorbsiyon-İnhibisyon Testi :

Schiff-Holzer aglütinin bağlama testi olarak ta adlandırılan bu metotta lekedeki antijenlerin kendine özgü antikorları bağlamasından yararlanılmaktadır. Lekeli materyal üzerine antiserum ilave edilerek +4 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılır. Kullanılan antiserumların aktivitesinin her deneyde kontrol edilmesi ve optimal reaksiyon aktivitesinin $1/256$ salin titresinin altında olmaması hatalı sonuçlandırma yapılmaması bakımından önemlidir. İnkübasyon sonunda tüplerde bulunan antijene bağlanmamış antiserumlar $1/2$ 'den $1/256$ 'ya kadar dilüsyon olacak şekilde hazırlanmış tüplere aktarılır ve üzerinde antiserumla aynı gruptan olmak üzere % 2-5'lik eritrosit süspansiyonu eklenir. Oda sıcaklığında 1-1.5 saat bekletildikten sonra tüpler 5dk. 3000 devirde santrifüj edilerek aglütinasyon olup olmadığı incelenir. Kumaşın lekesiz kısmından alınan materyale de aynı işlemler uygulanarak bir

kontrol grubu oluşturulur (Davies, 1978; Tunalı, 1995). Değerlendirme esnasında kontrol grubunda aglütinasyonun görüldüğü maksimum titrasyonla lekeli grupta aglütinasyonun görüldüğü maksimum titrasyon arasında en az 3 dilüsyon fark olması halinde antiserumların lekedeki antijenler tarafından inhibe edildiği sonucuna varılır. 1988 yılında Lee ve arkadaşları iki boyutlu absorbsiyon-inhibisyon yöntemini geliştirmiş ve bu şekilde metodun hassasiyetinin arttığını belirtmişlerdir (Lee ve ark., 1988).

2.6.2.2. Absorbsiyon-Elüsyon Testi :

Absorbsiyon-elüsyon tekniği lekedeki antijenlerin üzerine antikor eklenmesi suretiyle bağlanmaları, bağlanmamış antikorların yıkama ile ortamdan uzaklaştırılması; daha sonra ısıtma yoluyla antikorların elüe edilmesi esasına dayanır. Uygun eritrositlerin elüata eklenmesi ile oluşan aglütinasyon reaksiyonları değerlendirilerek sonuca varılır. A tüpündeki aglütinasyon lekenin A grubu olduğunu, B tüpündeki aglütinasyon B grubu olduğunu, her iki tüpteki aglütinasyon ise lekenin AB grubu olduğunu gösterir. Her iki tüpte de aglütinasyon olmaması lekenin O grubu olduğunu düşündürmekle birlikte anti-H ile yapılacak deneyde kesin sonuca varılabilir. Deneyin yapılması sırasında antiserumların aktivitesinin yanı sıra elüsyon evresinde kullanılan su banyosunun 56-60 °C, yıkama işlemi esnasında kullanılan serum fizyolojinin +4 °C sıcaklıkta olmasına ve yıkama işleminin 5-7 kez yapılmasına dikkat edilmesi gerektiği çeşitli kaynaklarda belirtilmiştir (Kind, 1960; Öztürel, 1971).

2.6.2.3.Mixed Aglütinasyon Yöntemi :

Bu yöntem absorbsiyon-elüsyon metodunun mikroskopik olarak uygulanmasıdır. Lekeli materyalden alınan lifler lam üzerine konularak antiserum ilave edilerek 1-2 saat nemli kamerada bekletilir. Serum fizyolojikle 3-4 yıkamanın ardından % 0.5'lik uygun eritrosit süspansiyonu da lam üzerine damlatılır ve oda sıcaklığında 2 saat bırakılan materyalde aglütinasyon olup olmadığı mikroskopik olarak tespit edilir. Kontrol grubu oluşturularak çalışılması sonuçların doğru olarak değerlendirilmesi bakımından önem taşır (Tunalı, 1995).

2.6.2.4.ELISA :

Vücut sıvılarından ABO grup tayininde ve Le tiplendirmesinde ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) metodu da kullanılmaktadır. Yöntemin esası, mikropate'ler içinde leke ekstraktındaki antijenlerle işaretlenmiş monoklonal antiserumların bir araya getirilmesi ve dansitometre yardımıyla absorbansların ölçülerek oluşan reaksiyonların değerlendirilmesine dayanır (Soyza, 1991). ELISA ile monoklonal antikorların yanı sıra poliklonal antikorlarla da yapılan çalışmalarda metodun hassasiyetinin arttığı gözlenmiş ancak enfeksiyon riski nedeniyle poliklonal antikorların kullanımının tercih edilmediği belirtilmiştir (Kobayashi ve ark., 1999). ELISA metodunda Nitroselüloz membran kullanılarak semen, tükürük, idrar ve vajinal sıvılara ait lekelerden ABO ve Lewis tiplendirmesi yapılan bir çalışmada ise indikatör hücre eklenmesine gerek kalmadan başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Nitroselüloz membranın kullanılma amacının yöntemin hassasiyetinin artırılmasının yanı sıra pahalı olan maliyetinin de düşürülmesi olarak açıklanmıştır (Pflug ve ark., 1989).

3. GEREÇLER VE YÖNTEM :

3.1.Gereçler :

1. Grubu bilinen semen lekeleri
2. Anti-A serumu
3. Anti-B serumu
4. Anti-H serumu
5. Schiff tüpleri
6. Pastör pipetleri
7. Serum fizyolojik
8. Porttüp
9. Santrifüj
10. Su banyosu
11. Termometre
12. Lam ve lamel
13. Mikroskop

3.2.Yöntem :

Bu çalışmada H.Ü.Tüp Bebek ve Üroloji Kliniğinden 2 ay boyunca toplanan 74 semen örneği kullanılmıştır. Kan grubu kayıtlarına ulaşılan donörlerden alınan sıvı semen örneklerinden 5x5 cm.'lik beyaz keten kumaşlar üzerine 1 ml. damlatılarak güneş ışığı almayan bir ortamda oda sıcaklığında 1 gün kurumaya bırakılmıştır.

Çalışmada test serumu olarak anti-A, anti-B (Eryclone, Tulip Diagnostics Ltd.) ve anti-H lectin (Ulex europaeus) (Dominion Biologicals Ltd.) kullanılmıştır.

Lekli kumaşlardan alınan yaklaşık 0.5 cm²'lik materyal deney tüplerine alınarak A tüplerine Anti-A, B tüplerine Anti-B ve H tüplerine Anti-H serumlarından 2'şer damla damlatılmış ve tüplere örnek numaraları yazılmıştır. Aynı işlem kumaşın lekesiz kısmından alınan materyale de uygulanmış ve bu tüpler AK (A-kontrol), BK (B-kontrol) ve HK (H-kontrol) olarak etiketlenmiştir. Daha sonra bu tüpler antijen-antikor birleşmesi için +4°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

I	I	I	II	II	II	III	III	III	K	K	K	
A	B	H	A	B	H	A	B	H	A	B	H	
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/2
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/4
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/8
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/16
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/32
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/64
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/128
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1/256

Şekil 1-Absorbsiyon-inhibisyon Yönteminde Kullanılan Porttüp Şeması.

Deneyin absorbsiyon-inhibisyon aşaması için Schiff tüpleri porttübe şeklindeki gibi dizilerek etiketlenmiştir. Her örnek için soldan sağa A, B, H grubu ve yukarıdan aşağıya dilüsyon oranları yazılmıştır. Kontrol grubu için de aynı sıralama uygulanmıştır. Bütün tüplere 2'şer damla serum fizyolojik damlatılarak, buzdolabında antijen-antikor birleşmesi

için inkübasyona bırakılmış olan tüplerden alınan 2'şer damla örnek , porttüpte soldan sağa birinci sıradaki ilk tüplere konmuştur. Daha sonra her sıradaki materyal $1/_{256}$ 'ya kadar dilüe edilmiştir.

Deneyde kullanılacak olan eritrosit süspansiyonlarını hazırlamak için gereken A, B ve O grubu düz kanlar Serpil Akdağ Kan Merkezinden temin edilmiştir. Üzerlerine 2/3 oranında serum fizyolojik eklenerek yıkanan kanlar 3000 devirde 5dk. santrifüj edilmiş, santrifüj sonunda üstte kalan serum kısmı atılarak dipteki eritrositler üzerine yeniden serum fizyolojik ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Yıkama işleminin 3 kez yapılmasının ardından dipte kalan eritrositerden 4 damla alınarak üzerine 196 damla serum fizyolojik ilave edilmiş ve bu şekilde % 2'lik eritrosit süspansiyonu hazırlanmıştır.

Porttüpte sıralanmış dilüsyonlu tüplerden A ve AK tüplerine A grubu, B ve BK tüplerine B grubu, H ve HK tüplerine de O grubu eritrosit süspansiyonundan 1'er damla damlatılmış ve tüpler 1 saat oda sıcaklığında bekletmenin ardından 3000 devirde 3 dk. santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki aglütinasyon makroskopik olarak tespit edilmiş, aglütinasyonun zayıf olduğu örneklerde mikroskopik değerlendirme yapılmıştır.

Deneyin absorbsiyon-elüsyon aşamasında ise +4 °C'de 1 gece absorbsiyona bırakılan ve içlerinden 2'şer damla antiserum alınan tüplerdeki materyaller kullanılmıştır. İçlerindeki antiserumları çekilmiş olan tüpler +4 °C'deki soğuk serum fizyolojik ile 3 kez yıkanmış ve bu işlemle lekedeki antijenlere bağlanmamış olan serbest antiserumlar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her tüpe 1'er damla serum fizyolojik damlatılarak tüpleri ağzı parafilmle kapatılmıştır. Lekeli antijenlere bağlı antikorların elüsyonu için tüpler 56°C'lik su banyosunda 10dk. bekletilmiştir. Tüplerin ısısının 56 °C'nin altına

düştüğü durumlarda elüe olan antiserumların yeniden lekedeki antijenlere bağlanmasını önlemek amacıyla tüpler sıcak su banyosundan çıkarılmadan içlerindeki antiserum bağlanmış materyalden 1'er damla alınarak Schiff tüplerine aktarılmıştır.

	I	II	III	K
A	○	○	○	○
B	○	○	○	○
H	○	○	○	○

Şekil 2-Absorbsiyon-elüsyon Yönteminde Kullanılan Porttüp Şeması.

Portttübe şekildeki gibi sıralanan Schiff tüpleri etiketlenerek A ve AK tüplerine A grubu, B ve BK tüplerine B grubu, H ve HK tüplerine de O grubu %2'lik eritrosit süspansiyonlarından 1'er damla damlatılmıştır. 3000 devirde 3 dk. santrifüj edilen tüplerdeki aglütinasyonlara bakılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz:

Elde edilen bulgular, özellikle iki konumlu değişkenlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, karar ögelerinin sonuçları arasındaki uyumu değerlendirmede kullanılan kappa yöntemiyle değerlendirilmiştir.

4.BULGULAR

Deneylerden elde edilen bulgular tablolar halinde aşağıda sunulmuştur.

Tablo 4.1: A GRUBU

	ABS-İNHİBİSYON			ABS-ELUSYON		
	Anti-A	Anti-B	Anti-H	Anti-A	Anti-B	Anti-H
1.	-	+	+	+	-	-
2.	-	+	+	+	-	-
3.	-	+	+	+	-	-
4.	+	+	+	-	-	-
5.	-	+	+	+	-	-
6.	+	+	+	-	-	-
7.	-	+	+	+	-	-
8.	-	+	+	Z	-	Z
9.	+	+	+	-	-	-
10.	+	+	+	-	-	-
11.	YN	+	+	+	-	-
12.	+	+	+	-	-	-
13.	-	+	+	+	-	-
14.	-	+	+	+	-	-
15.	-	+	+	+	-	-
16.	-	+	YP	+	-	-
17.	+	+	+	-	-	-
18.	-	+	+	+	-	-
19.	+	+	+	-	-	-
20.	+	+	+	-	-	-
21.	+	+	+	-	-	-
22.	-	+	+	+	-	-
23.	-	+	+	+	-	-
24.	-	+	+	+	-	-
25.	-	+	+	+	-	-
26.	+	+	+	-	-	-
27.	-	+	+	+	-	-
28.	-	+	+	+	-	-
29.	-	+	+	+	-	-
30.	+	+	+	-	-	-
31.	-	+	+	+	-	-
32.	-	+	+	+	-	-
33.	Z	+	+	+	-	-
34.	+	+	+	-	-	-
35.	-	+	+	+	-	-
36.	+	+	+	-	-	-
37.	-	+	+	+	-	-

Tablo 4.2: B GRUBU

		ABS-İNHİBİSYON			ABS-ELUSYON	
	Anti-A	Anti-B	Anti-H	Anti-A	Anti-B	Anti-H
1	+	-	+	-	+	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	-	+	-	Z	-
5	+	-	+	-	+	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	-	+	-	+	-
8	+	-	+	-	+	-
9	+	-	+	-	+	-
10	+	+	+	-	-	-
11	+	-	+	-	+	-
12	+	-	+	-	+	-

**Tablo 4.3: AB GRUBU**

		ABS-İNHİBİSYON			ABS-ELUSYON	
	Anti-A	Anti-B	Anti-H	Anti-A	Anti-B	Anti-H
1	-	-	+	+	+	-
2	-	Z	Z	+	+	-
3	+	+	+	-	-	-
4	-	-	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	-
6	+	+	+	-	-	-

Tablo 4.4: 0 GRUBU

	ABS-İNHİBİSYON			ABS-ELUSYON		
	Anti-A	Anti-B	Anti-H	Anti-A	Anti-B	Anti-H
1	+	+	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	+
3	+	+	Z	-	-	+
4	+	+	+	-	-	-
5	+	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	-	-	-	+
8	+	+	-	-	-	+
9	+	+	-	-	-	+
10	+	+	+	-	-	-
11	+	+	-	-	-	+
12	+	+	Z	-	-	Z
13	+	+	-	-	-	+
14	+	+	-	-	-	+
15	+	+	+	-	-	-
16	+	+	-	-	-	+
17	+	+	-	-	-	+
18	+	+	-	-	-	+
19	+	+	-	-	-	+

Y.N.:Yalancı Negatiflik

Y.P.:Yalancı Pozitiflik

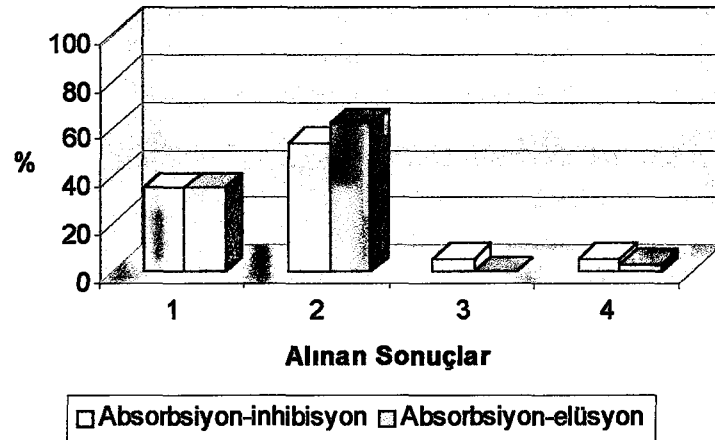
Z: Zayıf aglütinasyon (±)

	Antijen Belirlenemeyen	Doğru Sonuç	Kararsız	Yanlış Sonuç	Total
Absorbsiyon- Elüsyon	% 31,1	% 64,8	% 4,1	-	% 100
Absorbsiyon- İnhibisyon	% 31,1	% 60,8	% 5,4	% 2,7	% 100

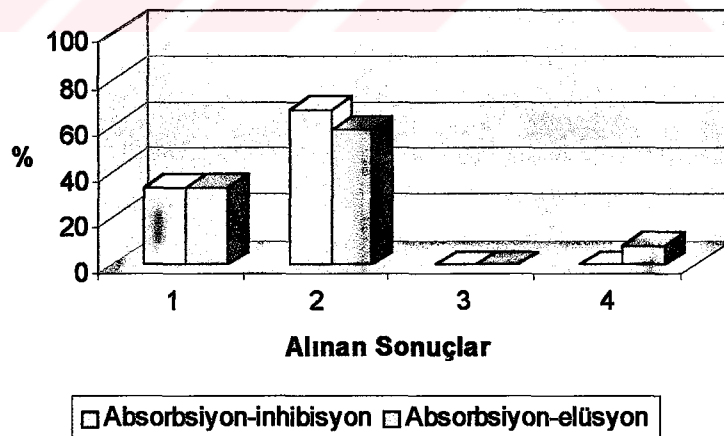
Tablo 4.5.Deneylerden alınan sonuçların yüzde olarak gösterilmesi.

Her kan grubu için absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon yöntemleri kullanılarak elde edilen bulguların karşılaştırılması grafik 4.1-4.4' de sunulmuştur.

Grafik 4.1: A Grubu Örneklerden Elde Edilen Sonuçların % Değişim Grafiği



Grafik 4.2: B Grubu Örneklerden Elde edilen Sonuçların % Değişim Grafiği



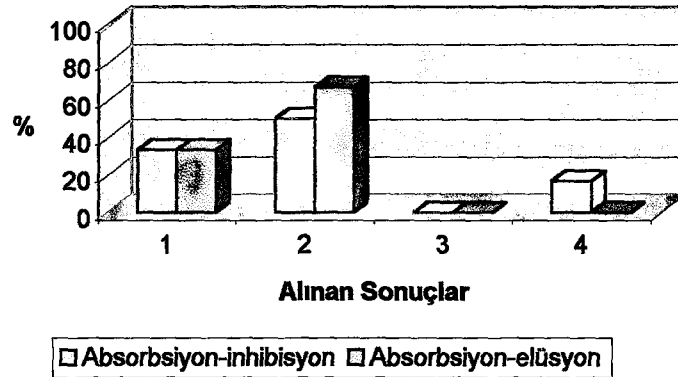
1: Antijensiz,

2: Doğru Sonuç,

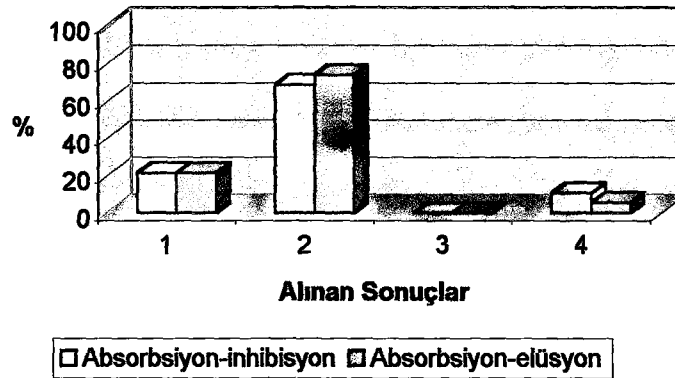
3: Yanlış sonuç,

4: Kararsız

Grafik 4.3:AB Grubu Örneklerden Elde Edilen Sonuçların % Değişim Grafiği



Grafik 4.4:O Grubu Örneklerden Elde Edilen Sonuçların % Değişim Grafiği



1: Antijensiz,

2: Doğru Sonuç,

3: Yanlış sonuç,

4: Kararsız

TARTIŞMA

Bir cinsel saldırı olayında bazen iki farklı kan grubuna sahip kişi hakkında iddia bulunabilir. Bu kişilerden hangisinin cinsel saldırıda bulunduğu anlaşılmaması açısından eritrosit yüzey antijenlerinden çevre şartlarına en fazla direnç gösteren ve araştırılması diğer gruplardan daha kolay olan ABO grubunun incelenmesi gerekir. Toplumun % 77.5'inin sekretör özellikte olduğu dikkate alındığında (Tunalı, 1986), ABO grup tayininin yapılması gerektiği kabul edilmektedir.

Absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon yöntemleri kullanılarak toplam 74 semen lekesi örneğinden ABO grup tayini yapılmıştır. Her iki yöntem de Adli Seroloji de biyolojik materyallerden grup tayininde uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak literatürdeki bazı çalışmalarda absorbsiyon-elüsyon yönteminin daha hassas olduğu belirtilmektedir (Pereira, 1976; Chase, 1986; Oepen, 1988). Bazı kaynaklarda ise absorbsiyon elüsyonun hassas bir metod olmakla birlikte antijen benzeri yapılarla veya mikroorganizmalarla kontaminasyon olduğu durumlarda bazı yanlış pozitif sonuçların alınmasına neden olduğu anlatılmaktadır (Davies, 1984). Bu çalışmada aynı örnekle her iki yöntemle birbirinin ardı sıra çalışılmış ve alınan sonuçlar karşılaştırıldığında doğru sonuçların elde edilmesi bakımından yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. 74 örnekten 23'ünde iki yöntemle de herhangi bir antijenin varlığını belirtecek bir reaksiyon elde edilmemiştir. Bu sonuçların semen lekesinin non-sekretör bireylere ait olması veya semendeki antijen konsantrasyonunun tespit edilemeyecek kadar düşük düzeyde olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Pereira'da yaptığı bir çalışmada aynı bireye ait vücut sıvılarından birine antijen sekresyonu yapılırken, başka bir sıvıya çok az sekresyon yapılabildiği veya hiç yapılamadığı durumlar olduğunu belirtmiştir (Pereira, 1976).

Absorbsiyon-inhibisyon yöntemiyle yapılan 74 deneyden 1'inde yalancı pozitif, 1'inde yalancı negatif reaksiyon görülmüş, 3'ünde ise zayıf aglütinasyon nedeniyle kesin bir sonuca ulaşamamıştır. Herhangi bir antijenin varlığı saptanan örneklerde doğru sonuca ulaşabilme oranı %90.2 olarak bulunmuş, yanlış sonuç alınan ya da zayıf aglütinasyon nedeniyle grubuna karar verilemeyen örneklerin oranı ise %9.8 olarak tespit edilmiştir. Absorbsiyon-elüsyon yöntemiyle yapılan deneylerde yalancı pozitif bir sonuca rastlanmamakla birlikte 3 örnekte zayıf aglütinasyon görülmesi nedeniyle kesin bir sonuç alınamamıştır. Elüsyon yöntemi için herhangi bir antijenin varlığı tespit edilebilen örneklerden doğru sonuca ulaşma oranının %94.2 olduğu belirlenmiştir. Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi absorbsiyon-inhibisyon metoduyla yapılan deneylerde A grubu semen örneklerinden 1'inde yalancı A negatif, 1'inde yalancı H pozitif reaksiyon gözlenmiş; aynı örneklerden yapılan absorbsiyon-elüsyon metoduyla benzer yalancı pozitif veya negatif sonuçlar alınmamıştır. Absorbsiyon-inhibisyon yönteminde tespit edilen yalancı A negatif reaksiyonun örnekteki düşük antijen düzeyi veya ortamda fazla miktarda serbest antiserum kalmasına bağlı olarak meydana gelen deney hatasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Absorbsiyon-inhibisyon yönteminde A grubu donöre ait semen örneğinde gözlenen yanlış H pozitif sonuç ise bireyin A₂ alt gruptan olması durumunda taşıyacağı H antijeni nedeniyle ortaya çıkmış olabilir. Çalışmamız sırasında ABO gruplarının alt gruplarını belirleme olanağımız olmadığı için lekenin

hangi alt gruptan olduğu bilinmemektedir. Ancak Fowler'ın yaptığı bir çalışmada da A grubu bireylerin sekresyonlarında ender olarak H antijen düzeyinin A'dan yüksek olabileceği belirtilmiştir (Fowler, 1985). O grubu 2 lekede ise anti-H ile çok zayıf aglütinasyon tespit edilmiş ve kesin bir tespit yapılamamıştır. Anti-H kullanılan deneylerde gözlenen zayıf aglütinasyonların nedeninin antiserum aktivitesinin yetersizliği olabileceği düşünülmektedir. Graves'de yaptığı bir çalışmada deney sırasında anti-H'nin reaksiyon aktivitesinde azalmalar olduğunu kaydetmiş ve antiserumların aktifliğinin kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamıştır (Graves ve ark., 1978). Kriminal olaylarda, olay yerinde tespit edilen biyolojik deliller genellikle az miktardadır. Küçük miktarlardaki örneklerden ABO gruplandırmasının yapılacağı durumlarda antiserumun dilüe edilmesi gerektiği de çeşitli kaynaklarda belirtilmiştir (Fowler ve ark., 1985).

Çalışmalarda elde edilen zayıf aglütinasyonlara bağlı olarak tabloda (z) olarak gösterilen 7 deneyde lekenin ABO grubu hakkında kesin bir yargıya varılamamıştır. Bu sonuçlar mikroskopik olarak ta değerlendirilmiş, ancak reaksiyonun pozitif ya da negatif olduğu kesinleştirilememiştir. Bu nedenlerle lekeden ABO grup tayini yapılırken birden fazla yöntemle alınan sonucun rapor edilmesinin uygun olacağı belirtilmiştir (Ötke, 1994).

Davies'in elüsyon yöntemiyle yaptığı bir çalışmada yalancı B pozitif reaksiyon tespit edilmiş, yapılan araştırmalarda herhangi bir bakteriyel kontaminasyona rastlanmadığı ve bu sonradan kazanılmış B aktivitesinin kaynağının belirlenemediği rapor edilmiştir (Davies, 1978). Ancak Kubo'nun kan lekeleriyle ve Scott'un tükürük örnekleriyle yaptığı çalışmalarda bazı tür bakteri ve mantarların A, B ve H antijenine benzer

yapılar ürettikleri, *E. coli*, *C. elegance* ve *A. niger* gibi bazı bakterilerin de A, B, H antijenlerini denatüre eden enzimler salgıladıkları belirlenmiştir (Scott ve ark., 1980; Kubo, 1989). Çalışmamızda kullanılan keten kumaşlar muhtemel kontaminasyonların önlenmesi açısından semen lekesi oluşturulmadan önce kaynatılmış ve lekeli materyal kurutulmanın hemen ardından kapaklı karton kutular içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çalışmamızın elüsyon aşamasında bazı kaynaklarda belirtilen yalancı B pozitif bir reaksiyona rastlanmamıştır. ABO grup tayini üzerine güneş ışığı, ısı, nem, toz, zaman gibi faktörlerin etkisi araştırılmış ve bunların çalışmayı sınırlandırıcı faktörler olduğu bildirilmiştir (Bilge, 2003). Bu nedenle lekenin olay yerinden seroloji laboratuvarına hızlı bir şekilde ulaştırılması önemlidir.

Semen lekeleri olay yerinde genellikle mağdura ait kan, idrar ve vajinal salgılar gibi vücut sıvılarıyla karışmış halde bulunur. Mağdurdan alınan vajinal swab örneğinden veya bu lekelerden ABO gruplandırması yapılabilir. Ancak Fowler ve Davies'in sekretör özellikte örnekler kullanarak yaptığı deneylerde diğer vücut sekresyonlarıyla karışmış semen lekelerinden yapılan ABO gruplandırmasında % 66-70 oranında başarılı olunduğu belirtilmiştir (Davies, 1984; Fowler, 1985). Bizim çalışmamızda kullanılan semen lekeleri herhangi bir vücut sıvısıyla karışmamış olduğu için ABO gruplandırmasında daha başarılı sonuçlar alınmıştır. Verilerimizde % 90-94 müsbet sonuç alınması bu incelemenin yapılma gerekliliğini göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler Kappa yöntemiyle değerlendirilmiş ve Standart Sapma 0,67 ve $P=0,000$ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel verilerde $P<0,001$ değerinin tespit edilmesi

her iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Son yıllarda DNA ile yapılan çalışmaların vücut sıvılarına ait lekelerden bireysel özelliklerin ortaya çıkarılmasında yüksek güvenilirlik oranına sahip olması nedeniyle adli vakalarda DNA çalışmaları ağırlık kazanmıştır. Lekedeki biyolojik materyalin azlığı, kontaminasyon ve denatürasyon gibi DNA çalışmalarını kısıtlayıcı faktörler olsa da PCR ve STR gibi yüksek hassasiyete sahip metodların geliştirilmesiyle kriminal alanda DNA uygulamalarında daha başarılı sonuçlar alınmaya başlamıştır. Vücut sıvılarına ait lekelerden DNA analizini yapamadığı durumlarda vücut sıvılarına ait lekelerden ABO grup tayini için kullanılan absorpsiyon-inhibisyon ve absorpsiyon-elüsyon teknikleri kolay uygulanabilir, az miktarda örnekle çalışmaya elverişli ve düşük maliyetli yöntemler olmaları bakımından tercih edilebilir. Tek yöntemle grup tayini yapmak yerine absorpsiyon-inhibisyon ve absorpsiyon-elüsyon yöntemlerinden birlikte yararlanılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

6.SONUÇ

Bu çalışmada cinsel saldırı vakalarında olay yerinde çoğunlukla yatak ve giysiler üzerinde bulunan semen lekelerinden ABO gruplandırmasında yaygın olarak kullanılan absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon metotları, kumaşlar üzerine oluşturulan semen lekelerine ardışık olarak uygulanmış ve deney sonuçları birbiriyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre her iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı, ancak özellikle H antiserumu kullanılan deneylerde absorbsiyon-elüsyon yöntemiyle, absorbsiyon-inhibisyona göre daha kuvvetli aglütinasyonların tespit edildiği belirlenmiştir. Semen lekelerinden ABO gruplandırması yapılırken her iki yöntemi de kullanarak sonuçların değerlendirilmesinin uygun olacağı kanaatine varılmıştır. Ancak iki metot da non-sekretör bireylerin vücut sıvılarından ABO grubunu saptamaya elverişli olmadığından hiçbir antijenin tespit edilemediği durumlarda daha spesifik yöntemler uygulanmalıdır.

ÖZET

Semen Lekesinden ABO Grup Tayininde Kullanılan Absorbsiyon-Inhibisyon ve Absorbsiyon-Elüsyon Metodlarının Karşılaştırılması Hakkında Bir Çalışma

Cinsel saldırı ve ırza tecavüz gibi kriminal olaylarda, çoğunlukla olay yerindeki eşyalar veya mağdurun giysileri üzerinde saldırgana ait biyolojik materyaller ve sekresyon lekeleri bulunabilir; bunlardan en sık karşılaşılanı semendir. Günümüzde semen lekelerinden ABO gruplandırması ve DNA analizi yapılarak saldırganın kimliği belirlenebilmektedir.

Vücut sıvılarına ait lekelerden kan gruplarını belirlemek için kullanılan absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon yöntemleri, leke tespit edilebilecek miktarda antijen içeriyorsa, düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve güvenilirliği yüksek metodlar olmaları bakımından Adli Tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte donörün non-sekretör özellikte olması veya lekedeki antijen miktarının yetersizliği, sıcaklık, nem, ışık, kontaminasyon ve leke yaşı her iki yöntemin uygulanabilirliğini kısıtlayan etkenlerdir.

Bu çalışmada 74 semen lekesinden absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon yöntemleri ardışık olarak kullanılarak ABO gruplandırması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık olmamakla birlikte bazı örneklerde elüsyon yönteminin H antijenini belirlemede daha hassas olduğu belirlenmiştir. Lekeli örneklerin DNA analizi için elverişli olmadığı durumlarda absorbsiyon-inhibisyon ve absorbsiyon-elüsyon metodları,

saldırmanın kan grubunu tespit etmede güvenilir yöntemler olmaları bakımından tercih edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Semen lekeleri, ABO Kan grubu, absorpsiyon-inhibisyon, absorpsiyon-elüsyon, Adli Biyoloji.



SUMMARY

A Research for Comparing the Absorption-Inhibition and Absorption-Elution Methods, Used for ABO Grouping on Semen Stains.

In many criminal cases, such as rape or attack the attacker leaves some biological materials and secretion stains at crime scene or on the clothes of the victim. Semen stains are the most frequently stains seen at the crime scene. Recently ABO grouping or DNA analyzing can be used for revealing the blood group or some identifications of the attacker from semen stains.

Absorption-inhibition and absorption-elution methods, are cheap, practical and sensitive methods when there are sufficient antigens for blood grouping in forensic researches. But non-secretor status or insufficient antigen level of donor, the temperature, the humidity and the light of the incident site, contamination and age of the stain are the limiting factors while putting the methods on practice.

In this research, absorption-inhibition and absorption-elution methods are consecutively applied on 74 semen stains for ABO grouping. It's concluded that there is no clear difference between the methods, but elution method is found more sensitive to determine H antigen in some material. If the stain is not suitable for DNA analyzing both of absorption-inhibition and absorption-elution methods can be preferred for ABO grouping due to reliability.

Key Words: Semen stains, ABO blood groups, absorption-inhibition, absorption-elution, Forensic Biology.

KAYNAKLAR

ACAR, K., (1994) Semen lekesi tespitinde kullanılan asit fosfataz test kağıtlarının kullanılabilirliği ve güvenilirliği. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi A.B.D

ACKERMAN, D.R., (1969) The Adsorption of Anti-A and Anti-B Antibodies on Human Spermatozoa., *Fertil Steril.*, 20:324-334.

AKÇAY, M. (1969). Kan Fizyolojisi, s:37-40, Güven Matbaası, Ankara.

AKSOY, M. (1975), Hematoloji, s:66-90, Sermet Matbaası, İstanbul.

AYKAÇ, M. (1993) Adli Tıp, s:212-220, Nobel Kitabevleri, İstanbul..

A.T.U.D.(1999) Birinci Basamak İçin Adli Tıp El Kitabı, Adli Tıp Uzmanları Derneği, s:119.

BAECHTEL, F., (1985) Secreted Blood Group Substances:Distributions in semen and Stabilities in Dried Semen Stains., *J.of.For.Sci.*, Oct. 1985, 30(4): 1119-1129.

BASLER, G: (1986.) Determination of the Lewis Blood Group Substances in Stains of Forensically Relevant Body Fluids., *For. Sci. Int.*, 30: 29-35.

BAŞARAN, N. (1999) Tıbbi Genetik, 7.Baskı, s:354-35 Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul

BİLGE, Y. (2002), Adli Bilimler Sözlüğü, s:196, Palme Yayıncılık, Ankara.

BİLGE, Y. (2003), Adli Bilimlere Ait Kaynaklar Özet Kitabı, s:16,386., Palme Yayıncılık, Ankara.

BOZKIRLI, İ. (1987): Yeni Üroloji, s:591-609, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.

BÜYÜKYÜKSEL, C.(1974) Kan Grupları Klinik ve Teknik Tatbikatı, s: 18-25,. Yenilik Basımevi, İstanbul.

CHASE, M.G. (1986.) ABO Typing Studies on Liquid Urines., *J of For.Sci*, 31(3): 881-885.

DAVIES, A., LINCOLN, P. (1984) Abberant Group B Reactions Detected in Mixtures of Semen and Vaginal Secretions Possibly Due to Acquired B. *For. Sci. Int.*, 25 :201-208.

DARMADY, E.M. , DAVENPORT, S.G.T. (1958) Hematological Technique, Second Edition, p:191-212, J and A.Churchill Ltd, London.

DAVIES, A. (1988): The ABH Reactions of Seminal Stains. *For. Sci. Int.* 37: 105-155.

FOWLER, J.C.S., SCOTT A.C. (1985).: Examination of the Corelation of Groupings in Blood and Semen., *J of For. Sci.*, 30, (1): 103-113.

GRAVES, M.H., WHITE, J.M., FITZPATRICK, G.A., KUO, M.C. (1978).: A Comparation of Absorbtion-Inhibition and Absorbtion-Elution Methods in the Detection of ABO(H) Antigens Found in Vaginal Samples Submitted in Sexual Offense Cases., *J of For. Sci.*, 23 : 345-352.

GÖK, Ş. (1984), Adli Tıp Pratiği, 2. Baskı, s:43-55. , Filiz Kitabevi, İstanbul..

HEKMAN, A., RUMKE, P. (1969) The Antigens of Human Seminal Plasma., *Fertil Steril.* 20: 312-323.

HOOFT, P.J., Van de VOORDE, H.P (1990) The Zinc Test Alternative for Acid Phasphatase Spot Tests in the Primary Identification of Seminal Traces., *For. Sci. Int.*, 47: 269-275.

HOOFT, P.J., Van de VOORDE. (1992) H. Evaluation of the Modified Zinc Test and the Acid Phosphatase Test as Preliminary Screening methods in Sexual Assault Case Material., *For. Sci. Int.*, 53: 135-141.

(<http://www.atk.gov.tr/tr/pages/mevzuat/yasa/atk.htm>., 30.04.2004)

KAMANEV, L., LECLERCO, M. and GERARD, Ch. F. (1989) An enzyme immunoassay for prostate spesific P30 antigen detection in the post coital vaginal tract., *J. For. Sci. Soc.*, 29:233-241.

KEATING, S.M. (1989) İnformation from Penile Swabs in Sexual Assault Cases., *For. Sci. Int.*, 43: 63-81.

KENDİ, İ. Ö., AKSOY, Y.M., ACAR, K., BİLGE, Y., IŞIK, A.F. (1993) Semen Lekesinin Tespitinde Asit Fosfataz testinin kullanılabilirliği ve güvenilirliği 7. Ulusal Adli Tıp Günleri Poster Sunuları Kitabı, Antalya, s:399-404.

KEREK, G. (1974) Distribution of the Blood Group Antigens A and B on Human Spermatozoa.,*Int. J.Fertil*, 19 : 181-191.

KIND, S.S. (1960) Absorbtion-Elution Grouping of Dried Blood Smears., *Nature* ., 185 (6) : 397-398.

KLOOSTERMAN, A.D, Pouw-Arnou, M., Persijn, J.P. (1984): Comparision of Enzyme Assay And Radio İmmunoassay for the measurement of Human Acid phosphatase in cases of Sexual Assault,, *For. Sci. Int.*, 25 : 45-55.

KOBAYASHII, T., YOKOTA, M., MITANI, T., AKANE, A. (1999) Effects of solvent displacement on sensitivity and specificity of monoclonal antibodies for ABO blood grouping of forensic specimens with absorption-elution test., *Legal Medicine*, 1: 68-75.

KOBUS, J.H, SILENIEKS E, SCHARNBERG, J. (2002) Improving The Effectiveness of Fluorescence for the Detection fo Semen Stains on Fabrics., *J.of For. Sci.*, July 2002., 47(4): 819-823.

KUBO, S., (1989) Changes in the Speciifcity of Blood Groups Induced by Enzymes from Soil Fungi., *J. of For. Sci.*, 34(1): 96-104.

LEE, H.C., GAENSLEEN, R.E., PAGLIARO, E.M., NOVITCH, B. (1988) Two-Dimensional Absorbtion-Inhibition. ,*J. of For. Sci.*, 33(5): 1127-1138.

LEE, C.H., LADD, C., BOURKE, T.M., PAGLIARO, E., TIRNADY, F. (1994) DNA Typing in Forensic Science., *The American Journal of For. Medicine and Pathology.*, 15 (4): 269-282.

MUDD, J.L. (1989) The Detection of Soluble ABH Blood Group Substances in Semen and Saliva Using Monoclonal Blood Grouping Reagents., *Journal of For. Sci.*, Sept. 1989; 34(5): 1082-1089.

OEPEN, I. (1988) Identification of Characteristics in Blood and Semen Stains- A Review, *For. Sci. Int.*, vol:36, p:183-191.

ÖNDER, A. (1994).Türk Ceza Hukuku Özel Hükümler, 4.Baskı, s:444-448, Filiz Kitabevi,İstanbul.

ÖTKER, C.(1994). Kan Lekesinden ABO Grup Tayininde Absorbsiyon-İnhibisyon ve Absorbsiyon-Elüsyon Yöntemlerinin Ardışık Olarak Kullanılmasının Güvenilirliği Hakkında Bir Araştırma. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp A.B.D.

ÖZDİLER, E., MÜFTÜOĞLU, Y.Z. (1998) Klinik Üroloji., S: 365-373, Antıp Yayınları, Ankara.

ÖZTÜREL, A. (1971) Adli Tıp, s:278-282., Güzel İstanbul Matbaası, Ankara.

PEREIRA, M., MARTIN, P.D. 1976. : Problems Involved in the Grouping of Saliva, Semen and Other Body Fluids., *J of For. Sci. Soc.*,vol:16, s:151-154.

PFITZINGER, H., LUDES, B., MANGIN, P. (1993) Sex Determination of Forensic Samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y- spesific and an x-spesific DNA sequence, *Int.J.Leg.Med.*, 105: 213-216.

PFLUG, W., BASSLER, G., EBERSPACHER, B. (1989). ABO and Lewis Typing of Secretion stains on Nitrocellulose membranes using a new Dot-Blot Elisa technique., *For. Sci. Int.*, 43: 171-182.

QUINLIVAN, L.G. (1969) The Spesific Antigens of Human Seminal Plasma., *Fertil Steril*, 20: 58-66.

RACE RR, SANGER R. (1969). Blood Groups in Man. 5th ed., Oxford ,Blackwell Scientific Pub., p:291-301

SCACCIATI, M.J., MANCINI E.R. (1975) Soluble and Insoluble Antigens of Human Spermatozoa., *Fertility and Sterility*. 26 (1) : 7-12.

SCOTT, M.L., CARRY, J.E.L. (1980) Effect of Blood Group Active Micro-organisms on the ABO Grouping of Human Whole Saliva., *For. Sci. Int.*, 16:87-100.

SOYZA, K., GARLAND, D.G (1988) Studies and Observations on Lewis Grouping of Body Fluids and Stains, *For.Sci.Int.*, 38: 129-137.

SOYZA, K. (1991): Evaluation of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELIZA) Method for ABO and Lewis Typing of Body Fluids in Forensic Samples., *For. Sci. Int.*, 52: 65-76.

STOILOVIC M. (1991). Detection of Semen and Bloodstains Using the Polilight as a Light Source., *Forensic Sci. Int.*;51: 289-296.

SUZUKİ, O., ASANO, M., KIDO, A. and OYA, M. (1983) Zinc Test as a New Tool for Identification of Human Seminal Stains., *For. Sci. Int.* 22, 231-235.

SOYASLAN, D.(1996), Özel Hükümler, c.2:17-18, Savaş Yayınevi, Ankara.

TUNALI, I., KENDİ, Ö., ZENTÜRK, C. (1986) Absorbsiyon Metodu Kullanılarak Kan Grupları ile Tükrük Lekeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması., *Ankara Tıp Mecmuası*., 39: 61-66.

TUNALI, I. (1995) Adli Tıp, 2.Baskı, s:34-54, Atilla Kitabevi, Ankara.

WILLOT G. M. ALLARD J.E. (1982) Spermatozoa-Their Persistence after Sexual Intercourse., *For. Sci. Int.*, 19: 135-154.

WILLOT. G.M. (1982) Frequency of Azoospermia., *For.Sci.Int.*, 20: 9-10.

WINTROBE, M. M. (1967) Clinical Hematology, Sixth Edition: 367-409., Philadelphia.

YAVUZ, M.F. (1996) Cinsel Saldırı Olgularının Değerlendirilmesinde Yeni Bir Yaklaşım, *Adli Tıp Dergisi.*, 12: 155-160.

