



Praca oryginalna
Original paper

Said S. Elshama^{1,2}, Sanaa M. Aly¹, Metwally E. Abdalla¹, Wael A. Hassan³

Pośmiertna identyfikacja plemników na skórze ludzkiej przy wykorzystaniu znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał monoklonalnych

Postmortem identification of spermatozoa on human skin based on fluorescent monoclonal antibody method

¹Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

²College Medicine, Taif University, Saudi Arabia

³Pathology Department, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

Streszczenie

Identyfikacja śladów nasienia ma istotne znaczenie, zwłaszcza w sprawach wymagających potwierdzenia, że doszło do napaści na tle seksualnym. Przy wykrywaniu nasienia specjaliści medycyny sądowej zazwyczaj wykorzystują metodę wymazu z pochwy, choć ważną rolę odgrywa także analiza obecności nasienia na skórze. Pośmiertna identyfikacja plemników na skórze objętej rozkładem gnilnym stanowi przedmiot ciągłych badań. Sperm Hy-Liter™ jest techniką bazującą na przeciwciałach, która może być wykorzystywana w medycynie sądowej do identyfikacji główek plemników ludzkich w zaplamieniach biologicznych. Technika może wyeliminować trudności z wizualizacją plemników, które występują w metodzie tradycyjnej. Celem pracy było porównanie metody konwencjonalnej (mikroskop optyczny oraz barwienie hematoksyliną i eozyną) z metodą fluorescencyjną (mikroskop fluorescencyjny i barwienie z wykorzystaniem zestawu Sperm Hy-Liter™) w pośmiertnej identyfikacji plemników na skórze ludzkiej w różnych odstępach czasowych. Fragment skóry ludzkiej podzielono na trzy skrawki. Pierwszy stanowił ujemną próbkę kontrolną, natomiast na drugim i trzecim skrawku skóry rozprowadzono nasienie. Pierwszy (kontrolny) i drugi skrawek skóry wybarwiono hematoksyliną i eozyną w celu obserwacji pod mikroskopem optycznym. Trzeci skrawek poddano barwieniu przy wykorzystaniu zestawu Sperm Hy-Liter™, a następnie analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Okres identyfikowalności plemników wynosił do 110 dni przy zastosowaniu zestawu Sperm Hy-Liter™ i mikroskopu fluorescencyjnego oraz do 12 dni w przypadku próbek barwionych hematoksyliną i eozyną, a następnie analizowanych pod mikroskopem optycznym. Zaleca się przeprowadzenie kolejnych badań w celu weryfikacji dokładności zastosowanej metody pośmiertnej identyfikacji plemników na skórze ludzkiej, a także oceny czasu ich utrzymywania się w poszczególnych lokalizacjach ciała i na różnych materiałach.

Słowa kluczowe: plemniki, identyfikacja, napaść na tle seksualnym, analiza mikroskopowa.

Abstract

Identification of semen residues has relevant consequences, especially for what concerns the ascertainment of possible sexual assault. Forensic scientists usually focus on the vaginal swab for semen detection despite the importance of semen deposition on the skin. Postmortem identification of spermatozoa on putrefied human skin is still under investigation. Sperm Hy-Liter™ is an antibody technique, used to identify human spermatozoa heads in forensic stains. This approach has the potential to eliminate spermatozoa visualization problems in a traditional method. Therefore, the present study aimed to compare between the traditional method (light microscope and staining via hematoxylin/

eosin) and a fluorescence-based method (by using fluorescent microscope and staining via Sperm Hy-Liter™) for post-mortem identification of spermatozoa on human skin at different time intervals. A piece of human skin was divided into three strips; the first was a negative control while semen was spread on the second and third skin strips. The first (control) and second groups were stained by hematoxylin/eosin for light microscopic examinations. The third group was stained by Sperm Hy-Liter™ then examined under fluorescent microscope. The results revealed that the spermatozoa identifiability was up to 110 days based on Sperm Hy-Liter™ and fluorescent microscope, while it was up to 12 days via using hematoxylin/eosin and light microscope. Further studies are recommended in order to verify not only the accuracy of the used method on skin of dead victims but also to evaluate persistence of spermatozoa on different body sites and fabrics.

Key words: spermatozoa, identification, sexual assault, microscopy.

Wprowadzenie

Identyfikacja śladów nasienia ma istotne znaczenie, zwłaszcza w sprawach wymagających potwierdzenia, że doszło do napaści na tle seksualnym [1]. Komórki skóry są najliczniejszym typem komórek w śladach kontaktowych. Ponieważ komórki te nie zawierają dużo DNA, nawet niewielkie ilości płynów ustrojowych o wyższej zawartości DNA mogą wpływać na analizy genetyczne [2]. Najczęściej w badaniach wykorzystuje się wymazy z pochwy oraz zewnętrznych narządów płciowych. Opisano jednak przypadki, w których u tej samej ofiary analiza wymazu z odbytu, pochwy i jamy ustnej nie potwierdziła obecności plemników, natomiast analiza wymazu ze skóry pośladków dała wynik dodatni [1].

Podjęte są intensywne działania w celu poprawy czułości metod wykrywania plemników umożliwiających potwierdzenie napaści na tle seksualnym. Wiele z tych metod wykazuje wprawdzie skuteczność w identyfikacji plemników, jednak optymalizacja ich stosowania wymaga przeszkolenia personelu i drogiego sprzętu. Obecność plemników nadal potwierdza się metodą mikroskopową, choć jest ona czasochłonna i pracochłonna, zwłaszcza gdy zawartość plemników w danej próbce jest niska [3]. Barwienie hematoksyliną i eozyną (HE) jest techniką najczęściej opisywaną w literaturze [4], jednak pojawiają się doniesienia, że DNA związane hematoksyliną tworzy kompleks odporny na wytrawianie i replikację enzymatyczną. Ponadto eozyna jest barwnikiem o kwaśnym odczynie i może powodować uszkodzenia DNA [5].

Introduction

Identification of semen residues has relevant consequences, especially for what concerns the ascertainment of possible sexual assault [1]. Skin cells are the most abundant cell type in contact traces. Skin cells do not contain much DNA, thus minute amounts of body fluids that have higher DNA contents may affect the genetic analyses [2]. Most frequently swabs are obtained from the vaginal cavity and the outer genitalia. It has been reported that the anal, vagina and oral smears were negative for spermatozoa, whereas those from skin at buttocks were positive in the same victim [1].

Many efforts have been done to enhance the sensitivity in searching for spermatozoa to diagnose sexual assault. Although many of these methods succeed in identifying spermatozoa but require training and expensive equipment with optimization. The microscopic detection of spermatozoa is still used as a confirmatory method despite the spermatozoa examination under the microscope is time consuming and labor-intensive especially with low numbers of spermatozoa [3]. Despite hematoxylin and eosin (HE) is the most commonly described in literature [4], it is reported that hematoxylin-bound DNA results in a complex that is resistant to digestion and enzymatic replication. Besides, Eosin is an acidic dye, which could be responsible for DNA damage [5].

Sperm Hy-Liter™ (IFI, Hillside, IL) jest zestawem do barwienia fluorescencyjnego służącym do wykrywania plemników przy wykorzystaniu mysich przeciwciał monoklonalnych Alexa Fluor 488 przeciwko białkom zawartym w główkach plemników ludzkich. Analiza przy użyciu Sperm Hy-Liter™ to swoiste i czułe badanie potwierdzające obecność plemników pochodzenia ludzkiego za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (MF) bez żadnych reakcji krzyżowych z płynami ustrojowymi [3, 6]. Wybarwienie jąder potwierdza, że rejestrowany sygnał Alexa Fluor 488 ma związek z obecnością główek plemników zawierających DNA, nie wpływając przy tym na odzysk DNA [6].

Według wiedzy autorów w literaturze dostępnych jest bardzo niewiele prac, w których oceniano utrzymywanie się plemników na skórze objętej procesem rozkładu za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) [1]. Nie opublikowano też danych na temat wykorzystania metody bazującej na przeciwciałach monoklonalnych i MF do analizy obecności plemników na skórze martwych ofiar. W związku z tym celem niniejszej pracy było ustalenie, przez jak długi okres możliwe jest wykrycie plemników na skórze przy wykorzystaniu zestawu Sperm Hy-Liter™ i MF w porównaniu z metodą tradycyjną obejmującą barwienie HE i analizę pod mikroskopem optycznym (MO).

Material i metody

Próbki pobrano ze zdrowej skóry kończyny dolnej po amputacji powyżej kolana, z okolicy położonej z dala od marginesu tkanek objętych urazem. Fragment skóry podzielono na trzy skrawki, z których jeden stanowił ujemną próbkę kontrolną. Nasienie ludzkie pozyskano ze świeżego ejakulatu pochodzącego od zdrowego mężczyzny, przechowywanego w -20°C w jałowym pojemniku. Po całkowitym rozmrożeniu próbka nasienia została poddana kilkukrotnemu mieszaniu i pipetowaniu, aby zapewnić jej jednorodność. Nasienie rozprowadzono na skrawkach skóry stanowiących drugą i trzecią próbkę. W tym celu na jednakową powierzchnię skóry (1×2 cm) naniesiono pipetą 50 μl nasienia i rozprowadzono równomiernie przy użyciu czystej pałeczki szklanej. Następnie próbki skóry pozostawiono w temperaturze pokojowej ($22-25^{\circ}\text{C}$). Badanie uzyskało pozytywną opinię komisji bioetycznej przy Wydziale Medycyny Uniwersytetu Suez Canal w Egipcie. Komisja zaaprobowała pominięcie świadomej zgody, ponie-

Sperm Hy-Liter™ (IFI, Hillside, IL) is a fluorescent kit used for detection of spermatozoa by using an Alexa Fluor 488 mouse monoclonal antibody directed against proteins contained in the human spermatozoa heads. Furthermore, it is considered a specific, sensitive and confirmatory test for spermatozoa of human origin by using fluorescent microscope (FM) without any cross-reaction with other human body fluids [3, 6]. The nucleus staining provides confirmation that the Alexa Fluor 488 signal observed is related to a DNA-containing spermatozoa heads but without any influence on DNA recovery [6].

To author's knowledge, there are very few studies that assessed the persistence of spermatozoa on decomposed skin by using scanning electron microscope (SEM) [1]. In addition, there is no published data about using monoclonal antibody approach and FM to evaluate the persistence of spermatozoa on skin of dead victims. Therefore, this study aimed to determine for how long Sperm Hy-Liter™ and FM could identify spermatozoa deposited on skin in comparison to the traditional method; HE and light microscope (LM).

Material and methods

The skin specimens were obtained from healthy part of the skin after above knee amputation far from the traumatized margin. Skin was divided into three groups. The first group served as a negative control. Semen was obtained from residuals of freshly ejaculated normal human sample then was stored at -20°C in a sterile cup. After complete thawing of the stored semen sample, multiple stirring and pipetting were done to ensure homogeneity of the sample. The semen was distributed on the strips of the second and third groups. 50 μl of semen was added by pipette every equal surface area (1×2 cm). Each volume was distributed with clean small glass stick to cover the surrounded surface area with the semen. Then, skin was left at room temperature ($22-25^{\circ}\text{C}$). This research was approved by the research ethics committee of the Faculty of Medicine – Suez Canal University. The research ethics committee approved to waive the consent as it only deals with anonymized residual samples without any personal reference.

waż w badaniu wykorzystano wyłącznie anonimowe próbki bez możliwości identyfikacji osobowej.

Badanie metodą tradycyjną

Pierwszą i drugą próbkę analizowano co 3 dni aż do uzyskania wyniku ujemnego w obu próbkach. Następnie analizowano je co 10 dni aż do uzyskania wyniku ujemnego w trzeciej próbce. W każdym przedziale czasowym z lewej strony pierwszej i drugiej próbki skóry pobierano fragment o wymiarach 1×1 cm. W piśmiennictwie zwracano uwagę, że w przeciwieństwie do obserwacji bezpośredniej przy pobieraniu wymazu z próbki istnieje ryzyko niewykrycia plemników z powodu pominięcia fragmentów i zatrzymania plemników w próbce [1]. W związku z tym zrezygnowano z wymazu i zdecydowano o barwieniu HE całej próbki. Według wiedzy autorów jest to pierwsze badanie wykonane wg tej procedury. Obie próbki wybarwiono oddzielnie HE i poddano analizie pod MO na obecność plemników. Plemniki w obrębie warstwy naskórkowej w 4 różnych polach widzenia zliczono automatycznie przy użyciu oprogramowania do analizy obrazów (Image J, National Institute of Mental Health, US). Następnie obliczono średnią liczbę komórek. Żywe plemniki zidentyfikowano dzięki regularnym, jednolitym jądom komórkowym nawet przy braku idealnych wstawek i witek, które mogły ulec rozpadowi na skutek wyschnięcia [7].

Badanie z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych

Przygotowanie ekstraktu

Analizy wykonywano co 3 dni aż do uzyskania ujemnych wyników w pierwszych dwóch próbkach, a następnie co 10 dni. Analizowano też ujemną próbkę kontrolną nienaruszonej skóry po wybarwieniu z użyciem Sperm Hy-Liter™ na początku doświadczenia. W każdym przedziale czasowym pobierano fragment o wymiarach 1×1 cm z trzeciego skrawka skóry. Próbkę umieszczano w próbówce mikrowirówki i inkubowano w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) w temperaturze pokojowej przez godzinę ze sporadycznym wytrząsaniem. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w homogenizatorze ultradźwiękowym przez 20 minut, aby usprawnić oddzielanie komórek ze skóry. Następnie próbkę wyjęto z próbówki i odwiro-

Examination based on traditional method

The samples of the first and second groups were examined every 3 days until both groups became negative then both were examined every 10 days, till the third group became negative. At each interval, a 1×1 cm skin area was taken from the left side of the first and second group strips. Because it was declared that spermatozoa may not be detected because fragments may be more easily left behind and trapped after taking swab from the sample, as opposed to looking at it directly [1]. Therefore we stained the whole skin with HE, instead of taking swab. Both groups were treated separately by HE and examined by LM, to detect the spermatozoa. The number of spermatozoa present over the epidermal skin covering, in four different microscopic fields was counted automatically using image analysis software (Image J, National Institute of Mental Health, US) and the average number of cells was calculated. Viable sperms were identified with their regular uniform nuclei, even in the absence of perfect bodies and tails, due to their possible disintegration because of the dryness [7].

Examination based on monoclonal antibody approach

Extract preparation

The examination of third group was done every 3 days, until the appearance of negative result of first two groups, then every 10 days. The examination was also done for a negative control sample of intact skin after staining with Sperm Hy-Liter™ at the beginning of experiment. At each time interval, a 1×1 cm skin sample was taken from the third group strip. The sample was placed into a micro-centrifuge tube and incubated in a phosphate buffered saline (PBS) at the room temperature for 1 hour with occasional vortexing. Then it was incubated in a sonicator water bath for 20 minutes to improve the release of cells from the skin. After that skin sample was removed from the tube and centrifugated for 1 minute at 13,000 rpm (round per minute). The supernatant was removed by a fine-tipped pipette, while the pellet

wywano przez minutę z prędkością 13 000 obr./min. Supernatant usunięto pipetą z wąską końcówką, a osad komórek zawieszono w 75 μ l PBS, aby rozprowadzić 50 μ l ponownie zawieszony próbki w okrągłym okienku na płytce testowej zestawu Sperm Hy-Liter™ końcówką pipety. Próbkę odstawiono do wyschnięcia na powietrzu (do czasu, aż w okienku nie było widocznej cieczy). Wysuszone płytki testowe niezwłocznie barwiono przy wykorzystaniu zestawu Sperm Hy-Liter™.

Barwienie z użyciem Sperm Hy-Liter™

Procedura barwienia przy użyciu zestawu Sperm Hy-Liter™ (IFI, Hillside, IL) była zgodna z protokołem zalecanym przez producenta. Barwienie płytek testowych wykonywano w następującej sekwencji:

- 1) wprowadzenie 2 kropli utrwalacza (biała nasadka) i inkubacja przez 15 minut, przemywanie buforem myjącym 1X;
- 2) wprowadzenie 2 kropli roztworu do przygotowania próbki (żółta nasadka) oraz 2 ml 1 M 1,4-ditiotreitolu (DTT), inkubacja przez 15 minut, a następnie przemywanie buforem myjącym 1X;
- 3) wprowadzenie 2 kropli roztworu blokującego (czarna nasadka), inkubacja przez 15 minut, a następnie przemywanie buforem myjącym 1X;
- 4) wprowadzenie 2 kropli roztworu do wybarwienia główek plemników (zielona nasadka), inkubacja przez 15 minut, przemywanie buforem myjącym 1X;
- 5) wprowadzenie 1 kropli środka do osadzania preparatu (niebieska nasadka).

Analiza pod mikroskopem fluorescencyjnym

Wybarwione płytki analizowano pod mikroskopem odwróconym CKX41 (Olympus, Tokio, Japonia) z filtrem dla izotiocyanianu fluoresceiny (FITC). Każdą z płytek skanowano w całości, rejestrując obrazy cyfrowe w pozytywie i negatywie. Główki plemników identyfikowano, badając kształt, wielkość i barwę sygnału uzyskanego w filtrze FITC [8]. Później automatycznie zliczano plemniki przy użyciu oprogramowania J.

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet SPSS (wersja 17). Średnią liczbę plemników w drugiej i trzeciej próbce porównywano w każdym przedziale czasu-

cells were re-suspended in 75 μ l of PBS in order to place 50 μ l of the re-suspended sample and spread in a circular sample window of a Sperm Hy-Liter™ slide via using the pipette tip. Allow the sample to air dry until no liquid remains in the sample window. The dried slides were processed immediately for Sperm Hy-Liter™ staining.

Sperm Hy-Liter™ staining

The staining procedure for the Sperm Hy-Liter™ kit (IFI, Hillside, IL) was followed according to the manufacturer's suggested protocol. The slides were stained as in the following:

- 1) addition of 2 drops of fixative (white cap) and incubation for 15 minutes, then wash with 1X wash buffer;
- 2) addition of both 2 drops of the sample preparation solution (yellow cap) and 2 ml of 1 M 1,4-Dithiothreitol (DTT) then incubation for 15 minutes followed by washing with 1X wash buffer;
- 3) addition of 2 drops of blocking solution (red cap) and incubation for 15 minutes, then wash with 1X wash buffer;
- 4) addition of 2 drops of the sperm head stain solution (green cap) and incubation for 15 minutes, then wash with 1X wash buffer;
- 5) addition of 1 drop of the mounting medium (blue cap).

Fluorescent microscopic examination

The stained slides were examined by using CKX41 inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) using FITC (green fluorescein isothiocyanate) filter. Each slide was scanned from side to side, and digital images of positive/negative slides were taken. The spermatozoa heads were identified by examining the shape, size and color of the stained signal under FITC [8]. Then, automated spermatozoa counts were done by image J software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using SPSS version 17. The averages of spermatozoa in second and third studied groups were compared at each time interval by using Student's *t* test.

wym, używając testu *t*-Studenta. Za statystycznie istotne przyjęto wartości $p < 0,05$.

Wyniki

Jak przewidywano, próbki skóry wykorzystane w badaniu były objęte rozkładem gnilnym z towarzyszącym ścięciem. Cechy te były widoczne zarówno makroskopowo (okiem nieuzbrojonym), jak i mikroskopowo (w badaniu MO). Wyniki analizy na obecność plemników dla pierwszej próbki (kontrolnej) były ujemne we wszystkich przedziałach czasowych (ryc. 1A).

W przypadku drugiej próbki wynik analizy pod MO był zdecydowanie dodatni po 3 dniach od rozprowadzenia nasienia (ryc. 1B) oraz dodatni (mniejsza liczba plemników) po 6–9 dniach (ryc. 2A). W 12. dniu zaobserwowano niewyraźne, zaokrąglone struktury (o wyglądzie jąder żywych komórek) powyżej warstwy keratynowej skóry (ryc. 2B), które w pewnym stopniu przypominały plemniki. Po 12 dniach w obrębie skóry objętej rozkładem gnilnym nie stwierdzono śladów plemników (ryc. 3A, B).

W trzeciej próbce analiza MF pozwoliła wykryć plemniki aż do 110. dnia po rozprowadzeniu nasienia. Zaobserwowano, że liczba plemników zmniejsza się

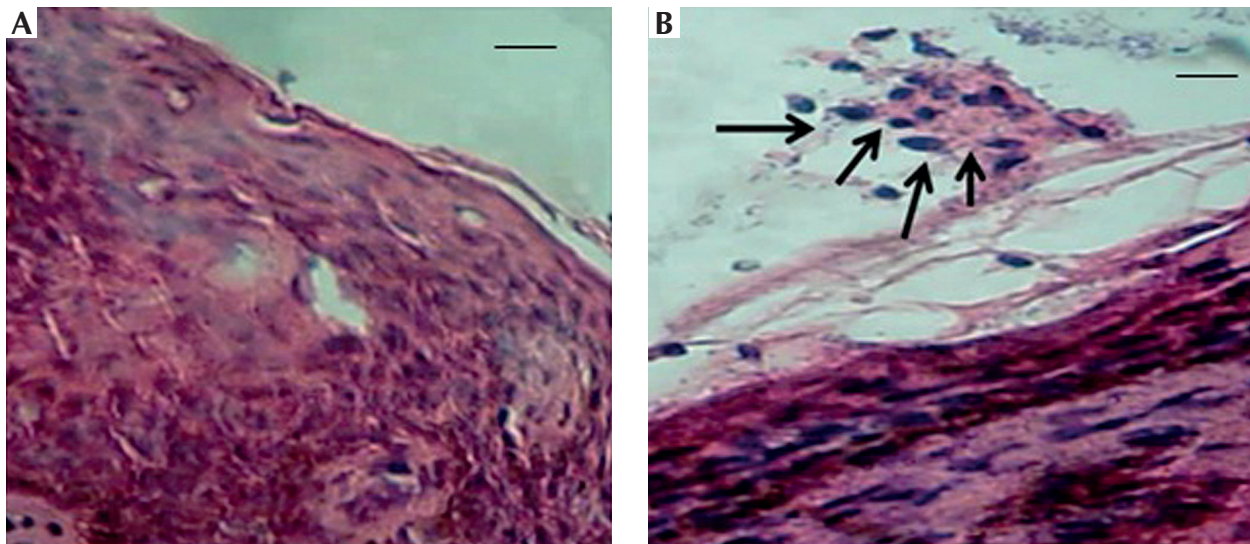
P value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

As expected, the skin samples during the experiment were putrefied with reduction in their thickness. That has been detected macroscopically (by naked eye) and microscopically (by LM examination). The samples of the first (control) group were always negative for spermatozoa at different time intervals (Fig. 1A).

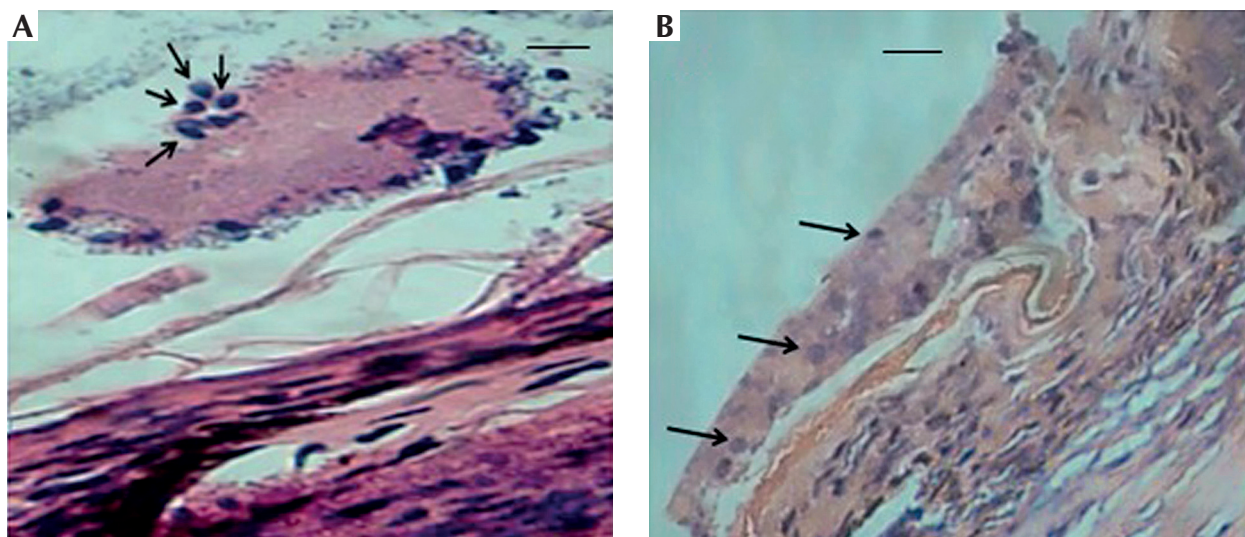
In the second group, LM examination showed highly positive results at 3 days after the semen deposition (Fig. 1B), whereas less numbers of spermatozoa were detected at 6–9 days (Fig. 2A). At 12 days, it was observed hazy rounded structures (viable looking nuclei) above the keratin layer of the skin (Fig. 2B) which could resemble to some extent spermatozoa. After 12 days, there is no visible trace of spermatozoa on the putrefied skin (Fig. 3A, B).

In the third group, FM examination detected spermatozoa till 110 days after semen deposition. It has been observed that the numbers of spermatozoa were gradually decreased with time. At 120 days, no



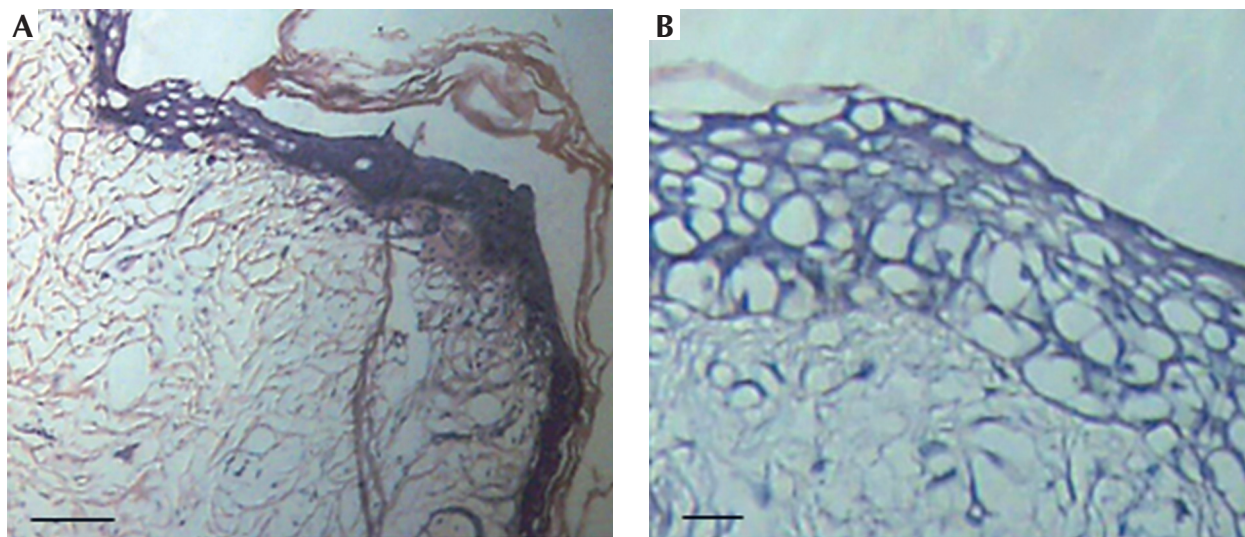
Ryc. 1. Mikroskopowy obraz próbki kontroli ujemnej zabarwionej HE (A); po 3 dniach od osadzenia nasienia (B). Strzałki wskazują plemniki osadzone na powierzchni skóry. Oryginalne powiększenie 400 \times . Pasek skali = 20 μ m

Fig. 1. Light microscopic image of HE stained skin (A) negative control sample; at 3 days of semen deposition (B). Arrows refer to spermatozoa deposited on the skin surface. Original magnification 400 \times . Scale bar = 20 μ m



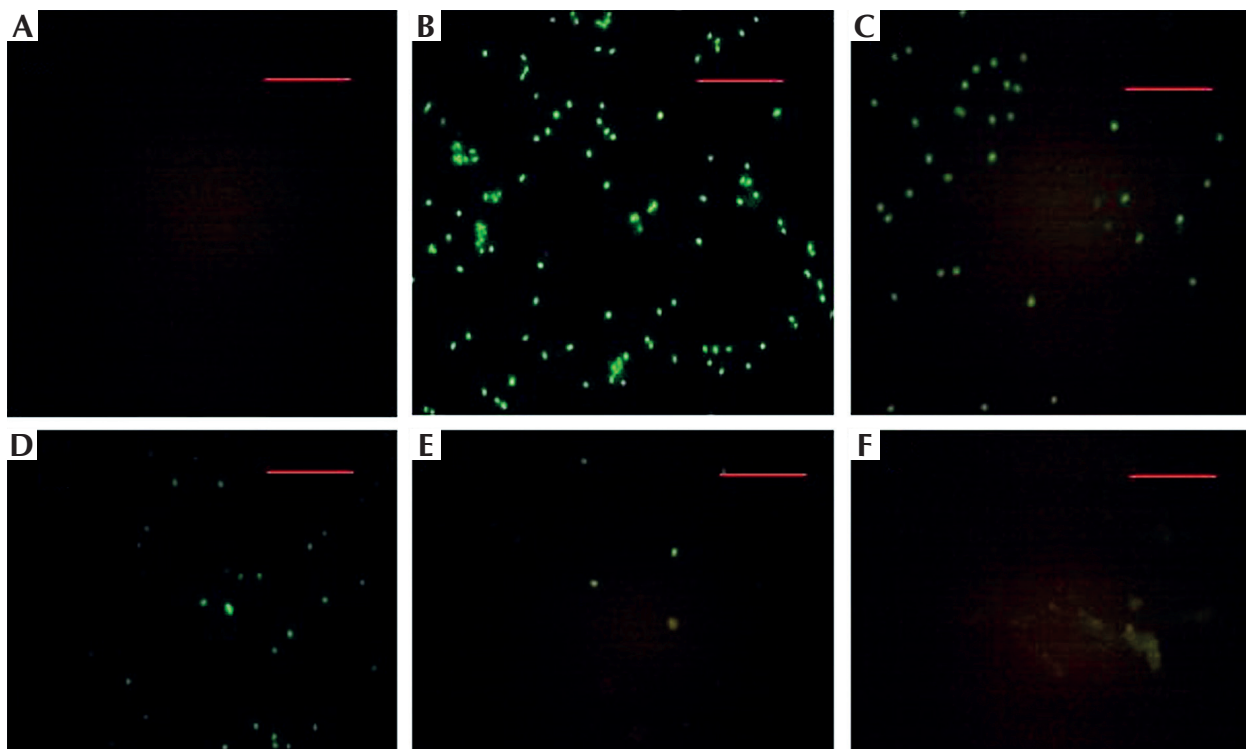
Ryc. 2. Obrazy mikroskopowe skóry barwionej HE w 6 dni (A) i 12 dni (B) od osadzenia nasienia. Strzałki wskazują plemniki (A); żywotnie wyglądające jądra (mętna zaokrąglona struktura) nad warstwą skóry keratynowej (B). Oryginalne powiększenie 400×. Pasek skali = 20 μm

Fig. 2. Light microscopic images of HE stained skin at 6 days (A) and 12 days (B) of semen deposition. Arrows refer to spermatozoa (A); viable looking nuclei (hazy rounded structure) above keratin layer of skin (B). Original magnification 400×. Scale bar = 20 μm



Ryc. 3. Obrazy zabarwionego HE fragmentu skóry objętej rozkładem 70 dni od osadzenia nasienia uzyskane w mikroskopie świetlnym. Zwraca uwagę degeneracja wakuolarna naskórka, obrzęk skóry i rozdrobnienie z rozdzieleniem keratyny. Oryginalne powiększenie 100×. Pasek skali = 100 μm (A). Oryginalne powiększenie 400×. Pasek skali = 20 μm (B)

Fig. 3. Light microscopic images of HE stained section of decomposed skin at 70 days of semen deposition. Note the vacuolar degeneration of epidermis, dermal edema and fragmentation with separation of keratin. Original magnification 100×. Scale bar = 100 μm (A). Original magnification 400×. Scale bar = 20 μm (B)



Ryc. 4. Obrazy rozmazów skóry zabarwionych przy użyciu Sperm Hy-Liter™ uzyskane pod mikroskopem fluorescencyjnym: negatywna kontrola nienaruszonej skóry (A); 1 dzień (B); 70 dni (C); 90 dni (D); 110 dni (E) i 120 dni (F) po osadzeniu nasienia. Jasnozielone główki nasienia widoczne dzięki użyciu filtra FITC. Oryginalne powiększenie 20×. Pasek skali = 100 μm

Fig. 4. Fluorescent microscopic images of Sperm Hy-Liter™ stained skin smears: negative control of intact skin (A); 1 day (B); 70 days (C); 90 days (D); 110 days (E) and 120 days (F) after semen deposition, showing a bright green sperm heads by using FITC filter. Original magnification 20×. Scale bar = 100 μm

stopniowo z upływem czasu. Po 120 dniach nie wykryto plemników mimo bardzo dokładnej analizy (ryc. 4.).

Szczególną uwagę zwrócono na średnią liczbę plemników w trzech badanych próbkach w różnych punktach czasowych po depozycji nasienia (ryc. 5.). Dzięki analizie z wykorzystaniem Sperm Hy-Liter™ uzyskiwano istotnie wyższe wyniki niż w przypadku barwienia HE w ciągu pierwszych 12 dni ($t = 4,20$; $p = 0,01$). Po upływie 12 dni barwienie HE nie wykazało obecności plemników, natomiast przy wykorzystaniu zestawu Sperm Hy-Liter™ plemniki wykrywano aż do 110. dnia ($t = 5,05$; $p = 0,0001$).

Dyskusja

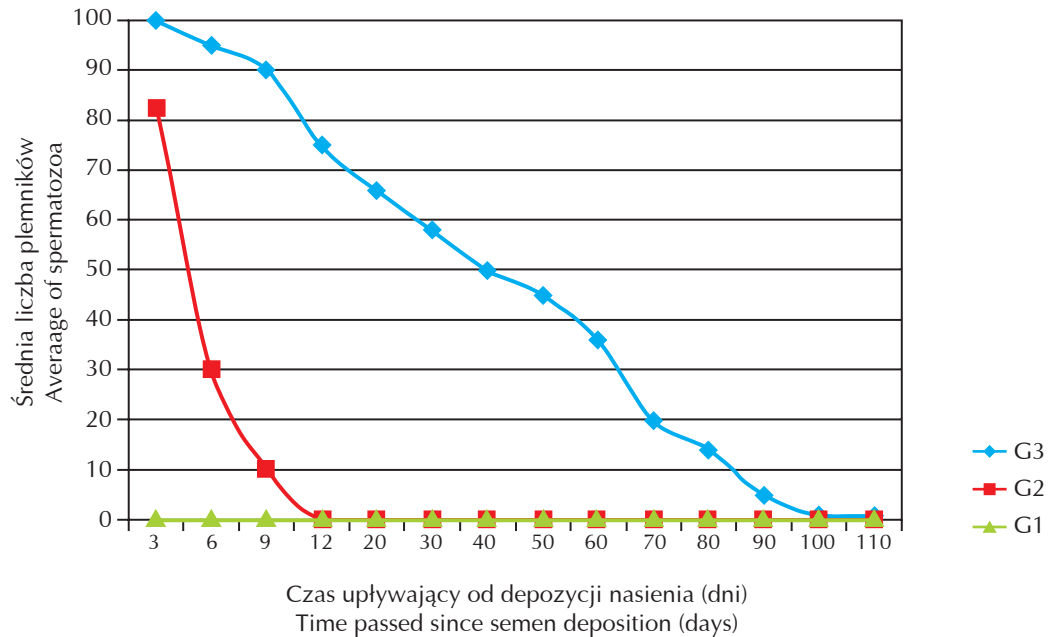
Zgwałcenie jest przestępstwem, które niemal zawsze odbywa się bez świadków. Z tego względu identyfikacja nasienia jest bardzo ważna dla ustalenia tożsa-

spermatozoa were detected despite extensive examination (Fig. 4.).

Particular attention was paid to the average of spermatozoa in the three studied groups at different time intervals since semen deposition (Fig. 5.). Sperm Hy-Liter™ stain showed significantly higher results than HE during the first 12 days ($t = 4.20$; $p = 0.01$); no spermatozoa was detected after 12 days based on HE stain while Sperm Hy-Liter™ stain detected spermatozoa up to 110 days ($t = 5.05$; $p = 0.0001$).

Discussion

Rape is usually an unwitnessed crime, thus the identification of spermatozoa has a great impact on the outcome especially after passing a period of time from the incident [4, 7, 9]. So, the presence of sper-



Ryc. 5. Zależność między średnią liczbą plemników w 3 badanych grupach i czas upływający od depozycji nasienia. G1: grupa 1 – ujemna kontrola, G2: grupa 2 – pozytywne próbki wybarwione HE badane pod mikroskopem świetlnym; G3: grupa 3 – pozytywne próbki barwione Sperm Hy-Liter™ badane pod mikroskopem fluorescencyjnym

Fig. 5. Relationship between average number of spermatozoa in the 3 studied groups and time passed since semen deposition. G1: Group 1 contains negative control group, G2: Group 2 contains positive samples stained with HE examined under light microscope; G3: Group 3 contains positive samples stained with Sperm Hy-Liter™ and examined under fluorescent microscope

mości sprawcy, zwłaszcza po upływie pewnego czasu od przestępstwa [4, 7, 9]. Należy zatem rozważyć okres przeżycia plemników w pochwie, na odzieży i na skórze ofiary [10]. W literaturze dostępne są liczne prace poświęcone wyłącznie obecności plemników na żyjących ofiarach zgwałcenia. Przeprowadzono również analizę obecności plemników na skórze objętej rozkładem gnilnym. W badaniu wykonanym przy wykorzystaniu SEM stwierdzono ograniczenia zalecanej metody [1]. Według wiedzy autorów w literaturze nie ma doniesień dotyczących pośmiertnej identyfikacji plemników na skórze ludzkiej przy użyciu znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał monoklonalnych. Celem niniejszego badania było porównanie skuteczności identyfikacji plemników na skórze objętej procesem rozkładu z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał monoklonalnych oraz metody tradycyjnej.

Identyfikacja plemników ludzkich może być bardzo trudna w przypadku problematycznych próbek o niskiej zawartości nasienia lub dużej gęstości komórek

matozoa and their survival period in the vagina, on fabric, or on skin should be considered [10]. Many articles paid great attention only to the persistence of spermatozoa in living victims. Previous postmortem study assessed the persistence of spermatozoa on putrefied skin based on SEM and reported limitations to the suggested method [1]. To our knowledge, there is no available research assessed postmortem identification of spermatozoa on human skin based on fluorescent monoclonal-based approach. Therefore, this study aimed to assess fluorescent monoclonal-based approach in identification of spermatozoa on decomposed skin in comparison to the traditional method.

The identification of human spermatozoa can be extremely difficult in challenging samples with low sperm count, high epithelial cell density, mixtures of cells and microorganisms, degradation of sperm cells with detachment of the tail from the head [9, 11]. The stained HE skin in the present study re-

nabłonka, mieszanin komórek i mikroorganizmów, a także rozkładu plemników przebiegającego z oddzieleniem główek od witek [9, 11]. W próbkach skóry wybarwionych HE wykorzystanych w niniejszym badaniu główki plemników oddzielone od witek stwierdzano już od punktu początkowego analizy. Identyfikacja kompletnych plemników (z główką i wtką) nie zawsze jest możliwa, ponieważ plemniki są kruche i łatwo ulegają rozpadowi po wyschnięciu [7]. Wyniki niniejszego badania są zgodne z wynikami innego niedawno wykonanego badania, w którym nie wykazano zależności między czasem od stosunku płciowego a ilością plemników z wtkami. Na tej podstawie stwierdzono, że identyfikacja witek nie jest w medycynie sądowej wiarygodnym wyznacznikiem czasu, jaki upłynął od stosunku płciowego [12].

Spadek liczby plemników w kolejnych próbkach barwionych HE i analizowanych pod MO może wynikać z ich rozpadu wskutek wysuszenia z upływem czasu [7]. Wyniki niniejszego badania pokrywają się z pracą Gibelli i wsp., w której wykazano, że wykrycie pod MO plemników w wybarwionym wymazie ze skóry ludzkiej objętej procesem rozkładu gnilnego nie jest możliwe już po 12 dniach od depozycji nasienia [1].

Najdłuższy odnotowany okres, w którym możliwe było wykrycie plemników w wymazie z pochwy, odbytu i jamy ustnej żyjących ofiar przestępstw, wyniósł odpowiednio 120, 46 i 6 godzin [13]. Z kolei w wymazach z pochwy pobranych ze zwłok zanurzonych w wodzie oraz zmumifikowanych plemniki wykrywano przez odpowiednio 2,5 i 6 tygodni [14]. Najdłuższy pośmiertny okres, w którym możliwe było wykrycie samych główek plemników, wyniósł 2,5 miesiąca [15]. Wykazano, że zanurzenie w wodzie, zaawansowany rozkład, a nawet spalanie nie usuwają śladów nasienia tak szybko, jak można by się spodziewać [14]. Różnica w okresie wykrywalności plemników między ofiarami żyjącymi a nieżyjącymi może być związana z takimi czynnościami, jak oddawanie moczu czy prysznic, a także stosowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych, które skracają wykrywalność plemników u żyjących ofiar [15]. Wyniki niniejszego badania są zgodne z tymi pracami. Wykazano, że okres wykrywalności plemników metodą opartą na znakowanych fluorescencyjnie przeciwciałach monoklonalnych jest dłuższy w porównaniu z metodą tradycyjną. Może to mieć związek z charakterystyką poszczególnych metod wykrywania plemników. Również we wcześniejszym badaniu przy wykorzystaniu fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

revealed head of spermatozoa without tail from the start point. It is not always feasible to find complete bodies (head and tail) because spermatozoa are extremely brittle and easily disintegrated when they are dry [7]. The present study came in line with a new study which did not find any correlation between the time since intercourse and the proportion of spermatozoa with tails. Thus, it concluded that the identification of tails may not be a suitable feature in forensic investigations to indicate time since intercourse [12].

The reduced number of spermatozoa in the successive HE stained samples that examined under LM could be due to disintegration when they are dried with passing time [7]. However, the result of present study is consistent with Gibelli *et al.* who confirmed that LM detection of spermatozoa is no longer possible on stained swab taken from the putrefied human skin after 12 days of the semen deposition [1].

It is recorded that the longest time to detect spermatozoa from vaginal, anal and buccal swabs were 120, 46 and 6 hours respectively in living victims [13]. While previously recorded time to detect spermatozoa from vaginal swabs which were obtained from immersed body and mummified corpse were 2.5, 6 weeks respectively [14]. The maximum recorded postmortem interval for positive finding was 2.5 months for spermatozoa heads only [15]. It was displayed that immersion in water, advanced decomposition and even burning do not destroy traces of semen as readily as might be expected [14]. The difference in duration among living and dead victims could be due to associated activities such as urinating, douching, and oral contraceptive use will reduce the recovery of spermatozoa in living victims [15]. The previous discussion came consistent with the findings of present study. Moreover, present study showed longer duration of detection based on fluorescent monoclonal-based approach in comparison to traditional approach. This could be attributed to the method of spermatozoa detection. This is in agreement with previous study which reported the success of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to identify Y-bearing non-sperm male cells and diagnose 39% of the sexual assaults in which cytology did not detect spermatozoa [16].

The monoclonal antibody method had the advantage of detecting more spermatozoa at each time interval up to 110 days in comparison to the tradi-

pomyślnie zidentyfikowano męskie komórki inne niż plemniki zawierające chromosom Y i rozpoznano 39% przypadków napaści na tle seksualnym, w których badanie cytologiczne nie wykryło plemników [16].

Metoda oparta na przeciwciałach monoklonalnych pozwala wykryć więcej plemników niż metoda tradycyjna w każdym przedziale czasowym aż do 110 dni. Liczba zidentyfikowanych plemników ma kluczowe znaczenie. Stanowi bowiem istotny wskaźnik, czy próbka zawiera wystarczającą ilość materiału do profilowania DNA w celu identyfikacji sprawcy przestępstwa [17]. Według jednego z doniesień pełne profile DNA uzyskano na podstawie analizy co najmniej 30 plemników [18]. Przydatna w pozyskiwaniu materiału do analizy DNA okazała się technika mikrodysekcji laserowej po znakowaniu [1]. W różnych badaniach stwierdzono, że transfer i odzysk DNA zależy od wielu czynników. Stan skóry, np. obecność sebum lub potu, może sprzyjać transferowi DNA [2]. Co ciekawe, opóźnienie styczności z dowolną powierzchnią nie zawsze wpływa na wykrywalność znanego czynnika. Stwierdzono, że po kontakcie obce DNA pozostaje na fragmentach skóry dłoni i może zostać przeniesione na inną powierzchnię [19]. Badano też inne istotne czynniki, m.in. typ substancji biologicznej, rodzaj powierzchni, wilgotność zaplamień, nasilenie złuszczenia, obecność tarcia [19, 20].

Badanie pod mikroskopem fluorescencyjnym wymazów barwionych przy użyciu Sperm Hy-Liter™ (trzecia próbka) umożliwiło wykrycie plemników nawet po 110 dniach od depozycji nasienia. System Sperm Hy-Liter™ pozwala uzyskać dodatni wynik nawet wtedy, gdy plemniki nie są wykrywane metodą HE, a tendencja ta wykazuje istotność statystyczną. Wyniki te są spójne z uzyskanymi przez Miller i wsp., którzy potwierdzili, że Sperm Hy-Liter™ jest dużo skuteczniejszy od tradycyjnych metod barwienia (np. HE) w wykrywaniu główek plemników ludzkich. Może to być związane z obecnością miejsc wiązania przeciwciał na główce plemnika, które nie ulegają łatwo uszkodzeniu w procesie rozkładu gnilnego [17]. W niniejszym badaniu wykazano, że metoda bazująca na przeciwciałach monoklonalnych jest skuteczniejsza od SEM. Przy wykorzystaniu SEM wykrycie plemników na skórze objętej rozkładem jest możliwe tylko do 84 dni [1].

Zestaw Sperm Hy-Liter™ ma wiele zalet w opisywanym zastosowaniu. Dzięki dużemu nasileniu fluorescencji umożliwia identyfikację nawet pojedynczych plemników w próbkach o wysokim zagęszczeniu komórek nabłonkowych pochodzących z pochwy,

tional method. The count of identified spermatozoa is of great importance. It is an important indicator if the sample contains enough material for DNA profiling in order to identify the assailant [17]. It elucidated that full DNA profiles were recovered by 30 or more spermatozoa [18]. Laser microdissection after labeling has proved helpful in gaining material for DNA analysis [1]. Different studies revealed that there are many factors affecting DNA transfer and recovery. Skin conditions such as the presence of sebum or sweat can promote DNA transfer [2]. It was interesting to find that delays in contacting with any surface did not always have an effect on the detectability of the known contributor. It also found that the non-self DNA remains on parts of skin of the hand after contacts and may be transferred to another surface later on [19]. Other affected factors have been investigated, like the type of biological substance, the type of surface, the moisture level of the stain, individual shedding state, the application of friction and other activities [19, 20].

The FM examination of the Sperm Hy-Liter™ stained swabs (third group) detected spermatozoa up to 110 days after semen deposition. Sperm Hy-Liter™ yields a positive result when no spermatozoa are detected by HE method, and this trend is statistically significant. These results are consistent with Miller *et al.* who confirmed that detection of human spermatozoa head is highly improved via using Sperm Hy-Liter™ in comparison with other traditional staining methods, such as HE. This could be attributed to the antibody binding sites on the head of spermatozoa which are not deteriorated easily during the putrefaction [17]. The present study revealed that monoclonal antibody method outperforms SEM. As SEM detected spermatozoa only up to 84 days on decomposed skin [1].

It is elucidated that Sperm Hy-Liter™ has many advantages. Due to the intense fluorescence, as few as one spermatozoa can be identified among a dense sample of vaginal epithelial cells common in sexual assault type swabs [9]. It is simple to use, highly specific for human spermatozoa, sensitive, reliable, faster evaluation of slides, allow viewing of the slides at low magnification and allow detection of spermatozoa in old cases. It safeguards the integrity of the parental swabs for DNA analysis without any negative effect on quality [3]. Moreover the present study declared that monoclonal antibody method outper-

które są typowe dla wymazów pobieranych po napaściach na tle seksualnym [9]. Jest prosty w obsłudze oraz wykazuje wysoką swoistość względem plemników ludzkich, a także wysoką czułość i niezawodność. Umożliwia szybszą analizę płytek testowych, ocenę wizualną w małych powiększeniach oraz wykrywanie plemników nawet w starych sprawach. Zabezpiecza integralność wymazów rodzicielskich na potrzeby analizy DNA bez negatywnego wpływu na jakość [3]. W niniejszym badaniu stwierdzono, że metoda bazująca na przeciwciałach monoklonalnych jest skuteczniejsza od metody tradycyjnej zarówno pod względem wykrywalności plemników, jak i czasu ich identyfikacji na skórze objętej procesem rozkładu. Metoda ma również przewagę nad SEM. Przede wszystkim umożliwia wykrywanie plemników przez dłuższy okres, pozwala też uniknąć błędów, jakie mogą towarzyszyć analizie SEM w związku z ewentualną obecnością mikroorganizmów przypominających plemniki [1].

Podsumowując – przeprowadzone badanie wykazało, że plemniki utrzymują się na skórze objętej rozkładem i mogą być wykrywane przez dość długi czas przy wykorzystaniu metody opartej na przeciwciałach monoklonalnych i analizie pod mikroskopem fluorescencyjnym. Metoda ta może przynosić istotne korzyści nie tylko pod względem ustalenia, czy nieżyjąca ofiara doznała napaści na tle seksualnym, lecz także identyfikacji sprawcy. Potrzebne są dalsze badania w celu weryfikacji dokładności zastosowanej metody pośmiertnej identyfikacji nasienia na skórze pochodzącej od martwych osób, a także oceny utrzymywania się plemników w różnych lokalizacjach ciała oraz na różnych materiałach.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo References

1. Gibelli D, Mazzarelli D, Rizzi A, Kustermann A, Cattaneo C. Persistence of spermatozoa on decomposing human skin: a scanning electron microscopy study. *Int J Legal Med* 2013; 127: 975-979.
2. Van den Berge M, Ozcanhan G, Zijlstra S, Lindenbergh A, Sijen T. Prevalence of human cell material: DNA and RNA profiling of public and private objects and after activity scenarios. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 21: 81-89.
3. De Moors A, Georgalis T, Armstrong G, Modler J, Frégeau CJ. Sperm Hy-Liter™: an effective tool for the detection of spermatozoa in sexual assault exhibits. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 367-379.
4. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci* 2001; 46: 349-351.
5. Sanders CT, Reisenbigler EK, Peterson DA. Laser microdissection separation of pure spermatozoa populations from mixed cell samples for forensic DNA analysis. 2007. <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/217268.pdf>
6. Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Van Nieuwerburgh F, Deforce D. Automatic detection of spermatozoa for laser capture microdissection. *Int J Legal Med* 2009; 123: 169-175.

forms the traditional method in both spermatozoa counts and duration of detection on decomposed skin. This method also outperforms SEM in two things; firstly detection of spermatozoa for longer period and secondly avoidance of misjudgment that may occur with SEM due to the presence of sperm-like microorganisms [1].

In conclusion, the present study showed that spermatozoa are persistent and still detectable for an appreciated time on decomposed skin and can be identified based on monoclonal antibody based approach and FM examination that thing could make a great difference not only in identification of type of crime “sexual assault” in dead victims but also help in identification of the assailant. Further studies are recommended in order to verify not only the accuracy of the used method on skin of dead body but also to evaluate persistence of spermatozoa on different body sites and fabrics.

The authors declare no conflict of interest.

7. Stefanidou M, Alevisopoulos G, Spiliopoulou C. Fundamental issues in forensic semen detection. *West Indian Med J* 2010; 59: 280-283.
8. De Moors A, Georgalis T, Armstrong G, Modler J, Frégeau CJ. Validation of the fluorescence-based Sperm Hy-Liter™ kit as a means to standardize spermatozoa identification in sexual assault cases. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series* 2011; 3: e31-e32.
9. Westring CG, Wiuf M, Nielsen SJ, Fogleman JC, Old JB, Lenz C, Reich KA, Morling N. SPERM HY-LITER™ for the identification of spermatozoa from sexual assault evidence. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 12: 161-167.
10. Grossin C, Sibille I, Lorin de la Grandmaison G, Banasr A, Brion F, Durigon M. Analysis of 418 cases of sexual assault. *Forensic Sci Int* 2003; 131: 125-130.
11. Herr J. SpermPaint optimization and validation. NIJ Grant 2000-IJ-CX-K013 Report. 2007. Available at <http://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/220289.pdf>.
12. Tobe SS, Dennany L, Vennemann M. An assessment of the subjectivity of sperm scoring. *Forensic Sci Int* 2015; 251: 83-86.
13. Willott GM, Allard JE. Spermatozoa – their persistence after sexual intercourse. *Forensic Sci Int* 1982; 19: 135-154.
14. Allard JE. The collection of data from findings in cases of sexual assault and the significance of spermatozoa on vaginal, anal and oral swabs. *Sci Justice* 1997; 37: 99-108.
15. Collins KA, Bennett AT. Persistence of spermatozoa and prostatic acid phosphatase in specimens from deceased individuals during varied postmortem intervals. *Am J Forensic Med Pathol* 2001; 22: 228-232.
16. Collins KA, Rao PN, Hayworth R, Schnell S, Tap MP, Lantz PE, Geisinger KR, Pettenati MJ. Identification of sperm and non-sperm male cells in cervicovaginal smears using fluorescence in situ hybridization: applications in alleged sexual assault cases. *J Forensic Sci* 1994; 39: 1347-1355.
17. Miller KW, Old J, Fischer BR, Schweers B, Stipinaite S, Reich K. Developmental validation of the SPERM HY-LITER™ kit for the identification of human spermatozoa in forensic samples. *J Forensic Sci* 2011; 56: 853-865.
18. Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Van Nieuwerburgh F, Deforce D. Automatic detection of spermatozoa for laser capture microdissection. *Int J Legal Med* 2009; 123: 169-175.
19. Szkuta B, Ballantyne KN, van Oorschot RA. Transfer and persistence of DNA on the hands and the influence of activities performed. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 28: 10-20.
20. Van Oorschot RAH, Goray M, Eken E, Mitchell RJ. Impact of relevant variables on the transfer of biological substances. *Forensic Sci Int Genet Series* 2009; 2: 547-548.

Adres do korespondencji

Sanaa M. Aly
 Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department
 Faculty of Medicine
 Suez Canal University
 Ismailia, Egypt
 e-mail: sasydayem@hotmail.com

Address for correspondence

Sanaa M. Aly
 Forensic Medicine and Clinical Toxicology Department
 Faculty of Medicine
 Suez Canal University
 Ismailia, Egypt
 e-mail: sasydayem@hotmail.com