

OUCHTERLONY METODU (çift yönlü agar immünodiffüzyon) İLE PROSTAT SPESİFİK ANTİJENİN (p30) ADLİ AMAÇLARLA GÖSTERİLMESİ *1 **

Detection of Prostate Specific Antigen (p30) for Forensic Purpose by Using the Ouchterlony Technique (double diffusion in agar)

M. Hakan ÖZDEMİR***, Serpil SALAÇIN***, Kıymet AKSOY****

Özdemir MH, Salaçin S, Aksoy K. Ouchterlony metodu (çift yönlü agar immünodiffüzyon) ile prostat spesifik antijeninin (p30) adli amaçlarla gösterilmesi, Adli Tıp Bülteni 1998;3(1):9-15.

ÖZET

Adli bilimler seksüel saldırı olgularında hukukun gereksinimlerinin karşılanmasında çok önemli bir rol üstlenmiştir. Adli bilimler bu tür olgularda tıbbi ve fiziksel bulguları ortaya koyar. Seksüel saldırı olgularında genital ve anal bölgede saptanabilecek bulgular çoğunlukla tanı koydurucu olmaktan çok; düşündürücü, destekleyici niteliktedir. Genital travmanın tek spesifik fizik muayene bulgusu himende saptanan taze yırtıktır. Seksüel saldırının gerçekleştiğinin kesin kriteri mağdurun vücudunda ya da giysilerinde semen artığı ya da spermatozoa saptanmasıdır. Semen varlığının ortaya konmasında; sitolojik, immunolojik ve biyokimyasal çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Semene spesifik olması, çok az miktarlarda dahi gösterilebilmesi, leke ve vaginal ortamdaki dayanıklılığı ve seminal plazmanın bileşiminde bulunması ve genetik kontrol altında bir protein olması nedeni ile prostat spesifik antijen (PSA), semen için adli belirleyici olarak tanımlanmaktadır. Basit ve ileri teknoloji kullanılarak uygulanan çeşitli yöntemlerle PSA gösterilebilmektedir.

Bu çalışmada basit bir immünolojik yöntem (Ouchterlony metodu) modifiye edilerek anabilim dalımız laboratuvarlarında bir ön yöntem olarak kullanılmak üzere PSA gösterilmesine uyarlanmıştır.

Bu deneysel çalışma;1/2 oranında sulandırılmış anti-PSA'nın (15ml) en uygun sulandırılma oranı olduğu, 1/2 anti- PSA ile 1/40 ve 1/80 oranında sulandırılan seminal plazmada (10 ml) en iyi presipitasyon bantının izlendiği, vaginal sürüntüde; direk sürüntü pamuğu ve sürüntü pamuğundan elde edilen ekstratın birlikte çalışılması gerektiğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Seksüel saldırılar, Irza geçme, Semen, Prostat spesifik antijen, Ouchterlony metodu.

SUMMARY

Forensic sciences have important role in evaluation of the medical and physical evidences of sexual assaults. Genital and anal physical findings of the victims are mostly suggestive but not diagnostic. The only specific physical finding of genital trauma is acute laceration of the hymen. Obvious indicators for sexual assaults are the presence of sperms or other seminal components on the bodies or/and the cloths of the victims or at the crime scene. Cytological, immunological and biochemical methods have been used for identification of seminal components.

Prostate specific antigen (PSA) has been recognized as a forensic marker because of its biological specificity and detectability in trace amounts, and stability in dried stains and vaginal environment. Nowadays, simple and high technological methods are available for detection of PSA. In this study, a simple immunological method (Ouchterlony technique) has been modified and adapted for our serology laboratory as a preliminary detection method of PSA.

The performed experiments revealed that the best precipitation zones were obtained with the 1/2 (15ml) dilution of anti-PSA and with the 1/40 and 1/80 dilutions of the seminal plasma (10ml). The vaginal swabs and the extractions of swabs should be tested simultaneously for the best results.

Key words: Sexual assaults, Rape, Semen, Prostat specific antigen, Ouchterlony technique.

GİRİŞ

Seksüel saldırılar, dünyada ve ülkemizde ciddi bir sorun olma özelliğini korumaktadır. Adli bilimler; bu olgularda objektif kriterleri ortaya koyarak hukuk sis-

* Bu çalışma, 13-15 Mayıs 1996 Tarihinde Bursa'da düzenlenen II.Adli Bilimler Kongresinde sözel bildiri olarak sunulmuştur.

** Bu çalışmaya Çukurova Üniversitesi Araştırma fonu tarafından TF.95 U.6 nolu proje olarak maddi destek sağlanmıştır.

*** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı,

**** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

Geliş tarihi:20.05.1996

Düzeltilme tarihi:10.09.1998

Kabul tarihi: 06.11.1998

teminde yer alan yasa maddelerinin sağlıklı bir şekilde işletilebilmesinde, önemli bir rol almaktadır. Bu tür olgularda olayın gerçekleşip gerçekleşmediğinin objektif kriterlerle ortaya konması en önemli basamaktır. Bu amaçla olayın mağdurunun genel fizik muayenesi, jinekolojik muayenesi bazı olgularda aydınlatıcı nitelikte bilgiler vermektedir. Ancak yeni gerçekleşen, fizik muayene ve jinekolojik muayene bulgularının tanı koydurucu nitelikte olmadığı olgularda olay yerinde, mağdurun vücudunda ve giysilerinde seminal sıvının varlığını ortaya koymaya yönelik çalışmalar konuyu aydınlatıcı tek yöntemdir.

Adli amaçlı seminal sıvı tanımlamasında biokimyasal, immünolojik, sitolojik inceleme teknikleri uygulanmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin tümü seminal sıvıda bulunan ve konsantrasyonları organizmanın diğer vücut sıvı ve dokularındakine oranla çok yüksek olan bir kimyasal bileşiğin, enzimin veya hücrenin; biokimyasal, immünolojik, sitolojik incelemesi esasına dayanmaktadır. Seminal sıvının varlığının gösterilmesinde seçilecek yöntemin, seminal sıvıya özgül ve duyarlılığının yüksek olması gerekmektedir. Ayrıca yöntemin basit gereçlerle uygulanabilmesi, hızlı sonuç vermesi, maliyetinin düşük olması seçimde göz önünde bulundurulması gereken kriterlerdendir (1-13).

Seminal sıvının tanımlanmasında, spermatozoanın mikroskopik olarak gösterilmesi en güvenilir yol olarak belirtilmekle birlikte vagen pH'sı, bakterial flora gibi lokal faktörler, anti-sperm antikor gelişimi spermatozoa görülme şansını azaltmaktadır. Aspermik ve vazektomili kişilerde ve spermatozoanın kayb olduğu diğer durumlarda ise spermatozoa görme şansı hiç yoktur. Bu durumdaki kişilerde prostat epitel hücreleri tarafından salgılanan ve proteolitik aktiviteye sahip bir glikoprotein olan prostat spesifik antijen'in (PSA, p30) varlığının gösterilmesi, bir artık veya lekenin insan seminal sıvısına ait olduğunu kanıtlayıcı nitelikte kabul edilmektedir (14-24).

İlk kez 1966 yılında, seminal sıvı için spesifik olduğuna inanılan p30 antijeni, seminal plazmada tanımlanmış ve gama-seminoprotein olarak adlandırılmış, sonraki yıllarda bu antijen; protein-E, prostat spesifik antijen (PSA), p30 gibi farklı isimlerle tanımlanmıştır (14-17). Seminal sıvıda 0.5-2 mg/ml bulunan p30 antijeninin, semen likefaksiyonunda seminal vezikül proteinlerinin (fibronektin, seminogelin I-II) parçalanmasından sorumlu olduğu belirtilmektedir (14-17, 21-22, 24-25).

p30 antijeninin; oda sıcaklığında 24-48 saat (maksimum 4 gün), 4°C de 14 gün, -20° C de dondurulduğunda 6 aydan 12 yıla kadar stabil kaldığı bildirilmiştir. Vaginal ortamda, çalışılan yöntemin hassaslığına bağlı olmakla birlikte p30 antijeninin koitustan 27 saat sonrasına kadar saptanabildiği belirtilmektedir (14,25-28).

p30 antijeninin seminal sıvı tanımlanmasında adli

belirleyici olarak tercih edilmesinde çeşitli faktörler rol oynamaktadır. p30 antijeninin biyolojik özgüllüğü, 19.kromozom üzerinde direkt genetik kontrol altında olması, seminal plazmanın bir komponenti olması nedeniyle vazektomili veya aspermik şahıslardan kaynaklanan problemlerin üstesinden gelebilmesi, vaginal ortamda ve kurutulmuş lekelerde uzun bir interval içinde saptanabilme şansı bulunması yanında çok az miktarlarda bile tayin edilebilmesi tercih sebebi olduğu ileri sürülmektedir (14,29).

p30 antijeninin seminal sıvı ve lekelerde gösterilmesinde değişik teknikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada anabilim dalımız laboratuvarlarında uygulanabilecek yöntemler araştırılarak, p30 antijenini göstermeye yönelik çalışmalar başlatılmıştır. Basit gereçlerle uygulanabilen çift yönlü agar immundiffüzyon tekniği (Ouchterlony yöntemi) ön tarama amaçlı kullanılmak üzere araştırılarak tekniğin uygulanması ve özellikleri ile ilgili bilgiler araştırılmıştır.

Seminal sıvının varlığını ortaya koyma amacıyla seçilen Ouchterlony yöntemi; agar ortamında çift yönlü diffüzyonla antijen ve antikor arasındaki presipitasyonu göstermeye yönelik basit ve direk bir yöntemdir. Bu yöntem, petri kutusunda yumuşak agar hazırlandıktan sonra, agar plakta açılan kuyulara karşılıklı gelecek şekilde antijen ve antikor konarak bunların birbirlerine doğru yayılıp, optimal konsantrasyonlarda karşılaştıkları yerde bulanıklık şeklinde presipitasyon bandı(çizgisi) meydana getirmeleri esasına dayanmaktadır. Reaksiyon gelişmesinde antijen ve antikor konsantrasyonu kadar, ortamın pH'sı, tuz konsantrasyonu ve ısıнын rolünün etkili olduğu ileri sürülmektedir (29-35).

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Tıp Fakültemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalının, Jinekoloji ve İnfertilite Polikliniklerine başvuran, 41 hastanın posterior vaginal forniksinden alınan sürüntü örnekleri ile gönüllü olarak çalışmaya katılan 7 erkeğin seminal sıvı örneklerinde yapıldı.

Gönüllü olarak seminal sıvı ve vaginal örnek vermeyi kabul eden şahıslarla karşılıklı görüşme sonrası, önceden hazırlanan formlar doldurulup, birer olgu numarası verildi. Çalışmanın ilk basamağında seminal sıvı örnek alınımında kişilerin kendi ifadelerine göre sağlıklı olması aranırken, vaginal örnek alımlarında postkoital interval süresini bilen, cinsel birleşme sonrası vaginasını yıkamayan kişiler seçildi. Çalışmanın ikinci basamağında ise, jinekoloji ve infertilite polikliniklerine gelen ve cinsel birleşme sonrası vaginasını yıkamayan rastgele 32 hastadan alınan vaginal sürüntü örneklerinde çalışıldı.

Çalışmanın pozitif kontrol grubunu, gönüllü 7 vericiden alınan seminal sıvı ile Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalının İnfertilite Polikliniklerine

başvurarak postkoital test yaptırmak için gelen 3 hastanın posterior vaginal forniksten alınan örnekler oluşturdu. Negatif kontrol grubunu ise Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekoloji Polikliniğine gelen ve uzun süredir cinsel ilişkide bulunmayan veya cinsel ilişki sırasında eşi kondom kullanan 6 organdan alınan örnekler oluşturdu.

İmmünodiffüzyon yöntemi için gerekli barbitol tamponu, % 1'lik agaroz plak, jelde oluşan presipitasyon bandının daha net görünür hale getirilmesi için kullanılan Coomassie Brilliant Blue (CBB) çözeltisi ve jelden boyayı uzaklaştıran yıkama çözeltisi kaynaklardan belirtildiği şekilde hazırlandı (36).

Deney

Deney iki basamakta gerçekleştirildi.

Birinci basamakta; 7 erkeğe ait seminal sıvı ve 9 vaginal sürüntüde presipitasyon oluşturacak uygun antijen-antikor konsantrasyon oranlarını belirlemek amacı ile çalışıldı. Sağlıklı olduklarını söyleyen ve pozitif kontrol grubu olarak kullandığımız 7 gönüllü erkek vericiden alınan seminal sıvı, oda ısısında 30-45 dk. bırakılarak likefaksiyon sağlandı. 1500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek seminal plazma alındı. Alınan seminal plazma 20 dk. 5000 rpm de, oda ısısında tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazda toplanan seminal plazma 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/12, 1/14, 1/16, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 ve 1/320 oranlarında sulandırıldı. Sulandırılma %0,9'luk Serum fizyolojik(SF) ve aynı oranlarda distile su ile yapıldı.

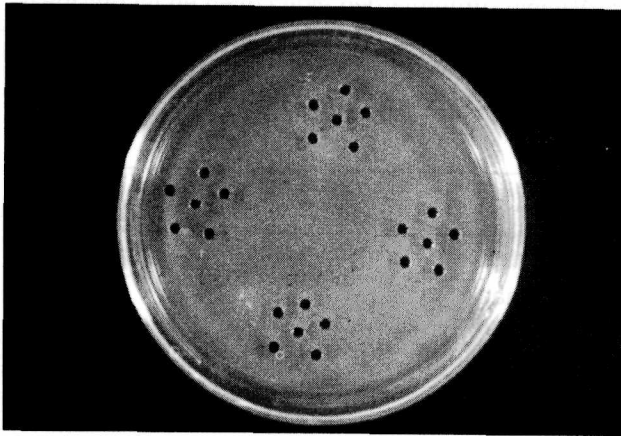
Daha önce hazırlanan ve buzdolabında +4°C de, nemli ortamda bekletilen %1'lik agaroz plakda merkezde bir, çevrede 5 adet olmak üzere, 6 adet 20 µl. hacimli kuyu açıldı. Merkezdeki kuyu ile diğer kuyular arasındaki mesafe 0.5 cm olacak şekilde ayarlandı (Resim 1). Yine bu sırada ticari olarak piyasada satılan konsantre anti-PSA [Konsantre Anti-Prostat Spesifik Antijen (PSA), Poliklonal, Rabbit, 1ml, IMMUNON (491670)], fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile 1/2, 1/3, 1/5, 1/10, 1/20 ve 1/50 oranlarında sulandırıldı.

Jeldeki çalışma alanının ortasındaki kuyuya deği-

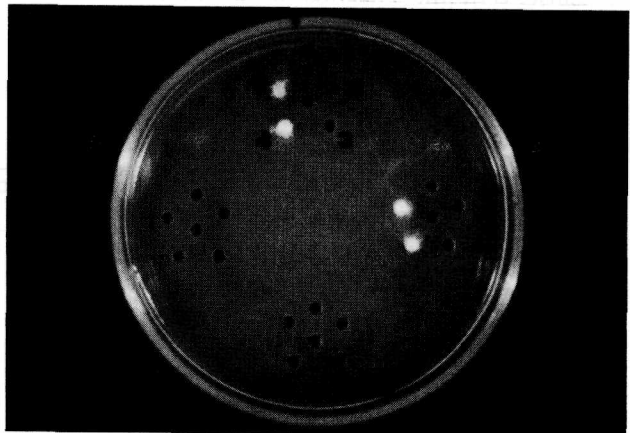
şik konsantrasyondaki anti-PSA'dan 15 µl ve çevre kuyulara ise farklı konsantrasyonlardaki seminal sıvıdan 10-15 µl. konarak, presipitasyon verecek uygun antijen-antikor konsantrasyon oranları araştırıldı.

Yöntemin seminal plazmada çalıştığı gösterildikten sonra, vaginal örneklerde çalışıp çalışmadığını araştırmak amacıyla Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite Polikliniklerine postkoital test yaptırmak için gelen 3 hastadan ve uzun süredir cinsel ilişkide bulunmayan veya cinsel ilişki sırasında eşi kondom kullanan 6 hastadan posterior vaginal forniksten pamuklu eküvyonla alınan sürüntüler, aşağıdaki basamaklardan geçirilerek çalışıldı.

- 1- Steril pamuklu eküvyonla alınan vaginal sürüntü steril cam tüp içinde 1 ml. distile suda 15 dk. ezilerek bekletildi.
- 2- Bekleme süresi sonunda cam tüp içinden pamuk iyice sıkılarak çıkarıldı, geriye kalan solüsyon 5000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi.
- 3- Santrifüj sonrası üst fazdan mikropipetle alınan solüsyon daha önce hazırlanan agaroz plaktaki 1,2 ve 3 numaralı kuyulara 10 µl. kondu (Resim 2).
- 4- Vajinal sürüntü alınan pamuğun küçük bir parçası hiç bir işleme tabii tutulmadan direkt olarak dört numaralı kuyu içine gömüldü ve üzerine iki kez 10-15 dk. ara ile pamuk ıslanana kadar distile su ilave edildi.
- 5- Distile su içerisinde 15 dk. bekletilerek çıkarılan pamuğun bir parçası 5 numaralı kuyuya gömülerek üzerine 10 µl. santrifüj sonucu elde edilen solüsyonun üst fazından kondu.
- 6- Agaroz plakda çalışma alanında açılan kuyulardan merkezde olan kuyuya 15 µl, 1/2 oranında sulandırılmış anti-PSA kondu.
- 7- Bu şekilde hazırlanan plak 24-72 saat süre ile presipitasyon bandı oluşması için oda ısısında, nemli ortamda bekletildi.
- 8- 24-72 saat sonunda agaroz plağı protein artıklarından uzaklaştırmak için iki saat ara ile iki kez %0,9'luk SF ile yıkandı ve son kez distile sudan geçirildi.



Resim 1- Çalışmaya hazır agaroz plak



Resim 2- Çalışma yapılmış agaroz plak

Tablo I: Pozitif Kontrol Grubunun Özellikleri

Olgu No	Materyal	Interval	p30 Antijeni
Olgu 1	Semen	1 saat	-
Olgu 2	Semen	1 saat	+
Olgu 3	Semen	1 saat	+
Olgu 4	Semen	1.5 saat	+
Olgu 9	Semen	1 saat	+
Olgu 16	Semen	1 saat	+
Olgu 17	Semen	1 saat	+
Olgu 5	Postkoital Vajinal	6 saat	+
Olgu 6	Postkoital Vajinal	6.5 saat	+
Olgu 7	Postkoital Vajinal	6.5 saat	+

9- Kurutma kağıdı kullanılarak agaroz plağı oda ısısında kurutulmuş şeffaf jel haline getirildi.

10-Presipitasyon bantlarını daha iyi görebilmek için şeffaf jel oda ısısında CBB boyası ile 15 dk. inkübe edilerek boyandı.

11-Boya artıkları %10'luk asetik asit çözeltisi ile jelden uzaklaştırıldı.

12-Jel tekrar oda ısısında kurutulmuş fotoğrafı alınabilir ve saklanabilir hale getirildi.

13-Deney sonuçları fotoğraflandı.

İkinci basamakta; Fakültemiz Jinekoloji ve İnfertilite polikliniklerine gelen ve cinsel birleşme sonrası vaginasını yıkamayan rastgele 32 hastadan alınan vaginal sürüntü örneklerinde yukarıda anlatılan deney basamaklarının hepsi uygulanarak çalışıldı.

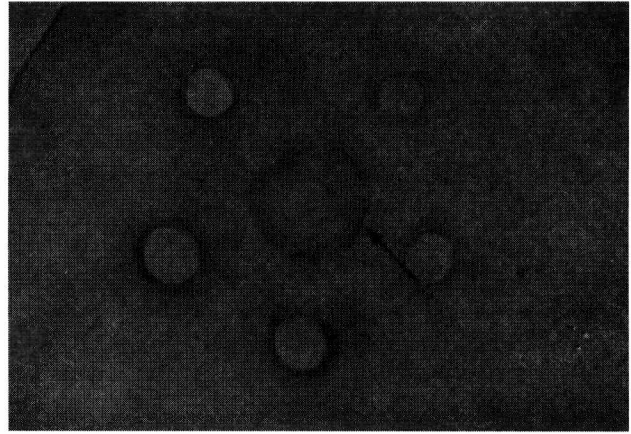
BULGULAR

Bu çalışmanın ilk aşamasını oluşturan yöntem oturtma ve uygun antijen-antikor konsantrasyon oranlarını saptamak için yaptığımız deneylerde; sağlıklı olduğunu belirten erkeklerden alınan seminal sıvı ile postkoital test yaptırmak için gelen hastalardan alınan vaginal sürüntü örneklerinde, p30 antijeni bir seminal sıvı hariç hepsinde uygulanan yöntemle gösterilebilmiştir. p30 antijeni gösterilemeyen Olgu 1'de, antiserum üreten ticari firmanın kullanım talimatına uygun olarak anti-PSA 1/50 oranında sulandırılarak, 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, ve 1/16 oranında sulandırılan seminal sıvı örnekleri kullanılarak çalışıldı (Tablo I).

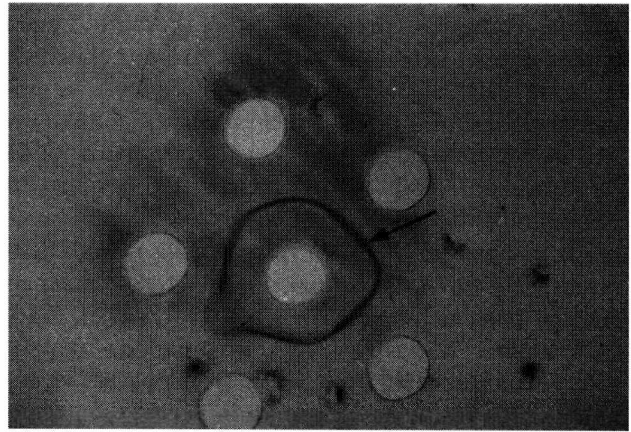
Cinsel birleşme sırasında kondom kullanan ve değişik nedenlerden dolayı uzun süredir cinsel ilişkide bulunmayan olgularda ise, yalancı pozitif sonuca rastlanmamıştır. Negatif kontrol grubu olarak kullandığı-

Tablo II: Negatif Kontrol Grubunun Özellikleri.

Olgu No	Materyal	Özelliği	Postkoital		p30	Sperm	
			Interval			H.E.	Berg
Olgu 8	Vajinal Sürüntü	Tedavide	22	gün	-	-	-
Olgu 18	Vajinal Sürüntü	Condom	6	saat	-	-	-
Olgu 19	Vajinal Sürüntü	Condom	8.5	saat	-	-	-
Olgu 24	Vajinal Sürüntü	Condom	35	saat	-	-	-
Olgu 28	Vajinal Sürüntü	Condom	31	saat	-	-	-
Olgu 35	Vajinal Sürüntü	Dul	6	yıl	-	-	-



Resim 3- Seminal plazma ile yapılan çalışma sonucu elde edilen presipitasyon bantları



Resim 4- Vajinal sürüntü ile yapılan çalışma sonucu elde edilen presipitasyon bantları

mız bu olgular ayrıca farklı iki sitolojik çalışma (Hematoksilen-Eozin ve Berg'in özel sperm boyası) ile de kontrol edildi (Tablo II).

Seminal sıvıyla yapılan immünodiffüzyon çalışmalarında en iyi presipitasyon bandı; 1/1 anti-PSA'da (15 µl) 1/8 ve 1/16 oranında sulandırılmış seminal plazma (10µl) ile, 1/2 oranında sulandırılmış anti-PSA da (15 µl) 1/40, 1/80 oranında sulandırılmış seminal plazma (10 µl) ile elde edildi (Resim 3).

Vajinal sürüntülerden elde edilen en iyi presipitasyon bandı, sürüntü pamuğundan elde edilen 10 µl ekstrakt ile 1/1 ve 1/2 oranında sulandırılmış anti-PSA (15 µl) ile elde edildi (Resim 4).

Tablo III: Cinsel Birleşme Sonrası Vajinasını Yıkamayan Olgulardan Alınan Vajinal Sürüntü Örneklerde p30 Antijen Gösterimi. Örneklerde p30 Antijen Gösterimi.

Olgu No	Postkoital Interval	p30 antijeni	SPERM	
			H.E	BERG
Olgu 10	7 gün	-	-	-
Olgu 11	58 saat	-	-	-
Olgu 12	12 saat	-	-	-
Olgu 13	4 gün	-	-	-
Olgu 14	11 saat	-	+	+
Olgu 15	14 saat	-	-	-
Olgu 20	36 saat	-	-	-
Olgu 21	11 saat	-	-	-
Olgu 22	52 saat	-	-	-
Olgu 23	50 saat	-	-	-
Olgu 25	12 saat	-	-	-
Olgu 26	35 saat	-	-	-
Olgu 27	47 saat	-	-	-
Olgu 29	153 saat	-	-	-
Olgu 30	36 saat	-	-	-
Olgu 31	5.5 saat	+	-	-
Olgu 32	6 saat	+	+	+
Olgu 33	7 saat	+	-	-
Olgu 34	58 saat	-	-	-
Olgu 36	106 saat	-	-	-
Olgu 37	36 saat	-	-	-
Olgu 38	57 saat	-	-	-
Olgu 39	7 saat	+	+	+
Olgu 40	13 saat	-	+	+
Olgu 41	62 saat	-	-	-
Olgu 42	6.5 saat	+	+	+
Olgu 43	33 saat	-	+	+
Olgu 44	8 saat	-	+	+
Olgu 45	8 saat	-	+	+
Olgu 46	4.5 saat	+	+	+
Olgu 47	6 saat	+	+	+
Olgu 48	8.5 saat	-	+	+

Çalışmamızın ikinci aşamasında vaginal sürüntü aldığımız 32 örnekte 7 tanesinde, immünodiffüzyon yöntemi ile p30 antijeninin varlığı gösterildi. p30 antijeni saptadığımız bu 7 olguda, en uzun postkoital interval 7 saat, en kısa postkoital interval 4.5 saat idi. İki olguda ise yalnızca p30 antijeni gösterilirken farklı iki teknikle yapılan sitolojik çalışmalarda spermatozoaya rastlanmadı. 32 olguda p30 antijeni gösterilebilen postkoital interval Tablo III'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada Adli Tıp Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarı koşullarında seminal sıvının varlığının gösterilebilmesi için p30 antijeni Ouchterlony yöntemi (çift yönlü immünodiffüzyonu) ile çalışılmıştır. Yöntemin p30 antijeninin göstermedeki üstünlükleri ve yetersizlikleri araştırılmıştır.

Seminal sıvının belirlenmesi için spermatozoa aranması klasik olarak güvenilir kabul edilmekle birlikte, tüm negatif veya şüpheli olgularda p30 antijeni

gibi seminal sıvının varlığını gösterecek diğer laboratuvar incelemelerinin de yapılması gerektiği görüşündeyiz. Çalışmamızda Ouchterlony yöntemi ile p30 antijeni gösterebildiğimiz en uzun postkoital interval 7 saattir.

"Crossed-over immünoelektroforezis" (karşılıklı=çift yönlü immünoelektroforezis) yöntemi ile postkoital intervalleri bilinen olgularda yapılan iki çalışmanın birinde; p30 antijeni maksimum 8 saat içinde gösterilebilirken, diğer çalışmada tüm olgularda 6 saat içinde p30 antijeni gösterilmiş, yalnızca iki olguda 11. ve 16. saatlerde p30 antijeninin gösterilebildiği belirtilmektedir. ELİSA yöntemi ile p30 antijeninin vaginada 27 saat civarında kaybolduğu bildirilirken, bir sandwich enzim immunoassay yöntemi ile p30 antijeninin postkoital 24 saat içinde vaginada gösterilebileceği belirtilmektedir (6, 25-26, 28).

Çalışmamızda antijen kuyularına yerleştirdiğimiz pamuk parçaları ile santrifüj sonrası elde ettiğimiz ekstraktlar arasında yaptığımız karşılaştırmada; 2 örnekte yalnızca pamuk gömülen kuyu ile antikör arasında presipitasyon bandı gözlenmiştir. 6 örnekte ise hem pamuk parçalarında hemde pamuktan elde edilen ekstraktlarda presipitasyon bandı gözlenmiştir. 2 örnekte ise pamuk gömülen kuyuda presipitasyon bandı çok zor izlenirken, ekstraktlarda presipitasyon bandı net izlenmiştir. Bu nedenle bu yöntemle yapılacak çalışmalarda; hiçbir işlem yapılmadan sürüntü pamuğunun bir parçası ile sürüntü pamuğundan elde edilen ekstraktın, aynı zamanda çalışılmasının daha sağlıklı sonuç vereceği görüşündeyiz.

"Crossed-over immünoelektroforezis" yöntemiyle antijen kuyularına yerleştirilen sürüntü parçaları ve sürüntü ekstraktları arasında yapılan bir karşılaştırmada; postkoital bütün ekstraktlarda 8 saat içinde presipitasyon bandını gösterilirken, sürüntü parçalarında bariz presipitasyon bandının 4 saatlik postkoital intervali olanlarda tesbit edildiği bildirilmiştir (26).

p30 antijen tayinindeki artan başarının; sürüntü ekstraktının konsantrasyonuna, yıkama evresindeki zaman uzunluğuna, vaginal sıvıdaki proteinin konsantrasyonuna (dilüsyonuna), çalışmada kullanılan PSA miktarına, vaginadan sürüntü alırken pamukların iyi ıslanmaması ve sürüntü alınan materyallerin yapısal farklılığına, seminal p30 antijen konsantrasyonuna, koitustan sonraki örnek alım intervaline, seminal birikinti miktarına, şahsın banyo yapıp yapmamasına, örnek alma tekniğine, yetersiz sürüntü alınmasına, postkoital vaginal pH'ya, cinsel ilişki sonrası drenaja, örnek alımı ile laboratuvara getiriliş arasındaki süreye bağlı olacağı belirtilmektedir (6, 26, 28, 37-39).

Bu çalışmada, fakültemiz mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan ve sonra sterilizasyonu sağlanan pamuklu eküvyonlar kullanılmıştır. Çalışmamızda hastalardan aynı anda biri kadın doğum kliniği incelemeleri için, ikisi bu çalışma için 3 vaginal sürüntü alınmış-

tır. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan pamukta, materyal miktarının azalmış olabileceğini düşündük. Özellikle 24 saatin altındaki olgu çalışmalarındaki negatif sonuçların en azından bazılarının bu azalmaya bağlı olabileceği kanısındayız.

Deney sonuçlarını etkileyen bu temel faktörlerin dışında; toplumsal ve coğrafi özelliklerin, gelenek ve göreneklerin, şahısların eğitim durumunun deney sonucunu etkileyebileceği kanısına varılmıştır. Nitekim çalışmamız sırasında, toplumumuzdaki kadınlarda cinsel birleşme sonrası vagina yıkama alışkanlığının yaygın olduğu ve bazılarının bunu gizleme yoluna gittiği gözlenmiştir. Bunun dışında kadınların koitus zamanını saat olarak bildirmede zorlandıkları izlenmiştir. Bütün bunların rutin uygulamalar sırasında yanıltıcı sonuçlara yol açabileceği kanısındayız.

Bu çalışmanın ilk aşamasını oluşturan yöntem oturtma ve uygun antijen-antikör konsantrasyon oranlarını belirlemek için yapılan deneylerde; yalancı pozitif sonuca rastlanmaması ve seminal sıvı çalışmalarının hepsinde p30 antijeninin gösterilebilmesi, bize çift yönlü immünodiffüzyon yöntemiyle p30 antijeninin gösterilebileceğini kanıtlarken, bu yöntemin seminal sıvının varlığının saptanmasında kullanılabileceğini gösterdi. Elde daha gelişmiş teknolojilerin olmadığı laboratuvar şartlarında, alınan örneklerde spermatozoaya rastlanmasının anlamlı bir bulgu olarak değerlendirilmesi gerektiği, aynı koşullarda spermatozoa gösterilememesi halinde; p30 antijeni gösterilebiliyor ise bunun pozitif bir bulgu olarak ele alınması ve spermatozoa aranması ile ilgili incelemelerin tekrarlanması gerektiği görüşündeyiz.

Seksüel saldırılarda objektif kriterlerin ortaya konmasında laboratuvar çalışmalarına gereken önemin verilmesi, bu amaçla yönelik yöntemlerin kullanıma girmesinin bir an önce gerçekleşmesi gerektiği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Gordon I, Shapiro HA, Berson SD. Forensic Medicine, A Guide to Principles. 3th ed. New York: Churchill Livingstone, 1988:357-67.
2. Schiff AF. Rape. In: Tedeschi CG Eds. Forensic Medicine. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1977: 939-57.
3. Gee DJ. Sexual Offences. In: Polson CJ Eds. The Essentials of Forensic Medicine. 3th ed. Oxford: Pergamon Press, 1973: 500-12.
4. Salaçin S, Kellece L, Altun A. Adli Amaçlarla Kan ve Semen Lekelerinin İdentifikasyon ve Kimliklendirilmesinde Kullanılan Yöntemler. Ç.Ü. Arşiv Dergisi, 1994; 3:25-34.
5. Atasoy S. Lekelerde Semen İdentifikasyonu. ATD, 1989; 5:49-66.
6. Stubbings NA, Newall PJ. An Evaluation of Gama-Glutamyl Transpeptidase (GGT) and p 3 0 Determinations for the Identification of Semen on Postcoital Vaginal Swabs. J Forensic Sci, 1985; 30(3):604-14.
7. Rogers C, Bernstein G, Nakamura R, Endahl G, Bhoopat T. Vaginal Fluid Zinc Concentration as a Marker for Intercourse. J Forensic Sci, 1988; 33(1):77-83.
8. Hooft P, Voorde HV. Evaluation of The Modified Zinc Test and Acid Phosphatase Test as Preliminary Screening Methods in Sexual Assault Case Material. Forensic Sci Int, 1992; 53:135-41.
9. Doss SH, Louca NA. Semen Finger Print. Forensic Sci Int, 1991; 51:1-12.
10. Steinman G. Rapid Spot Tests for Identifying Suspected Semen Specimens. Forensic Sci Int, 1995; 72:191-7.
11. Verbovaya LV, Ivanov PL. "Sexing" Deoxyribonucleic Acid(DNA) on DNA Fingerprint Gel: An Internal Control For DNA Fingerprint Evidence. J Forensic Sci, 1991; 36(4):991-8.
12. Sawazaki K, Yasuda T, Nadano D, Tenja E, Iida R, Takeshita H, Kishi K. A New Individualization Marker of Semen: Deoxyribonuclease I (DNase I) Polymorphism. Forensic Sci Int, 1992; 57:39-44.
13. Yoshida K, Sekiguchi K, Mizuno N. The Modified Method of Two-Step Differential Extraction of Sperm and Vaginal Epithelial Cell DNA From Vaginal Fluid Mixed With Semen. Forensic Sci Int, 1995; 72:25-33.
14. Armbruster DA. Prostate-Specific Antigen: Biochemistry, Analytical Method and Clinical Application. Clin Chem, 1993; 39(2):181-95.
15. Bilhartz DL, Tindall DJ, Oesterling JE. Prostate-Specific Antigen and Prostatic Acid Phosphatase: Biomolecular and Physiologic Characteristics. Urology, 1991; 38:95-102.
16. Brawer MK. Prostate Specific Antigen. Acta Oncologica, 1991; 30(2):161-8.
17. Lilja H. Structure, Function and Regulation of The Enzyme Activity of Prostate-Specific Antigen. J Urol, 1993; 11:188-91.
18. Hara M, Kimura H. Two Prostate-Specific Antigens, Gama-Seminoprotein and β -Microseminoprotein. J Lab Clin Med, 1989; 113(5): 541-8.
19. Kaballin JN. Prostate-Specific Antijen. West J Med, 1991; 155(6):632.
20. Gittes RF. Prostate-Specific Antijen. N Engl J Med, 1987; 317(15):954-5.
21. Turkes A, Nott JP, Griffiths K. Prostate-Specific Antigen: Problems in Analysis. Eur J Cancer, 1991 27(5): 650-2.
22. Sensabaugh GF, Blake ET. Seminal Plasma Protein p30: Simplified Purification and Evidence For Identity with Prostate Specific Antigen. J Urol, 1990; 144:1523-6.
23. Lilja H. Significance of Different Molecular Forms of Serum PSA. Urol Clin North Am, 1993; 20(4):681-6.
24. Schaller J, Akiyama K, Tsuda I, Hara M, Martı T, Rıcklı EE. Isolation, Characterization and Amino-Acid Sequence of Gama-Seminoprotein, A Glycoprotein From Human Seminal Plasma. Eur J Biochem, 1987; 170:111-20.
25. Graves HB, Sensabaugh GF, Blake ET. Postcoital Detection of a Male-Specific Semen Protein. Engl J Med, 1985; 312(6):338-43.

26. Poyntz FM, Martin PD. Comparison of p30 and Acid Phosphatase Levels in Post-Coital Vaginal Swabs From Donor and Casework Studies. *Forensic Sci Int*, 1984; 24:17-25.
27. Kamenev L, Leclercq M, Gerard CH. Detection of p30 Antigen in Sexual Assault Case Material. *J Forensic Sci Soc*, 1990; 30(4):193-200.
28. Kamenev L, Leclercq M, Gerard CF. An Enzyme Immunoassay for Prostate-Specific p30 Antigen Detection in the Postcoital Vaginal Tract. *J Forensic Sci Soc*, 1989; 29(4):233-41.
29. Sensabaugh GH. Isolation and Characterization of a Semen-Specific Protein from Human Semen Plasma: A Potential New Marker for Semen Identification. *J Forensic Sci*, 1978; 23:106-15.
30. Stites DP. Laboratory Methods for Detection of Antigens & Antibodies. In Fudenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Well JV Eds. *Basic & Clinical Immunology*, Canada: Lange Medical Publications, 1976:281-315.
31. Steward M, Male D. Immunological Techniques. In Roitt IV, Brostoff J, Male DK Eds. *Immunology*, Third Ed. London: Mosby-Year Book Europe Limited, 1993:1-13.
32. Akan E. Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları No 16, Adana: Güney Matbaacılık, 1992: 330-51.
33. Gülmenoğlu E. Bağışıklığın Temelleri. 3.Baskı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları A/16. Ankara: Sevinç Matbaa, 1983:121-34.
34. Ablin RJ. Immunologic Studies of Normal, Benign and Malignant Human Prostatic Tissue. *Cancer*, 1972; 29:1570-4.
35. Caldwell JL. Antijen-Antibody Reactions. In Fudenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Well JV Eds. *Basic & Clinical Immunology*, Canada: Lange Medical Publications; 1976:41-51.
36. İşbir T. Elektroforez. Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya ABD Notları. Adana:1992.
37. Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM, Sterner R Eds. *Textbook of Physiology Vol.2*. 21th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1989: 1363-6.
38. Stowell LI, Sharman LE, Hamel K. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Prostate Specific Antigen. *Forensic Sci Int*, 1991; 50:125-8.
39. Findley TF. Quantitation of Vaginal Acid Phosphatase and Its Relationship to Time of Coitus. *Am J Clin Pathol*, 1977; 68(2):238-42

Yazışma Adresi:

Uz.Dr. Hakan ÖZDEMİR
Sağlık Bakanlığı
Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü
Yüksek Sağlık Şurası Şube Müdürü
ANKARA

Tel: 0312 4331350

Faks: 0312 4344449