proLékaře.cz | 10.11.2026

Separace spermií pomocí mikromanipulátoru z neobvyklého forenzního vzorku – kazuistika

David Vlček[1], Dan Vaněk[2,3], Jaromír Mikeš[4], Martin Kováč[5], Dalibor Kállay[5]

[1] Kriminalistický a expertizní ústav PZ Košice
[2] Forenzní DNA servis, Praha
[3] 2.lékařská fakulta UK, Praha
[4] Ústav biologických a ekologických věd, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ Košice
[5] Soudně-lékařské a patologicko-anatomické pracoviště ÚDZS Prešov

SOUHRN

Cílem této práce je informovat o způsobu zpracování neobvyklého forenzního biologického materiálu předloženého k případu znásilnění. V rámci případu byl analyzován preparát připravený nátěrem vzorku poševního výtěru a obarvený směsí hematoxylin-eozin. Po odstranění krycího sklíčka se pomocí kapiláry mikromanipulátoru nepodařilo zajistit spermatické buňky a tyto se navíc vlivem mechanického namáhání začaly rozpadávat. Za hlavní příčinu selhání při disekci buněk považujeme pokročilou lyzi buněk. S ohledem na negativní výsledky autoři doporučují nápravná a preventivní opatření, jež zvýší šance na pozitivní identifikaci v obdobných sexuálně orientovaných případech.

Klíčová slova: Forenzní – mikrodisekce – DNA identifikace – odběr vzorků – sexuálně orientovaný trestný čin

Separation of Sperm by Micromanipulator from Unusual Forensic Sample – case report

SUMMARY

The aim of this study is to provide an information about the method of processing of unusual forensic sample that was submitted for the sexual assault case. We analyzed microscopic sample of vaginal swab stained using the hematoxylin-eosin mixture. After removing the covering glass we failed to collect the sperm cells to the micromanipulator capillary. The cells even started, due to the mechanical stress, to fall apart. We think that the main reason of the microdissection failure is the advanced cell lysis. Due to the negative results of the DNA analysis we defined a set of preventive and corrective actions that would (in case of application) increase the chance of positive identification in similar sexual assault cases.

Keywords: Forensic – microdissection – DNA identification – sampling – sexual assault

Soud Lek 2013; 58(2): 16–18

Diferenciální izolace DNA slouží k oddělení frakce ženských epitelií a mužských spermií u vzorků poševních výtěrů u případů znásilnění. Princip této metody (1) spočívá v tom, že spermie mají tužší membránu než epiteliální buňky a proto je možné provádět postupnou lyzaci buněčných frakcí. Alternativou k diferenciální extrakci je laserová mikrodisekce (2), při které se z mikroskopického preparátu laserem vyřezávají pouze spermie.

Obě tyto metody jsou neúčinné v případech, kdy násilník v minulosti podstoupil vasektomii, nebo když je násilník azoospermik (v seminální tekutině nejsou přítomné spermie). Snaha o oddělení mužské a ženské frakce je dána skutečností, že v případě analýzy DNA ze smíšeného biologického vzorku získáme ve většině případů smíšený DNA profil a tento má nižší identifikační hodnotu. Pokud jsou spermie degradované z důvodu delšího postkoitálního intervalu, tak je metoda diferenciální extrakce DNA neúčinná a naopak může dojít ke ztrátě části izolované DNA.

✉ ***Adresa pro korespondenci:***
MVDr. David Vlček
Kriminalisticko expertizní ústav PZ
Kuzmányho 8, 041 02 Košice, Slovenská republika
e-mail: david.vlcek@minv.sk

NÁLEZ

Zemřelá žena byla v mrazivém zimním období nalezena, jak leží oblečená na matraci blízko svého obydlí. Okolnosti nálezu naznačovaly umrznutí v souvislosti s požitím nadměrného množství alkoholu bez jakéhokoli násilí. Základní ohledání těla bylo provedeno na Soudně-lékařském a patologicko-anatomickém pracovišti ÚDZS Prešov. Vyšetřením krve a moče odebrané při pitvě byly metodou plynové chromatografie a Widmarkovou zkouškou zjištěny v krvi koncentrace 3,05 promile, v moči 4,21 promile, což jsou koncentrace, jež lze ze soudně-lékařského hlediska hodnotiti jako akutní otravu etylalkoholem. Jako příčina úmrtí bylo uvedeno selhání srdeční a dýchací činnosti v důsledku podchlazení organizmu a akutní otravě etylalkoholem. Z poranění byly zjištěny jen kožní odřeniny, kožní škrábance a krevní podlitiny. V rámci následného vyšetřování vyplynula možnost znásilnění poškozené před smrtí. Z důvodu ověření této hypotézy bylo 1 den po první pitvě provedeno následné ohledání těla a na vatové tampony byly zajištěny poševní výtěry a zároveň provedeny nátěry zajištěného biologického materiálu na sklíčko. Několik spermií bylo detekováno pouze v obarvených mikroskopických preparátech.

Ke genetickému zkoumání v rámci případu sexuálně orientovaného násilného trestného činu byly na Kriminalistickému a expertiznímu ústavu PZ Košice předloženy oděvní součástky poškozené,

proLékaře.cz | 10.11.2026

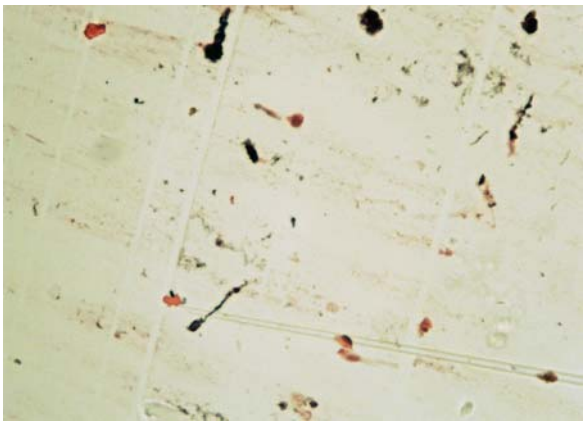
jakožto i nespotřebované poševní výtěry a mikroskopický preparát s detekovanými hlavičkami spermií. Průkaz přítomnosti spermatu na předložených stopách a vzorcích se prováděl pomocí orientačního fosfatázového testu (Phosphatestmo KM, Macherey-Nagel) a specifického testu na přítomnost prostatického specifického antigenu (PSA Semiquant, SERATEC, Německo). Oba testy byly negativní. I přes negativní průkaz spermatu byla z poševních výtěrů metodou diferenciální lýze provedena izolace DNA. Tato DNA byla následně amplifikována pomocí amplifikačních souprav AmpF@STR® NGM™ PCR Amplification Kit a AmpFLSTR® Yfiler® PCR Amplification Kit (Life Technologies, USA), přičemž pozdější jmenovaná amplifikační souprava amplifikuje pouze STR (short tandem repeat = krátké tandemové repetice) lokusy umístěné na mužském Y-chromozómu. Genetickou analýzou DNA izolované z poševních výtěrů se nepodařilo prokázat přítomnost mužského biologického materiálu.

MATERIÁL A METODIKA

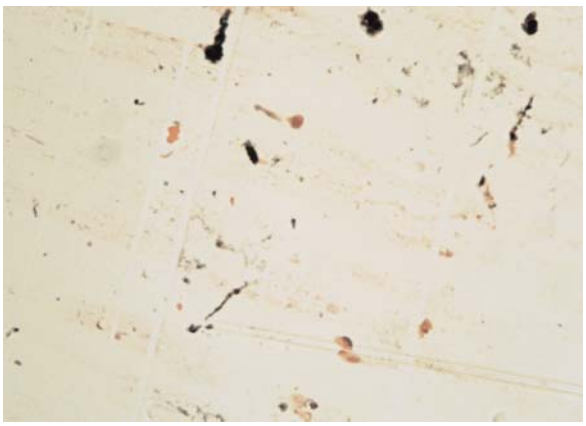
Mikroskopická sklíčka s pozitivním nálezem spermií byla barvena směsí hematoxylin-eozin. Za účelem otestování metody izolace DNA z takto ošetřených vzorků biologického materiálu byly připraveny nátěry referenčního vzorku spermatu na sklíčko a tyto byly obarveny stejně jako výše definovaný forenzní vzorek. Tyto kontrolní vzorky byly zpracovány 3 různými metodami izolace DNA: izolace v 5% suspenzi chelatačního činidla (Chelex-100, Bio-Rad, USA) s přidaným DTT a proteinázou K (3); organická fenol-chloroformová izolace z lyzačního pufru obsahujícího proteinázu K a DTT; izolace pomocí komerční soupravy ARCTURUS® PicoPure® DNA Extraction Kit (Life Technologies, USA). Z hlediska kvality finálních DNA profilů se jako nejvhodnější ukázaly izolace pomocí soupravy PicoPure a dále izolace suspenzí Chelexu, ale jelikož při nátěrech spermatu na sklíčko při přípravě referenčních vzorků nebylo možné dosáhnout aplikace stejného množství spermií, tak není toto porovnání zcela objektivní. V každém případě byla ověřena použitelnost všech testovaných metod izolace pro vzorky barvené směsí hematoxylin-eozin.

Za účelem odejmutí krycího sklíčka z forenzního vzorku byla na vzorek neúspěšně aplikována teplota 60-70 °C po dobu 2 hodin. Odejmutí krycího sklíčka bylo možné až po zvýšení teploty na 80-85 °C, přidání xylenu a inkubaci po dobu 2 hodin.

Mikroskopický preparát s odejmutým krycím sklíčkem byl zkoumán v mikroskopu Leica DMI6000B a pokus o vyjmutí spermatických buněk byl proveden pomocí mikromanipulátoru TransferMan NK2 s kapilárou TransferTip (ICSI) (Eppendorf AG, Německo). Při mikroskopickém pozorování byla na hlavičkách spermií při porovnání s referenčním vzorkem zřetelné známky lýze (viz obr. č.1). Manipulace se vzorkem v mikromanipulátoru probíhala v xylenovém médiu, ale bohužel se nepodařilo buňky natáhnout do kapiláry. Po opakovaných pokusech se navíc buňky začaly rozpadávat na menší kousky (viz obr. č.2).



Obr. 1. Proces separace spermie z preparátu. Barveno hematoxylinem eozinem (zvětšení 400x).



Obr. 2. Rozpad buňky z důvodu mechanického namáhání při procesu separace spermie z preparátu. Barveno hematoxylinem eozinem (zvětšení 400x).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Genetická identifikace donora spermií nalezených v mikroskopickém preparátu z poševním výtěru byla neúspěšná z důvodu selhání při mikromanipulaci. Za hlavní příčinu je možné určit degradaci zkoumaného biologického materiálu. S ohledem na závažnost případu, kde díky negativní DNA identifikaci nebylo možné přímo určit donora biologického materiálu v poševním výtěru poškozené, byla provedena důkladná analýza použitých postupů a byla navržena následující nápravná a preventivní opatření, jež povedou ke zvýšení pravděpodobnosti získání pozitivních výsledků DNA identifikace v obdobných případech:

1) Zajištění poševních výtěrů

Poševní výtěry by měly být standardně zajišťovány u všech případů, kde nelze vyloučit cizí zavinění či znásilnění. Zajištění poševního (popřípadě rektálního) výtěru by mělo být provedeno jako bezodkladný úkon, jelikož degradace biologického materiálu se zvyšuje s prodlužujícím se časovým intervalem a z důvodu degradace následně klesá pravděpodobnost úspěšné genetické identifikace.

2) Odběrové tampony

Současná forenzně-genetická praxe požaduje, aby byly vzorky biologického materiálu zajišťovány výhradně na takové přípravky (v tomto případě tampony), které jsou certifikovány pro forenzní použití (4). Konkrétně je nutné, aby na přípravcích nebyla přítomna lidská DNA, DNázy (enzymy degradující DNA) a inhibitory polymerázové řetězcové reakce (PCR) reakce. Dalším významným faktorem ovlivňujícím úspěšnost genetické analýzy je typ materiálu použitý při výrobě tamponu. S ohledem na výtěžek DNA jsou mnohem vhodnější tampony s nylonovými vlákny vyrobené technologií nastřelovaných nylonových vláken („flocked swab") (5).

3) Stabilizace vzorků zajištěných na tampon

Ve vlhkém prostředí dochází při normální teplotě okolí působením mikroorganizmů k velmi rychlé degradaci biologického materiálu zajištěného na tampon (4). Stabilizace vzorku je možné dosáhnout a) umístěním do prodyšného obalu; b) chlazením; c) použitím odběrové soupravy s desikantem; d) použitím stabilizačních agens, jež ochrání integritu DNA v buňkách i při uložení vzorku v běžné teplotě (6).

proLékaře.cz | 10.11.2026

4) Způsob barvení vzorků

Barvení vzorků směsí hematoxylin-eozin není s ohledem na degradaci DNA vhodnou metodou. Namísto klasických metod barvení pro světelnou mikroskopii by bylo s ohledem na následné genetické zkoumání lepší aplikovat barvení fluorescenčními barvičkami, například pomocí komerční soupravy Sperm HY-LITER™ (7). Pro každou zvažovanou barvičku je nutné provést validační studii prověřující inhibiční efekt na PCR.

5) Mikrodisekce

Ve vědecké literatuře je pro izolaci jednotlivých buněk z mikroskopických preparátů a následnou genetickou většinou doporučována laserová mikrodisekce (8-10), ale zde navržená metoda použití mikromanipulátoru a kapiláry je levnější a dostupnější alternativou k této metodě. Použitelnost této metody byla v rámci této studie otestována na referenčním vzorku spermatu.

LITERATURA

1. **Gill P et al.** Forensic application of DNA fingerprints. *Nature* 1985; 318: 577-579.
2. **Elliott K, Hill DS, Lambert C, Burroughes TR, Gill P.** Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Sci Int* 2003; 137: 28–36.
3. **Walsh PS, Metzger D, Higuchi R.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio Techniques* 1991; 10: 506-518.
4. **Vaněk D.** Forenzní genetika v procesu dokazování, nakladatelství *Forensica*, kapitola Zajišťování vzorků pro analýzu DNA na místě činu a v laboratoři, 2011; 38-45.
5. **Benschop CC, Wiebosch DC, Kloosterman AD, Sijen T.** Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. 2010; 4(2): 115-21.
6. **Allen-Hall, D. McNevin.** Human tissue preservation for disaster victim identification (DVI) in tropical climates, *Forensic Science International: Genetics*, 2012; 6(5): 653-657.
7. **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 Science International: Genetics Supplement Series* 2011; 3(1): e31-e32.
8. **Seidl S, Burgemeister R, Hausmann R, Betz P, Lederer T.** Contact-Free Isolation of Sperm and Epithelial Cells by Laser Microdissection and Pressuere Catapulting. *Forensic Science, Medicine and Pathology* 2005; 1(2): 153-158.
9. **Vandewoestyne M, Hoofstat D, Nieuwerburgh F, Deforce D.** Automatic detection of spermatozoa for laser capture microdissection. *International Journal of Legal Medicine* 2009; 123(2): 169-75.
10. **Vandewoestyne M, Hoofstat D, Nieuwerburgh F, Deforce D.** Evaluation of three DNA extracion protocols for forensic STR typin after laser capture microdissection, *Forensic Science International: Genetics* 2012; 6: 258-262.