

# Genetyka

NUMER 3-4 (20-21)  
WIOSNA 2014  
ISSN 2080-7775

KWARTALNIK NAUKOWY  
ZAKŁADU GENETYKI  
MOLEKULARNEJ I SĄDOWEJ

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA  
COLLEGIUM MEDICUM  
KATEDRA MEDYCyny SĄDOWEJ

+ PRAWO



**LABORATORIA AKREDYTOWANE  
– CO TO WŁAŚCIWIE ZNACZY?**

STR. 8-9

## DRODZY CZYTELNICY!

„Akredytacja na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025 dla laboratoriów badawczych” – trudno sobie wyobrazić bardziej niszowy temat numeru „G+P”. A jednak problem akredytacji od dłuższego czasu dosłownie elektryzuje środowisko polskich genetyków sądowych. Przyczyną tej swoistej gorączki są regulacje unijne, według których od listopada 2013 r. laboratoryjnych dostawców badań DNA dla potrzeb kryminalistyki z państw członkowskich zobowiązuje się do uzyskania akredytacji na zgodność z cytowaną normą. Akredytacja taka jest istotnym narzędziem proaktywnym – pomaga ona dobrym laboratoriom w ciągłym doskonaleniu się. Jednocześnie zlecniodawcy badań genetyczno-sądowych uzyskują jedno z obiektywnych kryteriów, którym mogą się kierować w wyborze placówek realizujących ich zlecenia. Norma zapewnia miarodajność oraz uznanie wyników badań danego laboratorium w różnych krajach, co w kontekście usług badawczych z zakresu genetyki sądowej, takich jak np. identyfikacja śladów biologicznych czy ofiar katastrof, może mieć niebagatelne znaczenie.

Przysłuchując się jednak od dłuższego czasu dyskusjom na temat akredytacji, a także kierując pracami, które zostały uwieńczone uzyskaniem akredytacji przez laboratoria naszej Katedry Medycyny Sądowej, nie mogłem się oprzeć wrażeniu, że narastają na tym tle pewne nieporozumienia. Jakiś czas temu podczas seminarium naukowego jeden z dyskutantów wyraził pogląd, że w chwili obecnej zlecniodawcy badań kierujący swe postanowienie do jednostki akredytowanej mogą się czuć absolutnie komfortowo – norma zabezpieczy ich przed wszystkimi niebezpieczeństwami, które mogą towarzyszyć nawet najtrudniejszym badaniom DNA. Ktoś inny w tym kontekście zadał zdroworozsądkowe pytanie – dlaczego istnieje przestępczość, skoro mamy prawo? W wywiadzie z dr. Tomaszem Kupcem, doświadczonym genetykiem sądowym a zarazem audytorem technicznym Polskiego Centrum Akredytacji znajdziemy właściwą wykładnię tego, czym jest w istocie akredytacja. System zarządzania jakością ugruntowuje, porządkuje i sankcjonuje dobre praktyki, które powinny istnieć w laboratorium na długo przed potwierdzeniem kompetencji i nadaniem stosownego certyfikatu. Co więcej, system podlega ciągłemu doskonaleniu – nie jest absolutnym punktem docelowym, lecz raczej wytyczeniem drogi, którą powinno podążać laboratorium ze swoim kierownictwem, personelem i wyposażeniem. Certyfikat akredytacji nie jest narzędziem marketingowym ani hasłem-wytrychem, które jest odpowiedzią na wszystkie pytania. W naszym zamyśle, materiały zamieszczone w obecnym numerze magazynu powinny być przystępnym i praktycznym wprowadzeniem do tego tematu dla zlecniodawców badań genetyczno-sądowych.

**Prof. dr hab. Tomasz Grzybowski**

Kierownik Katedry Medycyny Sądowej  
oraz Zakładu Genetyki Molekularnej i Sądowej  
Collegium Medicum UMK

## SPIS TREŚCI

- 3-5** **NOWOŚCI W GENETYCE SĄDOWEJ**  
Jak dwie krople wody?  
Nieinwazyjne zbieranie materiału dowodowego.  
Komary a nauka.
- 6-9** **NASZA DZIAŁALNOŚĆ**  
Droga do akredytacji.  
Laboratoria akredytowane – co to właściwie znaczy?
- 10-12** **WYWIAD NUMERU**  
Laboratorium dobrze zarządzane.
- 13-15** **CIĘKAWY PRZYPADKI**  
11 godzin.
- 16-19** **METODY BADAWCZE**  
Alternatywny materiał w badaniu toksykologicznym – ślina.

**WYDAWCA:**  
Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum

**REDAKTOR WYDANIA:**  
Urszula Rogalla

**ZESPÓŁ REDAKCYJNY:**  
Tomasz Grzybowski, Katarzyna Linkowska, Marcin Woźniak,  
Marzena Sykutera, Anna Radziszewska, Przemysław Piotrowski.

**REDAKCJA, PROJEKT GRAFICZNY, PRODUKCJA:**  
FFW Communication Sp. z o.o.

**KOORDYNACJA:**  
Katarzyna Grochowa, FFW Communication Sp. z o.o.

Foto na okładce: Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum  
Zostały podjęte wszelkie środki, aby zawarte w publikacji informacje  
były dokładne i aktualne w dniu oddania do druku. Rozpowszechnianie  
materiałów redakcyjnych bez pisemnej zgody wydawcy jest zabronione.  
Copyright © 2014 ZGMiS, wszelkie prawa zastrzeżone.



## JAK DWIE KROPLE WODY?

ROZRÓŻNIANIE BLIŹNIĄT JEDNOJAJOWYCH JEDNAK MOŻLIWE. DZIĘKI CORAZ DOKŁADNIEJSZYM TECHNIKOM SEKWENCJONOWANIA NOWEJ GENERACJI (ANG. NEXT GENERATION SEQUENCING, NGS) POJAWIŁA SIĘ REALNA MOŻLIWOŚĆ ROZRÓŻNIENIA ZDAWAŁOBY SIĘ, IDENTYCZNYCH POD WZGLĘDEM GENETYCZNYM, OSÓB.

Genetyków zainteresowanych wykorzystaniem nauki dla celów sądowych od dawna nurtuje problem rozróżniania klonów, jakimi są bliźnięta jednojajowe. W standardowej procedurze otrzymywania profilu DNA wykorzystuje się krótkie sekwencje tandemowe (ang. short tandem repeats, STR), które w wypadku tego rodzaju bliźniąt dają identyczne wyniki. Już wcześniej brano pod uwagę zjawisko mozaiki genetycznej, będącej potencjalnym czynnikiem rozróżniającym, jednak próby potwierdzenia tej hipotezy na drodze eksperymentalnej kończyły się fiaskiem.

Grupa niemieckich naukowców, opierając się na tychże założeniach, przeprowadziła doświadczenie na rodzinie pewnych bliźniąt, udowadniając, że rozróżnienie jest jednak możliwe.

Przez pojęcie mozaiki genetycznej rozumiemy obecność w jednym organizmie komórek zawierających odmienne genomy. Przez długi czas teoria ta pozostawała kwestią sporną. Naukowcy sugerowali, że niewielkie mutacje mogą występować już w życiu płodowym na etapie blastocysty, a także w późniejszych etapach rozwoju

listków zarodkowych. W wypadku, gdy do takich zmian dochodziło po rozdzieleniu bliźniąt jednojajowych, istniała szansa na ich identyfikację.

W badaniu wzięła udział najbliższa rodzina braci bliźniaków: dziecko jednego z nich oraz matka dziecka. Od mężczyzny pobrano próbki krwi, nasienia oraz wymazy policzków, od kobiety wymaz, od dziecka jedynie próbki krwi. Badania podzielono na kilka etapów. W pierwszej kolejności potwierdzono monozygotyczność bliźniąt oraz ojcostwo za pomocą standardowej analizy markerów STR. Następnie, bazując na DNA wyizolowanym z nasienia obu bliźniąt oraz krwi dziecka, przygotowano tzw. biblioteki genomowe, które posłużyły do badania całych genomów metodą sekwencjonowania nowej generacji. Ta technika pozwoliła na wielokrotne odczytanie każdego fragmentu, co pozwoliło na wykrycie nawet najmniejszych zmian i potwierdzenie, że są zgodne z matrycowym DNA badanej osoby, a nie błędem. W ten sposób powstały duże bazy danych, które zostały ze sobą szczegółowo porównane. Umożliwiło to znalezienie 5 różnic między pojedynczymi nukleotydami (co

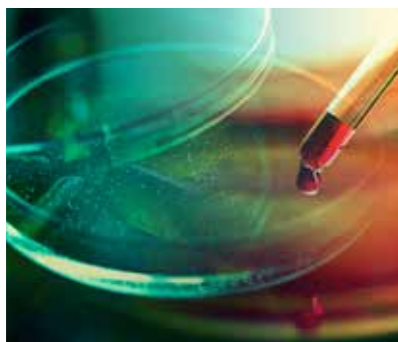
nazywamy polimorfizmem pojedynczego nukleotydu, ang. single nucleotide polymorphism, SNP), które były identyczne u ojca oraz dziecka, natomiast inne u bliźniaka. W trzecim etapie potwierdzono obecność tych pojedynczych różnic za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Analizie poddano jedynie fragmenty zawierające różnice, ale tym razem ujęto wszystkie zebrane próbki, pochodzące z różnych tkanek. Okazało się, że u badanych bliźniąt różnice prawie nie występowały we krwi, co wskazuje na powstanie mutacji w jednym z listków zarodkowych, po gastrulacji, ale przed rozdzieleniem linii komórek odpowiedzialnych za gonady. Analiza wykonana przez niemieckich naukowców jest wprawdzie droga i pracochłonna, pozwala jednak jednoznacznie odróżnić od siebie bliźnięta jednojajowe.

**OPRACOWANIE: ANNA RADZISZEWSKA**

Na podstawie: Weber-Lehmann J. (2014) Finding the needle in the haystack: Differentiating „identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. For. Sci. Int. Genetics 9 42-46

# NIEINWAZYJNE ZBIERANIE MATERIAŁU DOWODOWEGO

JEDNYM Z POWODÓW, DLA KTÓRYCH OFIARY GWAŁTÓW NIE ZGŁASZAJĄ PRZESTĘPSTWA, JEST WSTYD PRZED BADANIEM I ZBIERANIEM MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO SPRAWCY. NOWY SYSTEM, WPROWADZANY W WIELKIEJ BRYTANII, MA OGRANICZYĆ NARUSZANIE INTYMNOŚCI OFIARY.



## EVIDENCE RECOVERY SYSTEM

SYSTEM ODZYSKIWANIA MATERIAŁU DOWODOWEGO. POLEGA NA UMIESZCZENIU SPECJALNIE ZAPROJEKTOWANEJ ZATYCZKI Z MIKROFILTREM DO ODPŁYWU WANNY LUB WOLNO STOJĄCEGO PRYSZNICA. PRZEPIYWAJĄCA WODA POZOSTAWIA NA FILTRZE OSAD ZAWIERAJĄCY WŁOSY, WŁÓKNA, KOMÓRKI NASKÓRKA, NASIENIE I INNE TKANKI LUB ZABRUDZENIA, MOGĄCE ZOSTAĆ WYKORZYSTANE JAKO MATERIAŁ DOWODOWY.

Przestępstwa na tle seksualnym często nie są zgłaszane z powodu traumy i wstydu, które przeżywają ofiary. Badania lekarskie, wykonywane na potrzeby dochodzenia, często są przyczyną dodatkowego stresu. Aby ofiary gwałtu mniej obawiały się procedur, w Wielkiej Brytanii stworzono system odzyskiwania materiału dowodowego (ang. Evidence Recovery System, ERS). Idea polega na umieszczeniu specjalnie zaprojektowanej zatyczki z mikrofiltrem do odpływu wanny lub wolno stojącego prysznica (ang. Forensic Rescue Plug, FRP). Przepływająca woda pozostawia na filtrze osad zawierający włosy, włókna, komórki naskórka, nasienie i inne tkanki lub zabrudzenia, mogące zostać wykorzystane jako materiał dowodowy. W skład zestawu ERS wchodzi trzy takie zatyczki oraz ściereczki do zbierania materiału osadzonego na ściankach wanny lub prysznica. System pozwala na proste i bezinwazyjne uzyskiwanie materiału biologicznego. Jego twórcy mają nadzieję, że pozwoli to na wzrost zgłaszania przestępstw na tle seksualnym oraz zwiększy wykrywalność sprawców.

Naukowcy z Uniwersytetu Teesside postanowili zbadać przydatność poszczególnych elementów ERS do odzyskiwania nasienia w przypadku wykorzystywania płynów do kąpieli i w obecności różnych zanieczyszczeń biologicznych. Zanalizowali również zastosowanie odmiennych metod wykrywania plemników (m.in. poprzez wykrywanie kwaśnej fosfatazy, enzymu produkowanego m.in. przez prostatę i barwienie eozyną i hematoksyliną). W doświadczeniach ERS był

wykorzystany w warunkach zbliżonych do sterylnych, tzn. wanna została dokładnie umyta przed każdorazowym powtórzeniem eksperymentu, aby uniknąć wcześniejszych zanieczyszczeń. Odzyskiwanie plemników z kąpeli z zanieczyszczeniami okazało się być bardziej efektywne niż z czystej wody. Naukowcy tłumaczyli to możliwym zmniejszeniem rzeczywistej wielkości porów, gdy na filtrze zbierały się włosy czy też włókna.

Wykorzystywana metodyka zastosowania ERS zalecana jest do stosowania w ośrodkach zajmujących się ofiarami gwałtu. Zdarza się jednak, że przed zgłoszeniem przestępstwa dochodzi do zatarcia dowodów biologicznych, kiedy ofiara stara się zmyć ślady przestępcy. Naukowcy przeprowadzający omawiane badanie sugerują, że ERS można wykorzystywać również w domu ofiary nawet po kąpieli. Wystarczyłoby wtedy wykorzystać jedynie zatyczkę do odfiltrowania wody z opłukiwanej wanny czy też prysznica. Sugerują przy tym, aby w dalszej kolejności zanalizować jaki odstęp czasu pozwoli na efektywne odzyskiwanie materiału. W kolejnych badaniach należy również sprawdzić możliwość uzyskiwania profilu DNA przestępcy z zebranego materiału, niezbędnego do jego identyfikacji.

OPRACOWANIE: ANNA RADZISZEWSKA

Na podst. Page H. i wsp. (2014)  
The recovery of semen from bath water using the Evidence Recovery System (ERS). Sci Jus 54:89-94



## KOMARY A NAUKA

KOLEJNY SUKCES POŁĄCZONYCH SIĘ ENTOMOLOGII I GENETYKI NA PRZYKŁADZIE ANALIZY LUDZKIEGO DNA UZYSKIWANEGO OD KOMARÓW.

W zeszłym roku donosiliśmy o przełomowej metodzie identyfikacji ofiar, wykonanej przez badaczy z Meksyku, łączącej entomologię oraz genetykę (nr 18/2013), na przykładzie larw much. Tym razem naukowcy z Krety postanowili dokładniej przyjrzeć się możliwości otrzymania profilu DNA z krwi ludzkiej uzyskiwanej z układu trawiennego komarów (Culicidae). Zachęcił ich do tego sukces włoskich kolegów, którzy dokonali podobnej analizy opierając się na jednym tylko owadzie, co pomogło w ujęciu przestępcy. Celem badania Kreteńczyków było ustalenie ilości materiału, możliwego do wyizolowania, oraz czasu, jaki może minąć od ostatniego posilenia się komara krwią, aby uzyskać prawidłowe profile DNA z układu trawiennego komarów. Genetycy schwytali 177 samic komarów, krótko po pożywieniu się świeżą krwią jednej, tej samej osoby. Przechowywano je w probówkach zamkniętych zwilżoną gazą. Do etapu badań przetrwało 156 osobników. Owady zostały podzielone na grupy liczące co najmniej 9 osobników,

które zostały uśmiercone w ośmiodziesięciu odstępach w przedziale od 0-72 godzin po posileniu się (kilka sztuk zostało poddanych analizie w przedziale czasowym 80-152 godzin). Do izolacji krwi ludzkiej wykorzystywano zgniecionie i wyschnięte odwłoki owadów. Wśród komarów stwierdzono obecność dwóch podrodzajów: Anophelinae oraz Culicinae. W przedziale czasu do 32 godzin udawało się wyodrębnić pełny ludzki profil STR w materiale od osobników obu tych podrodzajów, natomiast w dłuższym przedziale czasu lepszym źródłem DNA okazali się przedstawiciele Culicinae. W jednym przypadku udało się uzyskać prawidłowe wyniki nawet po 88 godzinach od ukąszenia, jednak wyniki wskazują wyraźnie, że wydajność identyfikacji znacząco spada wraz z wydłużaniem czasu, podczas którego krew pozostawała pod wpływem enzymów układu trawiennego komarów – o 15,5% na każde 8 godzin. Wykorzystanie analizy ludzkiego DNA wyizolowanego z przewodu pokarmowe-

go komarów może wnieść kilka cennych wskazówek do śledztwa. Pozwoli nie tylko na powiązanie sprawcy z ofiarą, ale dzięki znajomości zwyczajów poszczególnych gatunków komarów, takich jak pory ich aktywności, preferowane środowiska czy też odległości, które owad jest w stanie pokonać, można powiązać ofiarę czy sprawcę z miejscem zbrodni, tak jak miało to miejsce we Włoszech. Tamtejsi śledczy znaleźli w domu potencjalnego sprawcy zabitego komara, z którego udało się wyizolować krew ofiary, co przy analizie zwyczajów tego gatunku pozwoliło na wskazanie przestępcy. Badanie Kreteńczyków nie tylko potwierdziło prawdziwość tej metody, ale również pozwoliło na ocenę jej przydatności dla różnych przedziałów czasowych.

OPRACOWANIE: ANNA RADZISZEWSKA

Na podst. Curic G. i wsp. (2014)  
Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). For Sci Int Genetics 8: 109-112

# DROGA DO AKREDYTACJI

## POTWIERDZENIE KOMPETENCJI

NASZE LABORATORIUM SPEŁNIA NAJWYŻSZE WYMAGANIA, CZEGO POTWIERDZENIEM JEST UZYSKANA AKREDYTACJA NA ZGODNOŚĆ Z NORMĄ PN-EN ISO/IEC 17025:2005. JAK WYGLĄDAŁ PROCES JEJ ZDOBYWANIA?

AUTOR: **KATARZYNA LINKOWSKA**



Decyzję o wdrożeniu wymagań normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005 podjęliśmy praktycznie bez wahania – nie mieliśmy cienia wątpliwości, że wykonywane przez nas badania są najwyższej jakości a uzyskanie akredytacji miało to tylko potwierdzić. Procedura okazała się jednak być dość czasochłonna. Cały proces wdrażania normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005 podzieliliśmy na kilka etapów, które zakładały zarówno przygotowanie dokumentacji, jak i przeszkolenie personelu z wymagań normy. Opracowanie dokumentacji w naszym przypadku było stosunkowo proste. Wystarczyło bowiem po prostu opisać dokładnie to, co i jak robimy wg utartych od lat schematów. Wymagało to jednak trochę czasu, zwłaszcza że czynności te należało połączyć z rutynową pracą. Cały personel szybko przyswoił sobie wymagania normy i podjął wspólny trud realizacji zadania, jakim było uzyskanie akredytacji krajowej jednostki akredytacyjnej, którą jest Polskie Centrum Akredytacji (PCA).

**ZLECAJĄC BADANIA NALEŻY ZWRÓCIĆ UWAGĘ NIE TYLKO NA FAKT POSIADANIA PRZEZ LABORATORIUM AKREDYTACJI, ALE RÓWNIEŻ NA TO CZY BADANIA, KTÓRE MAJĄ BYĆ PRZEPROWADZONE, ZNAJDUJĄ SIĘ W ZAKRESIE AKREDYTACJI TEGO LABORATORIUM.**

Kolejnym etapem było przeprowadzenie wewnętrznego audytu sprawdzającego. Po złożeniu wniosku o akredytację do Polskiego Centrum Akredytacji (PCA), audytorzy PCA skrupulatnie ocenili przesłaną im wraz z wnioskiem dokumentację, a wyniki tej oceny zostały nam przesłane w celu nanieśnięcia niezbędnych poprawek. Po skorygowaniu błędów byliśmy gotowi do oceny w Katedrze. Audyt przeprowadzany

Zgodnie z Decyzją ramową Rady Unii Europejskiej 2009/905/WSISW z dnia 30 listopada 2009 r. (Dziennik Urzędowy L 322, 09/12/2009 P.0014-0016) wszyscy dostawcy usług kryminalistycznych obejmujących badania DNA zobowiązani są uzyskać akredytację na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcowych”.

przez audytorów PCA był najtrudniejszym i najbardziej stresującym momentem w całym procesie akredytacji. Jest to moment, w którym trzeba udowodnić, że wszystkie wymagania normy zostały spełnione oraz że personel posiada kompetencje do wykonywania określonych czynności. Ocena ta wypadła pomyślnie i zaowocowała decyzją o udzieleniu nam akredytacji. Po przejściu tej drogi wiemy już, że w procesie akredytacji trzeba zwrócić uwagę na kilka istotnych elementów.

Po pierwsze, trzeba mieć świadomość, że cały proces akredytacji niesie ze sobą spore koszty. Mam tu na myśli zarówno koszty poniesione na rzecz PCA, związane ze złożeniem wniosku oraz oceną audytorów, ale także koszty poniesione przez laboratorium np. za udział w badaniach biegłości lub porównaniach międzylaboratoryjnych (PT/ILC) czy związane z pełną walidacją metod badawczych. Udział w badaniach biegłości czy porównaniach międzylaboratoryjnych jest jednym z głównych elementów branżowych pod uwagę przy całościowej ocenie laboratorium w procesie akredytacji. Uzyskanie w takich porównaniach certyfikaty świadczą o kompetencji laboratorium do wykonywania określonych badań. Co więcej, stałe poddawanie się takiemu sprawdzeniu pozwala na monitorowanie jakości pracy. To jak często, jakim porównaniem międzylaboratoryjnym i z jakim skutkiem poddaje się laboratorium jest cenną informacją dla audytorów.

Kolejnym elementem, na który należy zwrócić uwagę, jest zakres akredytacji. Laboratorium, występując w wnioskiem o akredytację, samo definiuje obszar swojej działalności, na który zamierza ją uzyskać. W związku z tym zlecając badania, należy zwrócić uwagę nie tylko na fakt posiadania przez laboratorium akredytacji, ale również na to czy badania, które mają być przeprowadzone, znajdują się

Celem tej decyzji jest zapewnienie, aby wyniki czynności laboratoryjnych prowadzonych przez dostawców usług kryminalistycznych akredytowanych na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 w jednym państwie członkowskim były uznawane w każdym innym państwie członkowskim. Akredytacja jest ogólnie przyjętym w Unii Europejskiej potwierdzeniem wiarygodności i jakości wykonywanych

w zakresie akredytacji tego laboratorium. Zakres akredytacji na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 udzielonej Katedrze Medycyny Sądowej (nr akredytacji AB1494) przez Polskie Centrum Akredytacji jest najszerszy wśród dotychczas wydanych (w zakresie genetyki i toksykologii) i obejmuje badania zawartości alkoholu etylowego, ustalanie spornego ojcostwa, analizy pokrewieństwa, badania identyfikacyjne (również materiału silnie zdegradowanego) oraz badania śladów biologicznych wraz z oględzinami. Kończąc chciałabym dodać, że decyzja

**ZAKRES AKREDYTACJI NA ZGODNOŚĆ Z NORMĄ PN-EN ISO/IEC 17025:2005 UDZIELONEJ KATEDRZE MEDYCYNY SĄDOWEJ (NR AKREDYTACJI AB1494) PRZEZ POLSKIE CENTRUM AKREDYTACJI JEST NAJSZERZY WŚRÓD DOTYCHCZAS WYDANYCH (W ZAKRESIE GENETYKI I TOKSYKOLOGII) I OBEJMUJE BADANIA ZAWARTOŚCI ALKOHOLU ETYLOWEGO, USTALANIE SPORNEGO OJCOSTWA, ANALIZY POKREWIEŃSTWA, BADANIA IDENTYFIKACYJNE (RÓWNIEŻ MATERIAŁU SILNIE ZDEGRADOWANEGO) ORAZ BADANIA ŚLADÓW BIOLOGICZNYCH WRAZ Z OGLĘDZINAMI.**

Rady Unii Europejskiej nakładająca obowiązek posiadania akredytacji na wszystkich dostawców usług kryminalistycznych weszła w życie z dniem 30 listopada 2013 r. Jednak my podjęliśmy ten trud nie tylko ze względu na dyrektywę Unii Europejskiej, ale również w nadziei, że jakość jest wartością nadrzędną, przedkładaną nad cenę, którą należy ponieść jako gwarancję tej jakości.

badan. Daje gwarancje, że czynności laboratoryjne prowadzone są zgodnie z właściwymi normami międzynarodowymi, a także potwierdza kompetencje laboratorium do wykonywania badań zgodnie z określonym zakresem akredytacji. Akredytacja instytucji wykonujących ekspertyzy dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości świadczy zatem bezpośrednio o jakości opinioania.

# LABORATORIA AKREDYTOWANE – CO TO WŁAŚCIWIE ZNACZY?

„PROFIL” TO NIE ZNACZY... ZAWSZE TO SAMO

AKREDYTACJA TO NIEWĄTPLIWI SUKCES NASZEGO LABORATORIUM I POTWIERDZENIE JEGO KOMPETENCJI. CO ONA JEDNAK OZNACZA W PRAKTYCE I CO ZYSKUJEMY DZIĘKI UNIJNEJ CERTYFIKACJI?

AUTORZY: TOMASZ GRZYBOWSKI, URSZULA ROGALLA

Zgodnie z często cytowaną w bieżącym numerze naszego magazynu decyzją ramową Rady Unii Europejskiej, akredytacja dostawców usług kryminalistycznych na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 wymagana jest w odniesieniu do czynności laboratoryjnych dających w efekcie „profil DNA” oraz „dane daktyloskopijne”. Ograniczając nasze rozważania do profili DNA musimy stwierdzić, że mogą one w kryminalistyce służyć wielu różnym celom. Na podstawie profili DNA określa się m.in. przynależność osobniczą śladów biologicznych, identyfikuje szczątki ludzkie, bada różne rodzaje pokrewieństwa pomiędzy osobami.

Każde z tych badań może mieć konkretne zastosowanie w kryminalistyce, zależne od okoliczności danej sprawy. Każde będzie również wymagało odrębnego szczegółowego podejścia metodycznego, czyli odrębnej procedury. Inna jest np. specyfika identyfikacji sta-

rego materiału kostnego czy fragmentów włosów nie posiadających cebulki, gdzie trzeba sięgnąć po skomplikowaną analizę sekwencji mitochondrialnego DNA, a inna w przypadku identyfikacji świeżych plam krwi ujawnionych na odzieży, gdzie wystarczy uciec się do znacznie prostszych badań mikrosatelitów (DNA-STR). Oba rodzaje badań, mimo różnych procedur, będą skutkowały wygenerowaniem „profilu DNA”. Cytowana decyzja UE ma jednak charakter bardzo ogólny i nie wprowadza w tym zakresie istotnych rozróżnień. Definiuje co prawda „profil DNA”, ale nie precyzuje jak szeroko należy rozumieć działania laboratoryjne zmierzające do jego uzyskania. Rozsądek podpowiada, że w tej sytuacji laboratoria wykonujące badania DNA dla potrzeb kryminalistyki powinny same wprowadzić te rozróżnienia, tj. jasno wykazać swoim zleceniodawcom jakie badania wykonują, dla jakich celów i za pomocą jakich procedur. Jeśli uczciwie i solidnie

podchodzą do wymogu akredytacji, powinny zróżnicować swoje procedury i ubiegać się o akredytację w możliwie najszerszym zakresie świadczonych usług. Jednocześnie laboratoria muszą w sposób jasny informować, które procedury i jakiego rodzaju badania zostały uhonorowane otrzymaniem certyfikatu, czego wymaga samo Polskie Centrum Akredytacji.

## AKREDYTACJA JAKO PATENT NA NIEOMYLNÓŚĆ

Niestety, tam gdzie zaczyna się agresywny marketing, często kończy się rozsądek. W działaniach marketingowych niektórych podmiotów obserwujemy dwie niepokojące tendencje. Po pierwsze, uzyskaną akredytację traktuje się jako swoisty atrybut nieomylności. Po drugie, takiej osobliwej wykładni towarzyszy nie do końca jasny, nawet dla ekspertów od wielu lat wykonujących badania DNA, zakres akredytacji. Trudno stwierdzić, czy jest on szeroki,

Rodzaj badanego materiału	Przedmiot badań	Procedury badawcze
Próbki krwi, moczu, żółci, płynu z gałki ocznej	Oznaczenie stężenia alkoholu etylowego Zakres: (0,1-5,0) ‰ Metodą chromatografii gazowej z analizą fazy nadpowierzchniowej;	PB-01 wydanie 4 z dnia 29.11.2013 r. „Oznaczenie alkoholu etylowego w ludzkim materiale biologicznym”
Wymazy z jamy ustnej	Ustalenie ojcostwa Analiza DNA z zastosowaniem multipleksowej amplifikacji polimorficznych loci DNA-STR	PB-02 wydanie 2 z dnia 03.09.2013 r. „Ustalenie spornego ojcostwa”
Próbki krwi, wymazy z jamy ustnej	Analiza DNA z zastosowaniem multipleksowej amplifikacji polimorficznych loci DNA-STR	PB-03 wydanie 2 z dnia 06.09.2013 r. „Ustalenie profilu genetycznego materiału porównawczego”
Próbki krwi, nasienia, śliny, włosów oraz innych wydaliny, wydzieliny i tkanek pochodzenia ludzkiego	Identyfikacja śladów biologicznych pochodzenia ludzkiego Analiza DNA z zastosowaniem multipleksowej amplifikacji polimorficznych loci DNA-STR	PB-04 wydanie 2 z dnia 06.09.2013 r. „Ujawnianie śladu biologicznego i ustalenie jego profilu genetycznego”
Próbki krwi, nasienia, śliny, włosów oraz innych wydaliny, wydzieliny i tkanek pochodzenia ludzkiego	Identyfikacja materiału biologicznego oraz ustalenie pochodzenia w linii żeńskiej Analiza sekwencji mitochondrialnego DNA (mtDNA)	PB-06 wydanie 4 z dnia 15.11.2013 r. „Ustalenie profilu mtDNA metodą sekwencjonowania”

czy wąski, bo choć ogólne cele dla których wykonuje się badania są sprecyzowane, to nie towarzyszy im właściwe zróżnicowanie procedur. Mało tego, badania o ewidentnie odmiennej specyfice bywają zamknięte w jednej „metaprocedurze”. Jeśli z interpretacją zakresu badań mają problemy eksperci, trudno przypuszczać, że nie będą ich mieli zleceniodawcy. Będziemy do tego wątku powracać w kolejnych numerach naszego magazynu.

## KTO POSIADA AKREDYTACJĘ? WARTO SPRAWDZIĆ U ŹRÓDŁA

Każdy zainteresowany może samodzielnie sprawdzić, czy i w jakim zakresie dane laboratorium uzyskało akredytację na zgodność z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Informacje te są jawne i można je znaleźć na stronie Polskiego Centrum Akredytacji ([www.pca.gov.pl](http://www.pca.gov.pl)), po wybraniu z menu opcji „akredytowane podmioty” i dalej „laboratoria badawcze”. Jeśli nie wiemy, czy w naszym województwie znajdują się akredytowane laboratoria, należy wybrać województwo, dziedzinę badań („I – badania w dziedzinie nauk sądowych”) oraz obiekt („obiekty i materiały biologiczne przeznaczone do badań”). Warto samodzielnie przekonać się o rzeczywistym stanie rzeczy, bo próba czerpania tej wiedzy z materiałów reklamowych różnych podmiotów może się skończyć uzyskaniem nieprawdziwych informacji.

## WĄSKO CZY SZEROKO?

Czy zatem widząc charakterystyczny niebieski symbol akredytacji na stronach i w dokumentach przesyłanych przez laboratorium możemy zakładać, że całe nasze zlecenie zostanie zrealizowane zgodnie z procedurami akredytowanymi? Odpowiedź na to pytanie zależy od zakresu akredytacji. Aby uzyskać stosowną informację, na wspomnianej stronie internetowej PCA w polu wyszukiwania należy wpisać numer akredytacji interesującego nas laboratorium, który składa się z liter AB i czterech cyfr, a który znajduje się pod symbolem akredytacji.

W wynikach możemy znaleźć datę ważności certyfikatu a także, co najistotniejsze, zakres akredytacji laboratorium z wyszczególnieniem rodzaju materiałów badanych oraz metod badawczych i pomiarowych. Rozpoczynając proces akredytacji laboratoriów Katedry Medycyny Sądowej, kierowaliśmy się zasygnalizowaną powyżej zdroworozsądkową zasadą – chcieliśmy zaoferować naszym zleceniodawcom badania akredytowane w pełnym zakresie świadczonych dotąd usług. Nie pominęliśmy więc żadnych badań wykonywanych rutynowo; wszystkie one znalazły swoje miejsce w odpowiednio zróżnicowanych i nazwanych procedurach (patrz tabela). Poza

identyfikacją śladów biologicznych z zastosowaniem multipleksowej amplifikacji polimorficznych loci DNA-STR (na chromosomach autosomalnych oraz Y – PB-04) i identyfikacją materiału porównawczego (PB-03), jako jedyne laboratorium uzyskaliśmy akredytację także na badania mające na celu ustalenie spornego ojcostwa, co zostało udokumentowane w postaci odrębnej procedury PB-02. Co więcej, jesteśmy aktualnie jedyną placówką w Polsce posiadającą akredytowane badania pochodzenia w linii żeńskiej w oparciu o sekwencjonowanie mitochondrialnego DNA (PB-06). Jako jedyni akredytowaliśmy także badania z zakresu toksykologii sądowej (PB-01), mimo iż badania tego rodzaju nie zostały objęte cytowaną decyzją ramową Rady UE (chodzi o oznaczenie stężenia alkoholu etylowego nie tylko z próbek krwi, ale również moczu, żółci i płynu z gałki ocznej). Wymóg akredytacji jest bez wątpienia istotnym elementem jakościowym. Nie należy jednak ulegać złudzeniom – akredytacja nie zrówna poziomu merytorycznego laboratoriów wykonujących badania DNA. Ten nadal pozostanie zróżnicowany. Jednak dla wszystkich laboratoriów bez wyjątku akredytacja powinna być zachętą do doskonalenia się. Takie są przynajmniej jej założenia, a reszta jest w rękach zainteresowanych...

# LABORATORIUM DOBRZE ZARZĄDZANE

WYWIAD Z DR. TOMASZEM KUPCEM

O AKREDYTACJI I ZARZĄDZANIU LABORATORIAMI GENETYCZNYMI ROZMAWIAMY Z **DR. TOMASZEM KUPCEM**, KIEROWNIKIEM PRACOWNI GENETYKI SĄDOWEJ W INSTYTUCIE EKSPERTYZ SĄDOWYCH IM. PROF. DR. JANA SEHNA W KRAKOWIE I AUDYTOREM POLSKIEGO CENTRUM AKREDYTACJI.

**Jaki jest cel wprowadzania w laboratoriach genetyczno-sądowych i kryminalistycznych w ogóle systemu zarządzania jakością?**

Pomijając tak oczywisty powód jak spełnienie wymagań Decyzji Ramowej Rady (Unii Europejskiej) nr 2009/905/WSiSW z 30 listopada 2009 roku, zdobycie akredytacji wpływa pozytywnie na funkcjonowanie dobrych laboratoriów. Patrząc wstecz na historię i obecną sytuację podmiotów, gdzie miałem przyjemność uczestniczyć w procesie zdobycia akredytacji w charakterze audytora PCA, widzę wyraźnie, jak duży postęp dokonano w tych jednostkach. Ale to można zauważyć i ocenić dopiero z pewnej perspektywy czasowej.

**Wymagania opisane w normie PN-EN ISO/IEC 17025 są bardzo ogólne, w związku z czym wdrożenie części z nich w laboratorium stricte gene-**

**tycznym jest nieco problematyczne. Skąd czerpać inspirację do tworzenia własnego systemu zarządzania jakością spójnego ze wspomnianą normą?**

Otrzymanie akredytacji jest możliwe jedynie po spełnieniu wszystkich wymagań opisanych w normie PN-EN ISO/IEC 17025. W samym dokumencie niektóre

AKREDYTACJA POMAGA DOBRYM LABORATORIOM STAĆ SIĘ JESZCZE LEPSZYMI. TO DOŚĆ SKOMPLIKOWANY ORGANIZM, KTÓREGO SERCE STANOWI PERSONEL – JEGO WIEDZA, DOŚWIADCZENIE, PRZYZWYCZAJENIA, A PRZEDĘ WSZYSTKIM MOTYWACJA DO CIĄGŁEGO DOSKONALENIA SYSTEMU ZARZĄDZANIA.

z punktów normy są przedstawione i omówione dość skromnie, co często budzi pewne obawy związane z ich właściwą interpretacją. Pomocne mogą być tutaj różnego rodzaju opracowania, takie jak ILAC G-19: 2002, dokumenty opublikowane na stronach ENFSI, Interpolu, organizacji EA oraz ILAC czy też sama strona PCA, gdzie możemy odnaleźć dokumenty, których znajomość i stosowanie jest niezbędne w procesie akredytacji. Żywym dowodem na to, że wymagania normy da się spełnić bez dramatycznych rewolucji, jest stale rosnąca liczba laboratoriów, które otrzymały akredytację w ostatnim okresie czasu bez przerw w rutynowej działalności.

**Co, Pańskim zdaniem, jest najważniejszym elementem w pracy nad uzyskaniem akredytacji?**

Według moich obserwacji najważniejszym elementem jest właściwe



zaplanowanie całego procesu, i konsekwentna realizacja punktów z wytyczonej „mapy drogowej”. Nie można się łudzić, że akredytacja to tylko stos papierów, które trzeba wyprodukować. Jak dla mnie to dość skomplikowany organizm, którego serce stanowi personel, ze swoimi przyzwyczajeniami, określoną wiedzą i kompetencjami, których nie da się zmienić z dnia na dzień i szybko „przygotować” na audyt. Stąd jest potrzebne spokojne plano-

**KLUCZOWE DLA SPEŁNIENIA WYMAGAŃ NORMY SĄ WŁAŚCIWE PROCEDURY BADAWCZE, DOKUMENTOWANIE ETAPÓW PRACY ORAZ WSKAZANIE TYCH PARAMETRÓW ANALIZY, KTÓRE ZAPEWNIĄ JĄ JEJ ODTWARZALNOŚĆ. DOBRE LABORATORIUM SĄDOWE POWINNO SPEŁNIAĆ TE WYMAGI NAWET BEZ ODWOŁYWANIA SIĘ DO TREŚCI NORMY.**

wo działanie, które pozwoli też zminimalizować lub rozłożyć w czasie ekonomiczne skutki realizacji tego zadania, wiążące się chociażby z przeglądami i wzorcowaniem sprzętu czy szkoleniami personelu.

#### **Które laboratoryjne procedury z zakresu genetyki sądowej bezwzględnie wymagają akredytacji?**

Patrząc na ekspertyzę z zakresu genetyki sądowej i znając zagrożenia, które mogą negatywnie wpłynąć na jej rzetelność i wnioski, trudno mi znaleźć taki punkt, który mógłby pozostać poza systemem i akredytowanymi procedurami. W pracy genetyka sądowego równie ważny jest etap pobierania do badań śladów biologicznych i następnie poddania ich właściwej procedurze badawczej, jak i interpretacja wyników końcowych. Równie tragiczne skutki w wyniku pomyłki personelu może dać zamiana próbek w czasie przenoszenia do innego naczynia laboratoryjnego przez technika, jak i nie-

rzetelna analiza wyników elektroforezy wykonana przez eksperta. Mając taką świadomość można zadać sobie pytanie, który etap może pozostać nieakredytowany? Niestety, ja nie potrafię wybrać. Istnieje jeszcze druga strona medalu, o której musimy pamiętać – zdobycie akredytacji na określone procedury badawcze nie jest równoznaczne z tym, że system jest ostatecznie doskonały i nigdy nas nie zawiedzie. Często system zarządzania jakością jest przedstawiany w różnorodnych opracowaniach jako gład, który jest wypychany przez personel laboratorium pod górę, która nie ma szczytu. Można to zinterpretować jako ciągłą pracę nad jego doskonaleniem ze świadomością, że nigdy doskonały nie będzie.

#### **Który etap wskazałby Pan jako najtrudniejszy dla laboratorium, wyłączając oczywiście sam audyt?**

Patrząc na swoje własne doświadczenia oraz historię uzyskiwania akredytacji w innych jednostkach, najtrudniejsza dla samego laboratorium jest zmiana mentalności personelu. System zarządzania w laboratorium będzie funkcjonował prawidłowo tylko pod warunkiem, że cały zespół będzie w pełni świadomy i zmotywowany w czasie jego wdrożenia, a w późniejszym etapie do jego właściwego utrzymania. Najważniejsza jest tutaj rola kierownictwa laboratorium, aby we właściwy sposób motywować personel, podnosić jego wiedzę z zakresu systemu zarządzania i wymagań normy oraz zapewnić niezbędne finansowanie konieczne do doskonalenia i utrzymania systemu.

#### **Niektórzy wskazują, że uzyskanie akredytacji znacznie utrudnia i wydłuża pracę. Czy faktycznie tak jest?**

Odpowiednie procedury badawcze i dokumentowanie etapów pracy oraz odnotowanie istotnych parametrów analizy zapewniających jej odtwarzalność są kluczowymi elementami spełnienia wymagań normy. Warto się zastanowić, czy dobre

laboratorium i biegły sądowy nie powinien spełniać tych wymagań bez odwoływania się do tego dokumentu. Oczywiście w sytuacji gdzie tych dobrych praktyk nigdy nie było, wprowadzenie dodatkowych wymagań stawianych przez normę wydłuży czas pracy. Z punktu widzenia zleceniodawcy i odbiorcy naszej opinii chodzenie na skróty jest na pewno gorsze niż rzetelnie udokumentowane badanie, wykonane na sprawnym sprzęcie przez kompetentny personel.

#### **Samo zdobycie certyfikatu jest żmudne, czasochłonne i wymagające znacznych nakładów finansowych. Nasuwa się zatem pytanie, czy taka inwestycja się zwraca? Jak ma się posiadanie akredytacji do merytorycznego poziomu pracy laboratorium?**

Trudno jest mi się odnieść do wpływu akredytacji na finansowy wynik pracy laboratorium. Wszyscy dobrze wiemy, że uzyskanie akredytacji na konkretne procedury badawcze wymaga sporego zaangażowania finansowego, i myślę że nie od razu może się to przełożyć na wynik ekonomiczny. Patrząc jednak pod kątem konkurencyjności danej placówki, fakt posiadania akredytowanych metod badawczych może stanowić istotną przewagę w rozmowach z potencjalnym klientem. Pod względem merytorycznym laboratoria reprezentują różny poziom, choć zawsze w procesie akredytacji musi nastąpić potwierdzenie kompetencji laboratorium do wykonywania określonej aktywności.

Musimy pamiętać, że akredytuje się określoną metodę badawczą a nie całość aktywności laboratorium, a zakres ten określa samo laboratorium. Może być on bardzo wąski, obejmujący tylko pojedynczą procedurę badawczą i jeden rodzaj obiektów, może być też bardzo szeroki i zawierać wiele metod badawczych i całą gamę obiektów do badań.

ROZMAWIAŁA: **URSZULA ROGALLA**

# 11 GODZIN

## WYŚCIG Z CZASEM

ZBRODNIA BEZ WIDOCZNEGO MOTYWU, OFIARA, KTÓRA NIE MIAŁA WROGÓW I WYŚCIG Z CZASEM, ŻEBY UDOWODNIĆ PODEJRZANEMU WINĘ. TO KOLEJNY CIEKAWY PRZYPADK, W KTÓRYM BRALIŚMY UDZIAŁ.

AUTOR: **MARCIN WOŹNIAK**



### **DR TOMASZ KUPIEC**

Od 1999 roku kierownik Pracowni Genetyki Sądowej w Instytucie Ekspertyz Sądowych im. prof. dr. Jana Sehna w Krakowie. Biegły sądowy z zakresu badań genetycznych. Jego zainteresowania zawodowe koncentrują się wokół metod identyfikacji szczątków ludzkich, procedur DVI oraz zastosowania nowoczesnych rozwiązań technicznych w laboratoriach genetyki sądowej. Auditor techniczny Polskiego Centrum Akredytacji.

Zwłoki kobiety odkryte pewnego letniego dnia w jej mieszkaniu przy głównej ulicy małego miasteczka stanowiły dla śledczych nie lada zagadkę. Do większości zabójstw dochodzi w określonym środowisku, zabójcy wywodzą się najczęściej z kręgu znajomych i często wskazywani są przez świadków. Ta sprawa była inna. Zamordowana kobieta była zwykłą gospodynią domową, od kilku lat na emeryturze. Lekarz badający zwłoki orzekł, że kobieta zginęła od ciosów zadanych nożem.

W momencie znalezienia ciała ofiara nie żyła od kilkunastu godzin, zatem do zabójstwa musiało dojść poprzedniego dnia wieczorem. Nie posiadała znacznego majątku a najbliższa rodzina stwierdziła, że z mieszkania nie zniknęło nic cennego. Motyw rabunkowy zabójstwa można więc było wykluczyć. Problem polegał na tym, że nie było żadnego innego motywu. Kobieta praktycznie nie spotykała się z nieznanymi osobami i obracała się wyłącznie w towarzystwie innych kobiet.

**ARESztOWANIE**

Pewną wskazówką co do okoliczności zabójstwa były ślady walki w mieszkaniu, przy jednoczesnym braku śladów włamania. Sugerowało to, że kobieta mogła wpuścić zabójcę sama, zatem mógł być to ktoś znajomy. Działania operacyjne doprowadziły ostatecznie do aresztowania jednego z sąsiadów zamordowanej kobiety. Był to mężczyzna mający przeszłość kryminalną, skazywany za rozboje i drobne kradzieże. W chwili zatrzymania był pod wpływem alkoholu i nie potrafił opisać, co robił w ciągu ostatniej doby. Podejrzany został aresztowany na 48 godzin i tyle czasu miała prokuratura na zebranie dowodów jego udziału w zabójstwie.

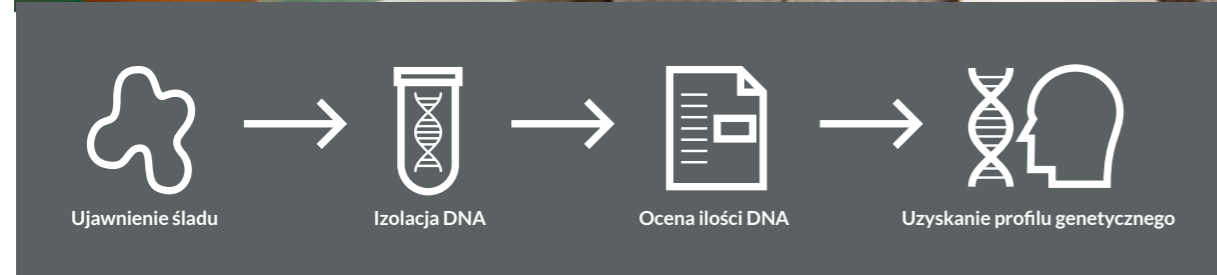
**ZABEZPIECZENIE**

Technicy policyjni pracowali intensywnie zarówno w mieszkaniu ofiary jak i podejrzanego, aby zabezpieczyć wszystkie potencjalne ślady kontaktu między tymi osobami. W mieszkaniu zamordowanej

kobiety ujawniono wiele śladów krwi, które natychmiast przekazano do badań genetycznych, do Zakładu Genetyki Molekularnej i Sądowej CM UMK. W tej sprawie kluczowym czynnikiem był czas. Natychmiast po otrzymaniu dowodów rzeczowych przystąpiliśmy więc do badań.

**BADANIE**

Procedura badań śladów biologicznych składa się z kilku etapów, z których pierwszym jest zabezpieczenie śladów znajdujących się na dowodach rzeczowych. Etap ten jest wbrew pozorom jednym z najtrudniejszych elementów całej procedury, ze względu na konieczność znalezienia nawet najmniejszych plam krwi, nasienia czy śliny, często ledwie widocznych gołym okiem. Osoby poszukujące śladów biologicznych na dowodach rzeczowych wspomagają się różnego rodzaju urządzeniami i technikami zwiększającymi szansę ujawnienia śladów, jednak kluczową rolę w tej procedurze odgrywa białe oko



i doświadczenie badacza. Paradoksalnie, trudność ujawnienia i doboru śladów do analizy wzrasta szczególnie wtedy, gdy śladów jest dużo. Ze względów ekonomicznych i czasowych konieczne jest bowiem dokonanie selekcji i poddanie analizie w pierwszej kolejności tych śladów, które dają najwyższą szansę uzyskania przydatnej dla śledztwa informacji. W przypadkach takich jak opisywany tutaj, zdecydowana większość śladów zabezpieczonych na miejscu zdarzenia to krew ofiary, co nie wnosi szczególnie wiele nowych informacji do śledztwa. Konieczna jest zatem szczegółowa analiza każdej plamki w celu wytypowania ewentualnych śladów pochodzących od innych niż ofiara osób, np. od napastnika. Zabezpieczone z dowodów rzeczowych ślady biologiczne poddawane są następnie serii reakcji biochemicznych, których celem jest uwolnienie DNA z komórek i oczyszczenie go. Procedura taka może trwać nawet kilkanaście godzin, jednak w przypadku większości śladów można uzyskać czysty preparat DNA w ok. 2 godziny. Uzyskany materiał jest następnie poddawany analizie mającej na celu ocenę ilości uzyskanego materiału i jego czystości. Etap ten trwa ok. 4 godzin. Po ustaleniu ilości DNA możliwe jest przeprowadzenie dwuetapowej procedury uzyskania profilu genetycznego, która trwa w sumie ok. 5 godzin. Jak zatem widać, kompletny cykl analizy śladu biologicznego trwa ok. 11 godzin, nie licząc (kluczowego!) etapu ujawniania i zabezpieczania śladów.

**WERYFIKACJA TOŻSAMOŚCI SPRAWCY**

Dowody rzeczowe, które trafiły do naszego Zakładu z mieszkania ofiary zostały poddane wstępnej selekcji przez śledczych. Wskazano te, z którymi wiązano największe nadzieje na posunięcie sprawy do przodu. Szczególne zainteresowanie wzbudzała niewielka plama krwi ujawniona na ścianie w pobliżu drzwi. Została ona poddana analizie w pierwszej kolejności i decyzja ta okazała się przystawowym strzałem w „dziesiątkę”. Badana plama zawierała DNA mężczyzny, którego profil był zgodny z profilem DNA podejrzanego! Informacja została przekazana do prokuratury w tym samym dniu, w którym ślady trafiły do badań i wykorzystana jako argument na rzecz przedłużenia aresztu. Dowód ten jednak został podważony przez podejrzanego, który twierdził, że swego czasu pomagał ofierze w drobnych pracach domowych i mógł wtedy



pozostawić niewielki ślad krwi na ścianie. Ponieważ nie było możliwe zweryfikowanie tej wersji, dowód łączący podejrzanego z zabójstwem nie był zbyt mocny.

**WYŚCIG Z CZASEM**

Przełomowa okazała się analiza śladów zabezpieczonych w mieszkaniu podejrzanego. Staranna praca techników kryminalistyki przyniosła rezultat w postaci drobnego śladu krwi na podłodze w łazience podejrzanego. Ślad ten nadesłano do badań ok. 12 godzin przed upływem terminu aresztowania, zatem możliwe szybkie uzyskanie wyniku było kluczowe dla zwiększenia szansy na przedłużenie aresztu. Aby przyspieszyć całą procedurę podjęto niestandardową decyzję: odstąpiono od przeprowadzania analizy ilości DNA. Takie postępowanie jest dopuszczalne w ramach procedur

**ANALIZA ŚLADÓW BIOLOGICZNYCH TO PROCES, KTÓRY MOŻE TRWAĆ WIELE TYGODNI, ZWŁASZCZA JEŚLI ŚLADÓW JEST DUŻO I SĄ ONE TRUDNE DO WYKRYCIA BĄDŹ ZNISZCZONE. WARTO JEDNAK PAMIĘTAĆ, ŻE PRZEMYŚLANA SELEKCJA ŚLADÓW I WYTYPOWANIE DO BADAŃ TYCH, DAJĄCYCH NAJWYŻSZĄ SZANSĘ NA UZYSKANIE CENNYCH INFORMACJI, MOŻE POZWOLIĆ NA ZNACZĄCE SKRÓCENIE CZASU OCZEKIWANIA NA WYNIKI I OBNIŻENIE CAŁOŚCIOWYCH KOSZTÓW PROWADZONYCH ANALIZ.**

akredytowanych wg normy ISO17025, według których działa nasze laboratorium, wymaga jednak każdorazowego uzgodnienia ze zlecającym badanie. Zaoszczędzono w ten sposób ok. 4 godzin, co umożliwiło uzyskanie profilu genetycznego śladu w czasie dającym szansę na dostarczenie informacji do sędziego decydującego o przedłużeniu aresztu. Co najważniejsze: niewielka plamka krwi z mieszkania podejrzanego pochodziła od ofiary! Podejrzany zaprzeczał bowiem wcześniej, aby ofiara kiedykolwiek go odwiedzała w jego domu. Ostatecznie sędzia wyraził zgodę na aresztowanie podejrzanego na 3 miesiące. W tym czasie nasz Zakład wykonał analizę pozostałych śladów zabezpieczonych w mieszkaniu ofiary i podejrzanego, znajdując jeszcze kilka plam wiążących podejrzanego z ofiarą. Akt oskarżenia w tej sprawie trafił już do sądu.

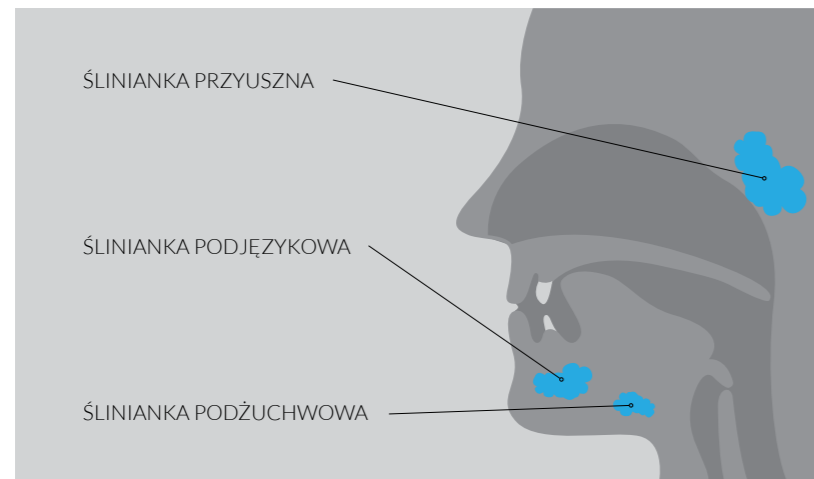
Analiza śladów biologicznych to proces, który może trwać wiele tygodni, zwłaszcza jeśli śladów jest dużo i są one trudne do wykrycia bądź zniszczone. Warto jednak pamiętać, że przemyślana selekcja śladów i wytypowanie do badań tych, dających najwyższą szansę na uzyskanie cennych informacji, może pozwolić na znaczące skrócenie czasu oczekiwania na wyniki i obniżenie całkowitych kosztów prowadzonych analiz. Warto również pamiętać, że procedury laboratoryjne można do pewnego stopnia modyfikować, w oparciu o doświadczenie personelu wykonującego badania i odpowiednie zapisy w samych procedurach, co pozwala na elastyczne reagowanie na potrzeby śledczych.



# ALTERNATYWNY MATERIAŁ W BADANIU TOKSYKOLOGICZNYM – ŚLINA

ŚLINA STANOWI ŁATWO DOSTĘPNY, ALTERNATYWNY W STOSUNKU DO SUROWICY, KRWI PEŁNEJ CZY MOCZU MATERIAŁ DO BADAŃ KLINICZNYCH, JAK RÓWNIEŻ TOKSYKOLOGICZNYCH. W LITERATURZE NAUKOWEJ ZNAJDZIEMY WIELE DONIESIEŃ NA TEMAT OZNACZANIA STĘŻENIA KSENOBIOTYKÓW W ŚLINIE. W ZWIĄZKU Z TYM, ŻE STĘŻENIA WIELU ZWIĄZKÓW W ŚLINIE SĄ PROPORCJONALNE DO ICH STĘŻENIA WE KRWI, WYNIKI ANALIZY ŚLINY MOGĄ BYĆ PRZYDATNE W OCENIE STOPNIA NARAŻENIA ZAWODOWEGO NA SUBSTANCJE SZKODLIWE, W PRZYPADKU OCENY ZATRUĆ, MONITOROWANIA STĘŻENIA TERAPEUTYCZNEGO LEKÓW CZY ICH PRZEDAWKOWANIA, JAK RÓWNIEŻ DO POTWIERDZANIA LUB WYKLUCZANIA OBECNOŚCI SUBSTANCJI PSYCHOAKTYWNYCH W ORGANIZMIE.

AUTOR: **MARZENA SYKUTERA**



### CO WPŁYWA NA STĘŻENIE SUBSTANCJI

Transport substancji między krwią a śliną może zachodzić drogą wewnątrz- lub zewnątrzkomórkową. Droga wewnątrzkomórkowa obejmuje transport bierny (dyfuzja lub filtracja) lub tak zwany transport swoisty. Droga zewnątrzkomórkowa transportu składników osocza do śliny może zachodzić poprzez ultrafiltrację bądź też przez uszkodzone błony. Do związków przenikających do śliny tylko przez pęknięcia naturalnych przegród z krwią należą tyroksyna i trójiodotyronina i są one przykładem związków, których stężenie w ślinie nie odzwierciedla ich ilości w organizmie. Związki, które możemy oznaczać w ślinie zamiast w surowicy przechodzą do śliny w wyniku biernej dyfuzji, a czynnikami, które decydują o ich obecności w ślinie są: ciężar cząsteczkowy (mniejsze cząsteczki łatwiej dyfundują niż większe); rozpuszczalność związku w wodzie i/lub w lipidach (lipofilowe substancje łatwiej dyfundują niż molekuly lipofobowe); stopień jonizacji związku (tylko niejonizowana frakcja może przejść przez lipidową barierę między trzema przedziałami: osocze, przestrzeń wewnątrzkomórkowa i ślina).

Ponieważ wartości pH różnią się w przestrzeniach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, całkowite stężenie jako suma zjonizowanej i niejonizowanej frakcji jest inne po obu stronach tej bariery. Leki o pH

Analiza leków i substancji psychoaktywnych w ślinie posiada wiele zalet w porównaniu z oznaczaniem ich w konwencjonalnym materiale biologicznym, takim jak krew, surowica czy mocz. Próbkę śliny można pobrać w potrzebnej ilości, wielokrotnie w ciągu dnia. Samo pobranie próbki jest przy tym nieinwazyjne i zupełnie bezbolesne. Nie wymaga stosowania aseptyki, sterylnych strzykawek, udziału fachowego personelu. W porównaniu z pobieraniem próby moczu, pobieranie śliny nie jest związane z „pogwałceniem prywatności” oraz nie zachodzi obawa zafałszowania próbki.

### ŚLINA TO PŁYNNNE ŚRODOWISKO EKOSYSTEMU JAMY USTNEJ

Jest mieszaniną wydzielin trzech par gruczołów ślinowych: ślinianek przyszynych, podżuchwowych i podjęzykowych oraz licznych drobnych gruczołów błony śluzowej jamy ustnej. Wydzielanie śliny jest odruchowe, kontrolowane przez autonomiczny układ nerwowy i następuje po zadziaaniu bodźców. Dobowa ilość wydzielanej śliny u dorosłego człowieka wynosi około 0,5-1,5 litra, z czego około 80% wydzielania stymulowane jest przyjmowaniem pokarmu. PH śliny waha się od 5 do 8. Skład śliny różni się w zależności od rodzaju gruczołu, pory dnia, diety, wieku, płci i ewentualnie intensywności i czasu trwania stymulacji wydzielania śliny oraz stanu chorobowego.

### Z CZEGO SKŁADA SIĘ ŚLINA?

Składniki śliny to w około 99,5% woda, 0,2% to związki nieorganiczne występujące w postaci jonowej (kationy: Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> oraz K<sup>+</sup>, aniony: fosforanowe, węglanowe, chlorkowe, fluorkowe, cytrynianowe, rodankowe), 0,3% to związki organiczne (białka, niebiałkowe substancje azotowe, lipidy, hormony).

Związki występujące w ślinie podzielić można na dwie grupy. Podstawowym kryterium podziału jest miejsce jego wytwarzania: część związków produkowana jest wewnątrz gruczołów ślinowych, a część poza nimi. Zaliczane do pierwszej grupy związki syntetyzowane w gruczołach ślinowych odgrywają tylko drugorzędną rolę w wykorzystaniu śliny jako materiału badawczego. Zewnątrzgruczołowe związki, jako wytwarzane poza gruczołem ślinowym, są transportowane z osocza do śliny. Przez ślinianki przepływa znaczna ilość krwi, dlatego też w ślinie, która jest częściowo przesączem osocza, znajdują się substancje przenoszone przez krew, w tym między innymi leki, substancje psychoaktywne (w celu wydalenia ich z ustroju), hormony i inne.

### STOSUNEK STĘŻENIA WYBRANYCH ZWIĄZKÓW W ŚLINIE DO STĘŻENIA W OSOCZU (S/O) (DANE LITERATUROWE)

Nazwa związku	Współczynnik s/o
morfina	0,8
kodeina	4,0
Δ9-THC	1,2
MDMA	7,0
kokaina	3,0
diazepam	0,01-0,02
metadon	1,6
alkohol etylowy	1,07
metamfetamina	2

### LIMITY DETEKCJI DLA WIĘKSZOŚCI TESTÓW IMMUNOLOGICZNYCH I CZAS WYKRYWANIA NARKOTYKÓW W ŚLINIE.

Test	Substancja aktywna	Wartość progowa (ng/ml)	Czas detekcji
Amfetamina (AMP)	D-amfetamina	50	10 minut – 72 godziny
Kokaina (COC)	Benzoilokgonina	20	10 minut – 24 godziny
Metamfetamina (MET)	D-metamfetamina	50	10 minut – 72 godziny
Opiaty (OPI)	Morfina	40	10 minut – 72 godziny
Fencyklidyna (PCP)	Fencyklidyna	10	10 minut – 72 godziny
Marhuana	Δ9-THC	10	do 6 h po paleniu
	11-nor-Δ9-THC-9 COOH	12	10 minut – 72 godziny

kwaśnym występują w niższym stężeniu, a leki o pH zasadowym w wyższym stężeniu w komórkach i w ślinie w porównaniu do przestrzeni wewnątrzylnej. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia, jeśli pH śliny jest wyższe niż pH krwi. Stosunek stężenia danego związku w ślinie do stężenia w osoczu (s/o) można wyliczyć z równania Hendersona-Hasselbalcha, znając wartości pKa związku oraz wartość pH krwi i śliny. Niestety, nie wszystkie ksenobiotyki charakteryzują się niezmienną wartością stałej podziału pomiędzy śliną a surowicę. Dodatkowym czynnikiem determinującym stosunek stężeń ślina/osocze jest wiązanie leków przez białka. Frakcja leków (i hormonów) związana z białkiem nie może przejść przez błonę komórkową, toteż stężenie tych związków w ślinie odzwierciedla ich wolną frakcję w osoczu.

### BADANIE A PRAWO

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie badanie śliny polega na pobraniu, bez dodawania jakichkolwiek substancji, próbek śliny i ich umieszczeniu w urządzeniu do oznaczania metodą immunologiczną środków działających podobnie do alkoholu, zgodnie z instrukcją obsługi tego urządzenia. W tym celu stosowane są szybkie testy immunologiczne do symultanicznego, jakościowego badania śliny na obecność narkotyków. Zaletami tej metody jest wysoka czułość, możliwość oznaczania substancji psychoaktywnych bezpośrednio w materiale biologicznym (tj. bez etapu izolacji) oraz

stosunkowo krótki czas potrzebny do wykonania oznaczenia. Użycie testów immunologicznych pozwala przeprowadzać badania skriningowe (przesiewowe) dużej liczby próbek w krótkim czasie, bez użycia specjalistycznej aparatury. Poza wykryciem obecności narkotyku metoda pozwala ocenić jego przybliżone stężenie w badanym materiale biologicznym. Jednakże jej specyficzność nie jest wysoka, tzn. stosowane w niej odczynniki nie są swoiste dla jednej substancji, lecz mogą reagować z mniejszą lub większą wydajnością z całą grupą substancji o zbliżonej strukturze. Ta niska specyficzność metody może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich tj. wskazujących na obecność narkotyku u osób, które go nie przyjmowały. Aby zmniejszyć liczbę takich wyników wprowadzono pojęcie „prugu czułości” (ang. cutoff level), to jest minimalnego stężenia narkotyku w ślinie, które musi być przekroczone, aby można było uznać wynik za dodatni.

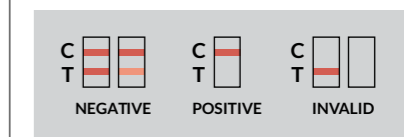
### ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Substancje narkotyczne występujące w próbce śliny konkurują o specyficzne przeciwciała z koniugatem narkotyku, znajdującym się na teście. Podczas badania próbka dzięki siłom kapilarnym



Testy immunologiczne do badania śliny na obecność narkotyków.

migruje wzwyż testu. Jeżeli stężenie narkotyku w próbce śliny jest poniżej czułości progowej testu, to nie nasyci wiążących części przeciwciał. W tym wypadku przeciwciała reagują z proteinowym koniugatem narkotyku i w miejscu testowym (T) urządzenia testowego pojawia się prążek, dając wynik negatywny. Występowanie narkotyku w próbce o stężeniu powyżej czułości progowej testu spowoduje nasycenie wiążących części przeciwciał, w rezultacie w miejscu testującym (T) nie pojawi się prążek, wówczas wynik testu odczytujemy jako pozytywny. W celu kontroli procedury w miejscu kontrolnym (C) pojawia się prążek wskazujący, że odpowiednia ilość próbki została użyta w badaniu. Brak prążka w pozycji (C) świadczy o nieprawidłowym przeprowadzeniu testu.



Dodatni wynik badania skriningowego oznacza jedynie obecność w nim związków z danej grupy narkotyków, nie wskazuje natomiast, jakie to są związki. Ich identyfikacja wymaga zastosowania jednej z metod chromatograficznych: chromatografii gazowej czy chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią masową.

Ślina nie jest uniwersalnym materiałem do pomiaru stężenia ksenobiotyków, ale w wielu przypadkach może być obok moczu dobrą alternatywą lub uzupełnieniem dla oznaczeń w osoczu, surowicy czy krwi pełnej.

## KONTAKT:

**PROF. DR HAB. TOMASZ GRZYBOWSKI**

KIEROWNIK KATEDRY MEDYCyny SĄDOWEJ  
ORAZ ZAKŁADU GENETYKI MOLEKULARNEJ I SĄDOWEJ  
GENETYCZNE BADANIA OJCOSTWA I INNE BADANIA  
POKREWIEŃSTWA, IDENTYFIKACJA SZCZĄTKÓW LUDZKICH,  
BADANIA POKREWIEŃSTWA W LINII ŻEŃSKIEJ (MTDNA),  
BADANIA POCHODZENIA EWOLUCYJNEGO LINII ŻEŃSKIEJ  
[TGRZYB@CM.UMK.PL](mailto:TGRZYB@CM.UMK.PL)

**DR N. MED. ELŻBIETA BLOCH-BOGUSŁAWSKA**

P.O. KIEROWNIKA ZAKŁADU MEDYCyny SĄDOWEJ  
TANATOLOGIA, ORZECZNICTWO, REKONSTRUKCJA  
WYPADKÓW KOMUNIKACYJNYCH  
[KIZMEDSAD@CM.UMK.PL](mailto:KIZMEDSAD@CM.UMK.PL)

**PROF. DR HAB. KAROL ŚLIWKA**

TANATOLOGIA, ORZECZNICTWO,  
REKONSTRUKCJA WYPADKÓW KOMUNIKACYJNYCH

**DR N. MED. PRZEMYSŁAW PIOTROWSKI**

TOKSYKOLOGIA SĄDOWA  
[PIOTROWSKI@CM.UMK.PL](mailto:PIOTROWSKI@CM.UMK.PL)

**DR HAB. MARCIN WOŹNIAK**

GENETYCZNA IDENTYFIKACJA ŚLADÓW BIOLOGICZNYCH,  
BADANIA POKREWIEŃSTWA W LINII MĘSKIEJ (CHROMOSOM Y),  
BADANIA POCHODZENIA EWOLUCYJNEGO LINII MĘSKIEJ  
[MARCINW@CM.UMK.PL](mailto:MARCINW@CM.UMK.PL)

**DR JAROSŁAW BEDNAREK**

BADANIA MORFOLOGICZNO-PORÓWNAWCZE  
WŁOSÓW, ANTROPOLOGIA SĄDOWA  
[BEDNAREK@CM.UMK.PL](mailto:BEDNAREK@CM.UMK.PL)

## KATEDRA MEDYCyny SĄDOWEJ COLLEGIUM MEDICUM UMK

ZAKŁAD GENETYKI MOLEKULARNEJ I SĄDOWEJ  
UL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 9,  
85-094 BYDGOSZCZ  
**T:** 52 585 35 52  
**F:** 52 585 35 53  
**M:** [KIZMEDSAD@CM.UMK.PL](mailto:KIZMEDSAD@CM.UMK.PL)