

**Ryszard Pawłowski' *, Anita Dettlaff-Kąkof, Regina Paszkowska*,
Zbigniew Jankowski**

Błąd przedlaboratoryjny w genetyce sądowej. Kontaminacja materiału biologicznego na sali sekcyjnej

Prelaboratory error in forensic genetics. DNA contamination in mortuaries

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku

_ Kierownik:, dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM

Z Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie

Dyrektor: Aleksander Głazek

Celem pracy było przedstawienie kilku przypadków kontaminacji DNA powstałej w efekcie niewłaściwego postępowania z materiałem biologicznym na sali sekcyjnej oraz podstawowych zasad prawidłowego postępowania w celu uniknięcia zanieczyszczenia obcym DNA.

The main aim of our work was to present sources of DNA contamination on the basis of few cases when DNA contamination had its source in mortuaries. Some remarks regarding proper care of biological samples in autopsy halls are presented.

Słowa kluczowe: PCR, kontaminacja DNA, sala sekcyjna

Key words: PCR, DNA contamination, mortuary

WSTĘP

Technika PCR jest techniką z wyboru powszechnie stosowaną do identyfikacji śladów biologicznych w genetyce sądowej. Jej największa zaleta to ogromna czułość wynikająca z cyklicznego powielania określonego fragmentu kwasu nukleinowego. Jednakże paradoksalnie największa zaleta PCR również jest jej największą wadą. PCR jest bezwzględnie wiarygodną techniką wtedy, gdy przestrzegane są wszystkie te zasady, które chronią badaną próbkę przed kontaminacją obcym DNA. Wymaga to nie tylko ogromnego reżimu laboratoryj-

nego, ale również ogromnej ostrożności wtedy, gdy ślad jest zabezpieczany do analizy (2, 3). Uniknięcie kontaminacji badanej próbki w laboratorium wymaga nie tylko fizycznego oddzielenia poszczególnych etapów procesu badania (izolacji i powielania DNA oraz detekcji produktów PCR), ale również ciągłego, fizycznego i chemicznego dekontaminowania powierzchni laboratoryjnych oraz używania wszędzie, gdzie to tylko możliwe, jednorazowego drobnego sprzętu laboratoryjnego (4). Zazwyczaj poza kontrolą laboratorium pozostają etapy procesu ujawniania i zabezpieczania śladów do identyfikacji genetycznej. To od właściwego działania policjantów (głównie techników kryminalistyki) i obducentów oraz laborantów z prosektorium zależy czy dostępny do badania materiał będzie wolny od obcego DNA, a tym samym wynik badania metodą PCR będzie wiarygodny, czy też zostanie zniekształcony w wyniku błędów przedlaboratoryjnych. Wiedza na ten temat, niestety, w wielu jeszcze przypadkach jest uboga i daleka od doskonałości.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie kilku przypadków kontaminacji, które w sposób ewidentny zaistniały w wyniku niewłaściwego działania przedlaboratoryjnego.

MATERIAŁ I METODY

Izolacja i oznaczanie stężenia DNA

DNA z materiału porównawczego (krew, wymazy z jamy ustnej) izolowano stosując klasyczną metodę fenol-chloroform. DNA z kości oraz tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w blokach parafinowych izolowano odpowiednio: metodą z CTAB (1) oraz metodą wg Rogersa (6).

Stężenie całkowitego DNA oraz stężenie DNA człowieka oznaczono metodą fluorometryczną z Hoechst 33258 oraz przy użyciu zestawu OQUANTIBLOT (Applera) z detekcją, chemiluminescencyjną (ECL Amersham Pharmacia Biotech).

Amplifikacja DNA

Wyizolowany DNA poddano amplifikacji z zastosowaniem zestawu Profiler-Plus firmy Perkin Elmer w warunkach jak opisano uprzednio (5) oraz zestawem PowerPlex 16 (Promega) wg warunków zalecanych przez producenta zestawu. Produkty PCR wykrywano metodą elektroforezy kapilarnej na automatycznym sekwenatorze DNA ABI 310 (5). Do reakcji PCR używano termocyklerów 2400 lub 877 firmy Perkin Elmer lub Trio-thermoblok i TPersonal firmy Biometra.

Podstawowe warunki czystości pracy metodą PCR.

Do wszystkich roztworów używanych do PCR oraz izolacji DNA używano jałowej i ultrafiltrowanej (0,22 mikrometra) wody. Stosowano odczynniki o możliwie najwyższym stopniu czystości, a tam gdzie było to możliwe również takich, które specjalnie oczyszczono dla celów biologii molekularnej. Używano

firmowo jałowionego drobnego sprzętu laboratoryjnego (probówki, pipety) lub poddawano go jałowieniu i działaniu światła UV (GS GENE LINKER firmy BioRAD). Wszystkie operacje związane z przygotowaniem próbek DNA oraz reakcja PCR prowadzono w komorach laminarnych firmy POLON (ochrona próbki). Miejsca pracy dekontaminowano fizycznie światłem UV oraz chemicznie 10% podchlorynem sodu. Do wszystkich czynności używano jednorazowych rękawic i fartuchów ochronnych. Do każdej analizy stosowano także kontrole ujemne i dodatnie ekstrakcji DNA oraz dodatnią i negatywną kontrolę reakcji PCR.

WYNIKI I DYSKUSJA

Niewłaściwa maceracja kości

Przypadek pierwszy

Badaniom poddano czaszkę dostarczoną z jednego z krajów zza wschodniej granicy. Badania identyfikacyjne czaszki przeprowadzono w dwóch różnych zakładach medycyny sądowej tego kraju, uzyskując rozbieżne wyniki. Rozbieżności dotyczyły podstawowej kwestii, a mianowicie jaka jest płeć osobnika od którego pochodzi czaszka. Spór między laboratoriami oparł się o Prokuraturę Generalną tego kraju, która postanowiła wykonać badanie poza granicami w celu jednoznacznego rozstrzygnięcia sporu.

W czerwcu 2000 r. tutejszy Zakład otrzymał postanowienie z Prokuratury Okręgowej w Gdańsku pośredniczącej w wymianie międzynarodowej zlecające określenie płci osobnika, na podstawie badania dowodowej czaszki. Czaszkę dostarczono do badania w stanie wskazującym na uprzednią macerację, co potwierdzone zostało przez osoby z Prokuratury Generalnej, które dostarczyły w/w dowód. Badaniom w naszym laboratorium poddano 3 rodzaje materiału: fragment kości czaszki w stanie natywnym bez oczyszczenia powierzchni kości, fragment po mechanicznym oczyszczeniu powierzchni z uprzednim przemyciem jałową wodą oraz zęb. Z dostępnych zębów czaszki wyekstrahowano zdrowy zęb, nienoszący śladów próchnicy. W wyniku badania w/w materiału uzyskano 3 różne obrazy amplifikacji *locus amelogeniny*. Zupełny brak fragmentu *amelogeniny* z chromosomu Y zaobserwowano dla DNA wyizolowanego z miazgi zęba. Podobny obraz uzyskano dla DNA wyizolowanego z kości czaszki poddanemu procesowi wstępnego mechanicznego oczyszczenia, choć zaobserwowany stosunek allelu X do Y wynosił około 10:1. Zdecydowanie największy udział fragmentu Y *amelogeniny* obserwowano w DNA uzyskanym z kości czaszki, niepoddanej procesowi wstępnego oczyszczenia.

Przypadek drugi

Przypadek ten dotyczył zabójstwa kobiety z terenu południowej Polski. Zlecono badanie szeregu śladów biologicznych, gdzie materiałem porównawczym miał być fragment kości długiej (o znacznym stopniu przemian gnilnych) poddanej uprzednio procesowi maceracji. Wyizolowany DNA zarówno z kości zbitej mimo prób mechanicznego oczyszczania jej powierzchni, jak i z jamy szpikowej wykazywał mieszany profil genetyczny kobiety i mężczyzny. Mieszaninę obserwowano zarówno w *locus amelogeniny* jak i loci autosomalnych. Ostatecznie jako materiał porównawczy posłużył fragment tkanki miękkiej utrwalonej w formalinie, który mimo daleko posuniętego procesu gnilnego pozwolił na uzyskanie profilu DNA w 7 na 10 badanych loci.

Oba przytoczone przypadki wskazują na potencjalne źródło zanieczyszczeń w trakcie procesu maceracji kości. Nie można wykluczyć, iż podczas ich gotowania w perhydrolu dochodzi do przeniesienia obcego DNA obecnego na ścianach naczyń, zazwyczaj wielokrotnie używanego do maceracji, na oczyszczaną kość. Najlepszą ilustracją wydaje się być pierwszy opisany przypadek czaszki, gdzie obserwowano różne ilości domieszki DNA mężczyzny (mężczyzn).

Brak takiej domieszki obserwowano w przypadku miazgi zęba, gdzie penetracja obcego DNA ze względu na nienaruszone szkliwo zdrowego zęba oraz jego głębokie osadzenie w zębodole dawało najmniejszą szansę na jego kontaminację obcym DNA. Pośrednio świadczy o tym również znacznie mniejsza ilość fragmentu *Y amelogeniny* w tym fragmencie czaszki, który poddano procesowi wstępnego oczyszczania. Choć w tym przypadku nie można również wykluczyć naniesienia obcego materiału poprzez bezpośrednie dotknięcie powierzchni czaszki ręką nieoddzianą w jednorazowe rękawice. Bądź w tych samych rękawicach używanych w czasie pracy przy wielu zwłokach.

Mając powyższe na uwadze bezwzględnie konieczne wydaje się każdorazowe dokładne umycie naczyń do maceracji kości a następnie potraktowanie go 10-13% podchlorynem sodu w celu pełnej degradacji zawartego w nim DNA. Po takim działaniu (15-30 minut) naczynie winno być poddane wielokrotnemu wypłukaniu bieżącą wodą oraz kilkakrotnemu zagotowaniu w nim wody w celu usunięcia resztek podchlorynu sodu przed następnym procesem maceracji.

Zanieczyszczone narzędzia sekcyjne i histopatologiczne

Przypadek trzeci

Przypadek ten dotyczy ekshumowanych kości o znacznym stopniu degradacji pośmiertnej. Do identyfikacji dostarczony fragment kości udowej NN osoby. Analiza genetyczna wykazała mieszany profil DNA jedynie w zakresie loci autosomalnych. Otrzymany profil wykazywał silną dominację pewnych alleli w zakresie wszystkich 10 badanych loci. Ponieważ kości nie były poddane maceracji, a jej powierzchnia została mechanicznie oczyszczona, powstało podejrzenie, iż do kontaminacji doszło na sali sekcyjnej podczas odpiłowywania

fragmentu kości piłą mechaniczną używaną w czasie licznych sekcji i nie do końca oczyszczoną. Nieoczyszczona tarcza piły stosowana do odpiłowywania sklepienia czaszki zwłok nieprzeobrażonych gnilnie, gdzie ilość dobrego jakościowo DNA jest ogromna w porównaniu do materiału zdegradowanego może stać się bardzo poważnym źródłem kontaminacji. Podobne problemy może spowodować nieoczyszczony nóż sekcyjny czy peseta używana do wypreparowania fragmentu tkanki miękkiej w przypadku ich użycia uprzednio przy sekcji innego osobnika. W opisywanym przypadku poproszono ponownie obducenta o dostarczenie innego materiału w postaci fragmentu kości, jednakże po uprzednim oczyszczeniu wszystkich narzędzi używanych w procesie pobierania materiału porównawczego. Nowo dostarczony materiał nie wykazał śladów kontaminacji.

Przypadek czwarty

Następny przypadek dotyczy potencjalnych błędów mogących pojawić się podczas badania metodą PCR skrawków mikrotomowych. Do izolacji DNA dostarczono skrawki o grubości 10 mikrometrów tkanki utrwalonej w formalinie (zbuforowanej) i zatopionej w blokach parafinowych. Dwa z czterech otrzymanych skrawków wykazywały domieszkę obcego DNA w zakresie autosomalnych loci. Podejrzewano, iż domieszka jest efektem zanieczyszczenia noża mikrotomu mikroskopijnymi resztkami tkanki pozostawionej podczas skrawiania narzędzi pochodzących od innego osobnika. W celu uprawdopodobnienia tej wersji postanowiono pobrać dodatkowe skrawki z bloków krojonych bezpośrednio przed analizowanymi. Uzyskany profil DNA w pełni potwierdził przypuszczenie. Noże mikrotomów mogą być poważnym źródłem kontaminacji tkanek używanych do dalszych badań DNA metodą PCR. Obecność domieszki obcego DNA tylko w 2 pierwszych skrawkach badanych narzędzi można tłumaczyć „zebraniem” przez pierwsze dwa skrawki resztek poprzednich mikrofragmentów tkanek. Pozostałe dwa skrawki na końcu były praktycznie wolne od obcego DNA.

Mając powyższe na uwadze należy bezwzględnie dokonywać skrupulatnego oczyszczenia noża mikrotomu w tych sytuacjach, kiedy będzie on stosowany do przycinania fragmentów tkanek w celu poddania ich procesowi badania DNA.

PODSUMOWANIE

O istocie problemu świadczy doniesienie Rutty i wsp. (7), którzy poddali badaniom narzędzia, stoły i miejsca przycinania tkanek w 20 salach sekcyjnych z terenu Wielkiej Brytanii. W 50% badanych przypadków stwierdzono mierzalną obecność ludzkiego DNA na narzędziach i badanych powierzchniach. Materiał ten poddawał się amplifikacji a w niektórych przypadkach stwierdzono obecność DNA nawet trzech różnych osobników. Stan taki zaistniał pomimo rutynowego stosowania w przypadku narzędzi sekcyjnych ich mycia w detergencie i/lub płynie dezynfekującym oraz w 12 na 20 przypadków pomimo dodatkowego ich autoklawowania. Jak z tego wynika, problem ten dotyczy również kraju, gdzie

technika PCR w genetyce sądowej została wprowadzona znacząco wcześniej niż w naszym kraju. Konieczna jest więc zmiana sposobu myślenia i zwiększenie nadzoru m.in. nad technikami - laborantami sekcyjnymi, od których w przypadku tkanek pobieranych do badań klasycznych nie wymagano tak ogromnego reżimu czystości pracy jaki musi pojawić się wszędzie tam, gdzie materiał biologiczny pobrany na sali sekcyjnej jest następnie poddawany badaniu DNA metodą PCR. Zmiana sposobu myślenia przy pobieraniu materiału do badania DNA generalnie winna dotyczyć wszystkich tych osób, które uczestniczą przy jego zabezpieczeniu. Wszystkie ślady, które poddane zostaną później analizie DNA winny być traktowane na miejscu przestępstwa jak ślady daktyloskopijne, gdyż każde dotknięcie nieoddzianą w „jednorazową” rękawicę dłonią może prowadzić i bardzo często prowadzi do zafałszowania wyniku badania w wyniku pojawienia się obcego DNA. Stąd nieodzowna konieczność stosownych zabezpieczeń techników kryminalistyki przed naniesieniem ich własnych śladów (naskórek, włosy) na obiekty mogące być przedmiotem badania. Można to uczynić stosując kombinezony, ochraniacze na obuwiu czy rękawice zmieniane do każdego nowego śladu, a także oczyszczając lub zmieniając na nowe narzędzia do pobierania śladów (skalpele, pensety, jałowe próbówki, nożyczki). Najlepiej stosować wszędzie, gdzie jest to tylko możliwe, sprzęt jednorazowego użytku. Jałowa wymazówka winna stać się instrumentem z wyboru wszędzie tam, gdzie jej użycie jest możliwe. Dotyczy to szczególnie wymazów pobieranych z otworów naturalnych ciała w przypadku przestępstw na tle seksualnym. Niestety stosunkowo często jedynym sposobem wykonania wymazu jest szkiełko podstawowe, na którym sporządzono rozmaz palcem odzianym w rękawicę gumową. Niestety warunki takie nie dają stuprocentowej pewności, iż szkiełko było zupełnie pozbawione ludzkiego DNA, a rękawica nie dotykała narzędzi, na których znajdował się już materiał pochodzący od innej osoby lub osób. Jeżeli w przypadku Zakładów Medycyny Sądowej wykluczenie obecności DNA jej pracowników w badanym materiale jest możliwe, gdyż wszyscy oni zazwyczaj poddani zostali już profilowaniu DNA, tak kontrola tego typu staje się niemalże niemożliwa, gdy ślad jest pobierany i zabezpieczany poza tymi placówkami. Jednym z możliwych sposobów uniknięcia niekontrolowanych zanieczyszczeń jest procedura, stosowana w szeregu krajów, wykonywania sekcji i pobierania śladów od pokrzywdzonych osób wyłącznie w przeznaczonych do tego celu zakładach medycyny sądowej, gdzie stosowane są właściwe środki ostrożności i wysoki standard czystości narzędzi i pomieszczeń, aby pobierany materiał wolny był od zanieczyszczeń. W ogromnej ilości przypadków tego rodzaju warunków nie zapewniają sale sekcyjne szpitalne czy wręcz cmentarne, w których warunki higieniczne pozostawiają wiele do życzenia gdzie nie tylko nie ma jednorazowego sprzętu, a narzędzia nie są właściwie myte, ale i wiedza o zagrożeniu kontaminacją jest bardzo mała lub żadna. Jak wynika z powyższych przykładów zasady dokładnego mycia, dezynfekowania i dekontaminacji w przypadku badania DNA muszą dotyczyć nie tylko laboratorium DNA ale również i tych miejsc na salach sekcyjnych, gdzie przeprowadzane są sekcje sądowe. Ponadto regularnej kontroli czystości sprzętu winny być poddawane również sale sekcyjne, a te, które nie spełniają lub nie spełnią stosownych

wymagań (wolne od DNA) winny być eliminowane jako miejsca wykonywania sekcji sądowych do momentu spełnienia określonych wymogów. Sądymy, że problemem tym winna zająć się w najbliższym czasie Komisja Genetyki Sądowej przy Polskim Towarzystwie Medycyny Sądowej i Kryminologii oraz specjalista krajowy z zakresu medycyny sądowej w imię podniesienia jakości świadczonych usług.

Tymczasem intensywnym szkoleniom powinny być poddane wszystkie te osoby, które mają kontakt z ofiarą jak np. przedstawiciele zakładów pogrzebowych transportujący zwłoki z miejsca przestępstwa do zakładów medycyny sądowej, czy ogólnie mówiąc wszyscy ci, którzy zaangażowani są podczas ujawniania, zbierania, transportu i przechowywania biologicznego materiału dowodowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Córach D., Penacino G., Sala A. Cadaveric DNA extraction protocol based on cetyl trimethyl amonium bromide (CTAB). W : Mangin P, Ludes B (eds) *Acta Medicnae Legalis*, vol. XLIVP, (1995) Springer, Berlin, pp 35-36. -2. Kwok S., R. Higuchi.: Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, 339, 237-238. -3. Lee H.C., Ladd C, Scherczinger C.A., Bourke MT.: Forensic Application of DNA typing. Part 2: Collection and preservation of DNA evidence. *Am. J Forensic Med Pathol* 1998, 19: 10-18. -4. Pawłowski R.: Medyczno-sądowe badanie śladów biologicznych. Kraków 1997, Wyd. IES; -5. Pawłowski R., Maciejewska A.: Forensic validation of a multiplex containing nine STRs - population genetics in Northern Poland. *Int. J Legal Med.* 2000, 114: 45-49, -6. Rogers B.B, Alpert L.C., Hine E.A., Buffone G.J.: Analysis of DNA in fresh and fixed tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1990, 136, 541-548. - 7. Ruttly GT.N., Watson S., Davidson J.: DNA contamination of mortuary instruments and work surfaces: a significant problem in forensic practice? *Int J Legal Med* 2000, 114: 56-60.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej,
80-210 Gdańsk,
ul. Curie-Skłodowskiej 3A.