

Magdalena Dębska

Bieżące kierunki w kryminalistycznych badaniach dotyczących identyfikacji zwierząt należących do gatunków zagrożonych wyginięciem

Wstęp

W ostatnich latach nastąpił zauważalny rozwój jednej z dziedzin biologii kryminalistycznej (z ang. tzw. *wildlife forensic*, którą można określić jako kryminalistykę dzikiej przyrody) zajmującej się m.in. identyfikacją DNA pochodzenia zwierzęcego. Połączone wysiłki ośrodków naukowych na całym świecie oraz doświadczenia ekspertów kryminalistyki prowadzą do wypracowania wspólnych, ujednoliconych zasad prowadzenia badań z zakresu identyfikacji zwierząt z wykorzystaniem analizy DNA. Obecnie w żadnym z policyjnych laboratoriów kryminalistycznych w Polsce nie są wykonywane badania z zakresu identyfikacji gatunkowej zwierząt mające duże znaczenie w sprawach kryminalnych i gospodarczych. Wynika to z faktu, iż badania zwierzęcego DNA nie są jeszcze ustandaryzowane w takim stopniu, jak rutynowo wykonywane badania DNA ludzkiego. Z drugiej strony międzynarodowa społeczność skupiająca przedstawicieli nauk kryminalistycznych wykazuje duże zainteresowanie implementacją metod badań zwierzęcego DNA w rozwiązywaniu prowadzonych spraw oraz zaangażowanie w działania mające do tego doprowadzić. W ostatnich latach lawinowo wzrasta liczba specjalistycznych publikacji z zakresu wykorzystania molekularnych metod w identyfikacji gatunków zwierząt mających wykorzystanie w kryminalistyce [1–4]. Dostępne są także specjalistyczne pozycje książkowe z zakresu omawianej dziedziny badań [5–7].

Rozwój biologii molekularnej daje nowe, coraz bardziej precyzyjne narzędzia do identyfikacji zwierzęcego DNA. Umożliwiają one szybką i wydajną analizę sekwencji fragmentów mitochondrialnego DNA kodującego cytochrom b, oksydazę cytochromową podjednostkę I (COI), hiperzmienny region pętli D, badanie markerów genetycznych SNP czy też analizę loci STR [8–12].

Implementacja wyników badań naukowych z zakresu identyfikacji DNA zwierzęcego do praktyki laboratoriów kryminalistycznych stanowi wsparcie dla organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości w zakresie czynności procesowo-śledczych. Może się przyczyniać do zwiększenia efektywności działania służb zajmujących się sprawami z zakresu przestępczości gospodarczej o międzynarodowym wymiarze, takimi jak na przykład handel gatunka-

mi zwierząt zagrożonych wyginięciem i oszustwa. Ślady zwierzęce występujące na miejscu zdarzenia o charakterze kryminalnym czy też innym, jak na przykład kłusownictwo gatunków łownych, znęcanie się nad zwierzętami, wypadki komunikacyjne, powodują, że często przydatne byłoby wykonanie badań identyfikacyjnych DNA zwierzęcego, tak jak w przypadku przedstawionym na ryc. 1a, b. Taka identyfikacja może przyczynić się pośrednio do udowodnienia winy podejrzanemu w przypadku, gdy nie zostawił on na miejscu zdarzenia własnych śladów, ale pozostały tam ślady zwierzęcia, na przykład naniesione na odzież czy przedmioty z nim związane.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie dotychczasowych osiągnięć w dziedzinie badań DNA zwierzęcego w sprawach związanych z nielegalnym handlem dziko żyjących gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem.

Problematyka przestępczości związanej z handlem zwierzętami należącymi do gatunków zagrożonych wyginięciem a badania DNA pochodzenia zwierzęcego

Zjawisko nadmiernej eksploatacji gatunków do celów komercyjnych nie jest wewnętrznym problemem pojedynczych państw afrykańskich czy azjatyckich, lecz działa na zasadzie naczyń połączonych. Im większe jest bowiem zainteresowanie chronionymi okazami w krajach zbytu (np. w Unii Europejskiej), tym większa jest presja na pozyskiwanie rzadkich gatunków w ich środowisku naturalnym (zazwyczaj w państwach ubogich) [13]. Według raportu organizacji WWF (World Wildlife Fund – Światowy Fundusz na Rzecz Przyrody) wartość nielegalnego handlu dzikimi zwierzętami szacowana jest rocznie na 19 miliardów dolarów amerykańskich [14]. Zauważalny jest rozdźwięk pomiędzy dużą liczbą prowadzonych postępowań a niezbyt często wykonywanymi badaniami zwierzęcego DNA, które mogłyby być pomocne w rozwiązywaniu tego typu spraw [15].

Analiza DNA pochodzenia zwierzęcego ma szczególne znaczenie zwłaszcza w postępowaniach, w których identyfikacja na podstawie morfologii gatunku nie jest



Ryc. 1 a, b. Martwy gad, najprawdopodobniej młody aligator lub krokodyl, odnaleziony w lesie koło Rychnowa i zabezpieczony przez policjantów
Fig. 1 a, b. Dead reptile, probably a young alligator or crocodile found in the forest near Rychnowa and secured by the police
 Źródło: www.policja.pl

możliwa. Chodzi tu m.in. o sprawy dotyczące nielegalnego handlu dzikimi zwierzętami należącymi do gatunków zagrożonych wyginięciem, tzw. CITES, w których przedmiotem przestępstwa są wysoko przetworzone części zwierząt, tym samym niemożliwe do rozpoznania na podstawie specjalnych kluczy do rozpoznawania gatunków. W produktach tradycyjnej medycyny azjatyckiej poszczególne gatunki zwierząt mogą występować na przykład w postaci różnego rodzaju mieszanek. W praktyce spotykane są także wyroby z tkanek zwierzęcych, takich jak: pazury, rogi, ciosy, karapaksy, plastrony, muszle, skóry, kości, zęby, sprzedawane w postaci biżuterii, ozdób, torebek, przedmiotów codziennego użytku (ryc. 2 i 3 a, b).

Coraz częściej w sprawach gospodarczych zabezpieczane są leki tradycyjnej medycyny azjatyckiej, które mogą występować w trzech postaciach: jako czysty środek, jako mieszanka kilku składników bądź też jako opatentowane



Ryc. 2. Szkatułka pochodząca z aukcji internetowej, wykonana najprawdopodobniej z kości słoniowej, zabezpieczona przez bielańskich policjantów w Warszawie

Fig. 2. Casket, probably made of ivory, found in the online auction and secured by the police in Warsaw

Źródło: http://www.policja.waw.pl/portal/pl/1/21889/Szkatulka_z_kosci_sloniowej_w_rekach_policji.html, data publikacji: 15.11.2012



Ryc. 3 a, b Żywe okazy koralowców (ryc. 3a) oraz obumarłe koralowce (ryc. 3b), stanowiące towar zatrzymany przez funkcjonariuszy służby celnej w Warszawie. Transport 350-kilogramowej rafy koralowej przyleciał z Indonezji do Warszawy. Przesyłka zawierała ginące gatunki i nie miała załączonych stosownych pozwoleń, ponadto w dokumentach były wymienione inne gatunki niż te, które znajdowały się faktycznie w transporcie

Fig. 3 a, b Live specimens of corals (fig. 3a) and dead corals (fig. 3b) seized by custom officers in Warsaw. Shipment of 350 kg of coral reef arrived from Indonesia to Warsaw. Consignment contained endangered species without special permits, and the documents declared other animal species than the ones found in shipment

Źródło: Służba Celna http://www.mf.gov.pl/sluzba-celna/wiadomosci/aktualnosci/-/asset_publisher/2UWl/content/sluzba-celna-pomogla-uradowac-ginace-koralowce?redirect=http%3A%2F%2Fwww.mf.gov.pl%2Fsluzba-celna%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_qU6T%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D2
 data utworzenia: 11.12.2012, autor tekstu „Służba Celna pomogła uratować ginące koralowce”: Marcin Daczko IC w Gdyni

leki w postaci tabletek, pigułek, plastrów, pochodzące od zwierząt gatunków zagrożonych wyginieciem (ryc. 4). Bez zastosowania specjalistycznych metod wykorzystujących najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej bardzo skomplikowane lub wręcz niemożliwe byłoby oznaczenie składu gatunkowego mieszanek używanych w lecznictwie tradycyjnej medycyny azjatyckiej. Na świecie notuje się ciągły wzrost zapotrzebowania na tego typu specyfiki. Do ich wyrobu używa się 50 gatunków zwierząt, z czego 20 gatunków to gatunki chronione postanowieniami Konwencji Waszyngtońskiej [16]. Według WHO, Światowej Organizacji Zdrowia, około 80% ludzi na świecie korzysta ze specyfików medycyny wschodniej [17]. Na podstawie badań przeprowadzonych przez M. Romanowicz i Z. Podgórką (2010) stwierdzono, że również na polskim rynku można spotkać szeroką gamę produktów zawierających w swoim składzie tkanki zwierząt należących do gatunków zagrożonych wyginieciem w postaci różnego rodzaju maści, plastrów, nalewek, tłuszczu, tabletek i kremów [18].



Ryc. 4. Produkty tradycyjnej medycyny azjatyckiej zawierające materiał zwierzęcy gatunków zagrożonych wyginieciem

Fig. 4. Products of traditional Asian medicine containing endangered species

Źródło: <http://www.operationcharm.org/traditional-chinese-medicine/>

Przepisy prawne

Gdy pod koniec XX wieku zauważono, że nielegalny handel dzikimi zwierzętami oraz roślinami ma wpływ na ginięcie poszczególnych gatunków, podjęto prace nad stworzeniem podstaw prawnych, które skutecznie kontrolowałyby handel wytworami przyrody. W trosce o zachowanie ginącej fauny i flory sporządzono w 1973 roku w Waszyngtonie Konwencję o Międzynarodowym Handlu Dzikimi Zwierzętami i Roślinami Gatunków Zagrożonych Wyginieciem (Convention on International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora – CITES). W 1989 roku Polska ratyfikowała przystąpienie do Konwencji Waszyngtońskiej, która jest aktem międzynarodowego prawa publicznego. W związku z przystąpieniem naszego kraju do Unii Europejskiej postanowienia konwencji są reprezentowane przez rozporządzenia unijne.

Konwencja Waszyngtońska reglamentuje handel ponad 34 000 gatunkami fauny i flory przez system zezwoleń i świadectw, który determinuje podejmowanie transgranicznej działalności handlowej [13, 18]. Według konwencji CITES i prawa Unii Europejskiej chronione są żywe okazy, ale co istotne, także produkty z nich wykonane i ich części pochodne. W art. I, lit. B konwencji określona została definicja okazu. Z definicji tej, a także z opinii Państwowej Rady Ochrony Przyrody w sprawie zakresu pojęcia okaz, wynika, że okazem gatunku jest każde zwierzę lub roślina, żywe lub martwe, a także każda łatwo rozpoznawalna ich część bądź produkt z nich otrzymany, oraz wszelkie specyfiki, które zgodnie z dołączonym dokumentem, opakowaniem, oznakowaniem lub etykietą, bądź jeżeli wynika to z jakichkolwiek innych okoliczności, mają zawierać lub zawierają części albo produkty pochodzące z roślin, grzybów lub zwierząt danych gatunków (ale także wówczas, jeśli ich nie zawierają) [18, 19].

W chwili obecnej naruszenie przepisów dotyczących przewożenia przez granicę Unii Europejskiej okazów należących do gatunków zagrożonych wyginieciem na mocy art. 128 ustawy z dnia 16 kwietnia 2004 roku o ochronie przyrody jest przestępstwem, a osoba, która dokonała nielegalnego przywozu lub usiłowała dokonać nielegalnego wywozu okazu, podlega karze pozbawienia wolności od 3 miesięcy do 5 lat. Na podstawie danych statystycznych w 2011 roku zanożowano 178 wszczętych postępowań z art. 128 ustawy o ochronie przyrody (dane z systemu statystyki policyjnej TEMIDA) [20]. W 2011 roku Izba Celna dokonała 149 zatrzymań okazów CITES (12833 okazów, w tym 26 żywych okazów zwierząt i 750 kg żywej skały koralowej, 9594 okazów medykamentów medycyny azjatyckiej, a także 8,3 kg kawioru [*Acipenseriformes spp.*] i 61,5 kg koralowców rafotwórczych [*Scleractinia spp.*] [21].

Rodzaje śladów i dowodów rzeczowych pochodzenia zwierzęcego i sposoby ich zabezpieczania

Materiałem dowodowym pochodzenia zwierzęcego mogą być:

- wydzieliny i wydaliny (ślina, nasienie, kał, mocz, wydzielina z pochwy),
- wytwory skóry (sierść, włosy, naskórek, pazury, pióra, łuski),
- tkanki (krew, skóra, kości, zęby, karapaksy i plastrony żółwi, ciosy sioni, rogi nosorożców, woreczki żółciowe i tłuszcz niedźwiedzi, gruczoły piżmowca),
- jaja i larwy owadów,
- specyfiki wytworzone z różnych części ciała zwierząt i stanowiące medykamenty tradycyjnej medycyny azjatyckiej (tabletki, kremy, maści, plastry, proszki).

Zasady zabezpieczania i przechowywania materiału biologicznego pochodzenia zwierzęcego są takie same

jak w przypadku śladów pochodzących od człowieka. Płynną krew zabezpiecza się przy użyciu jałowych wymazówek lub wylewa na sterylny gazik i pozostawia do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Istotną sprawą jest ochrona przed wilgocią; należy dopilnować, aby na przykład wymazówki zostały pozostawione do całkowitego wyschnięcia i nie były bezpośrednio ekspozowane na promienie słoneczne. Wyschnięte wymazówki można przechowywać w temperaturze pokojowej, w lodówce lub pozostawić do zamrożenia (w zależności od procedury). Należy jednak pamiętać, aby zminimalizować cykle zamrażania i rozmrażania, które mogą przyczyniać się do degradacji DNA. Sierść i włosy zabezpiecza się do papierowych pakietów. Mniejsze dowody rzeczowe (tj. pazury, łuski) można umieścić w papierowych torebkach lub kartonach. Fragmenty kości i zęby z pozostałościami tkanek miękkich, a także same fragmenty tkanki miękkiej najlepiej umieścić w sterylnych plastikowych pojemnikach i zamrozić. Jeżeli mamy do czynienia z wysuszonymi tkankami kostnymi, należy zabezpieczyć je w papierowych kopertach lub pudełkach i przechowywać w przewiewnym miejscu w temperaturze pokojowej [5].

Rodzaje identyfikacji zwierząt

Okazy CITES można rozpoznać dzięki różnym formom identyfikacji [13]. Są to:

- identyfikacja na podstawie odczytu z obrączki lub opaski zakładanej na nogę (w przypadku ptaków),
- identyfikacja radiowa za pomocą mikroczipów wszczepianych zwierzętom (stosowane u gadów, ptaków i ssaków),
- identyfikacja na podstawie dokumentacji fotograficznej,
- identyfikacja za pomocą tagów (numerowanych znaczków przyczepianych do twardych części ciała zwierzęcia, jak w przypadku koralowców, przydaczni, koników morskich),
- identyfikacja na podstawie specjalnie opracowanych kluczy do rozpoznawania gatunków zwierząt,
- identyfikacja na podstawie badań genetycznych.

Genetyczne metody identyfikacji zwierząt

Metody genetycznej identyfikacji materiału pochodzenia zwierzęcego wykorzystywane w kryminalistyce najprościej można podzielić na:

- identyfikację wykorzystującą polimorfizm DNA mitochondrialnego polegającą na analizie sekwencji genu cytochromu b, COI, hiperzmiennych regionów HV1 i HV2, HV3 w obrębie pętli D, 12S i 16S rRNA, regionu kontrolnego CR.
- identyfikację wykorzystującą polimorfizm DNA jądrowego polegającą na analizie loci STR.

Osiągnięcia w dziedzinie genetycznych badań materiału dowodowego pochodzenia zwierzęcego gatunków zagrożonych wyginięciem

Identyfikacja na podstawie morfologii okazu lub też analiza mikroskopowa są pierwszymi metodami badań, jakie podejmuje się w celu klasyfikacji gatunkowej, ponieważ są one tanie i nie wymagają użycia specjalistycznego sprzętu oraz drogich odczynników. Identyfikację na podstawie morfologii można na przykład zastosować do określenia przynależności gatunkowej pod kątem oceny charakterystyki karapaksu u żółwi, oceny wzoru na skórze tygrysów czy też charakterystycznych dla kości słoniowej tzw. linii Schregera [13, 22]. Te metody wymagają jednak powołania specjalistów z zakresu zoologii, a czasem nie prowadzą do ostatecznej identyfikacji, jak ma to miejsce chociażby w przypadku mikroskopowej oceny sierści u różnych gatunków zwierząt [23]. Gdy ocena morfologiczna nie daje wiarygodnych wyników lub gdy materiał pochodzenia zwierzęcego jest wysoko przetworzony, na przykład występuje w postaci proszku, oleju, molekularne metody identyfikacji gatunkowej zwierząt mogą być bardzo pomocnym narzędziem. Dzięki badaniom genetycznym można stwierdzić, czy badany materiał zwierzęcy pochodzi od gatunku objętego ochroną, czy takiej ochronie nie podlega.

Podczas XXI Międzynarodowego Sympozjum Nauk Sądowych odbywającego się w Hobart na Tasmanii w 2012 roku podkreślano wagę prowadzenia badań DNA nie pochodzącego od człowieka. Wzrost częstości zastosowania nowych technologii przy typowaniu DNA w sprawach z tzw. *wildlife forensics* i ich implementacja w kryminalistyce wiąże się z większą liczbą prowadzonych spraw z zakresu nielegalnego handlu dzikimi gatunkami zwierząt zagrożonych wyginięciem. Podkreślana jest konieczność przeprowadzania badań walidacyjnych przed wprowadzeniem nowych metod analizy DNA zwierzęcego do rutynowego stosowania w laboratorium [24].

W identyfikacji gatunków zagrożonych wyginięciem najszersze zastosowanie ma identyfikacja wykorzystująca polimorfizm DNA mitochondrialnego ze względu na jego właściwości, takie jak liczba kopii w komórce czy struktura, dzięki czemu analizie można poddać nawet niewielką ilość materiału, który często jest zdegradowany [3].

Pierwsze badania molekularne identyfikujące gatunki zwierząt wykorzystywały następujące techniki: RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). W chwili obecnej metody te są rzadko wykorzystywane ze względu na małą odtwarzalność oraz problemy przy interpretacji wyników w przypadku wystąpienia mieszanin. Dlatego zostały zastąpione analizą sekwencji genów znanych loci, które wykazują międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie,

m.in. barkoding DNA [25–30] czy też analiza SNP (*single nucleotide polymorphism* – polimorfizm pojedynczego nukleotydu) [11, 31–34]. Barkod DNA (*DNA barcode*) to „kod paskowy DNA”, czyli sekwencja DNA w wybranym standardowym regionie genomu pozwalająca na identyfikację gatunku [35]. Skład sekwencji loci można odnaleźć w bazach internetowych, tj. GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) czy EMBL (www.ebi.ac.uk/embl/), i wykorzystywać je w analizie kryminalistycznej. W identyfikacji gatunkowej zwierząt w głównej mierze wykorzystywane są sekwencje genu cytochromu b oraz oksydazy cytochromowej podjednostki I [3, 15, 36]. Inne markery mające zastosowanie to odcinki kodujące 12S i 16S rRNA [37–41]. Analiza sekwencji w obrębie pętli D wykorzystywana jest do identyfikacji wewnątrzgatunkowej [42, 43].

Głównym markerem mającym zastosowanie w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych, wspomnianym powyżej, jest cytochrom b. Gen cytochromu b koduje białko o długości 380 aminokwasów występujące w mitochondriach i biorące udział w szlaku fosforylacji oksydacyjnej [1, 44]. Badania identyfikacyjne z wykorzystaniem regionu cyt b, przeprowadzone na 44 różnych gatunkach zwierząt należących do pięciu grup kręgowców (ssaków, ptaków, gadów, płazów i ryb), wykazały możliwość aplikacji tej metody w badaniach kryminalistycznych [45]. W badaniach przeprowadzonych przez Prusaka i in. [46] wykazano skuteczność zastosowania locus cyt b w przypadku spokrewnionych gatunków dzikich zwierząt na podstawie żubra (*European bison*) i bizona (*American bison*). Potwierdzono wysoką siłę dyskryminacji w przypadku analizy prób zwierzęcych pochodzących z pokrewnych grup taksonomicznych. Z drugiej strony badania walidacyjne przeprowadzone przez Branickiego i in. (2003) wykazały, że analizowany fragment cyt b nie był wystarczający do rozróżnienia blisko spokrewnionych gatunków, takich jak dzik i świnia, muflon i owca, wilk i pies oraz dziki i udomowiony kot [8]. Wyniki badań z ostatnich dziesięciu lat potwierdziły natomiast możliwość zastosowania cyt b w przypadku zagrożonych wyginięciem gatunków zwierząt dla: części tkanek pozyskiwanych od tygrysów [47, 48], jaj i pancerzy żółwi [49–51], skór krokodyli [52], rogów nosorożców [53], kości słoniowej [54, 55], woreczków żółciowych niedźwiedzi [56], tkanek różnych gatunków ptaków [57].

Kolejnym locus wykorzystywanym w identyfikacji DNA pochodzenia zwierzęcego gatunków zagrożonych jest COI [44]. Gen oksydazy cytochromowej podjednostki I ma długość około 648 p.z. [58]. Podobnie jak gen cyt b koduje białko łańcucha oddechowego. Zastosowanie tego markera do celów sądowych jest możliwe wtedy, gdy dysponujemy odpowiednią sekwencją referencyjną [9]. Sekwencje genu COI cechuje mała zmienność wewnątrzgatunkowa oraz duża zmienność międzygatunkowa. Badania Wilde i in. [58] wykazały, że metodyka z wykorzystaniem genu COI może być stosowana w odniesieniu do oddalonych genetycznie gatunków, natomiast zastosowanie jej

w przypadku gatunków blisko spokrewnionych wymaga dalszych analiz. Mitochondrialny gen COI został wykorzystany do rozwiązania spraw dotyczących kłusownictwa dziko żyjących zwierząt w południowej Afryce [30]. Autorzy artykułu podkreślają konieczność zapewnienia materiału referencyjnego dla gatunków żyjących na terenach danego państwa jako odniesienia do uzyskiwanych wyników badań. Nad katalogowaniem kodów paskowych DNA z wykorzystaniem COI pracują ośrodki naukowe z całego świata, m.in. Consortium for the Barcode of Life skupiające kilkadziesiąt krajów i patrolujące programem sekwencjonowania COI u różnych gatunków zwierząt.

Od pewnego czasu prowadzona jest dyskusja nad tym, który z markerów – cyt b czy COI – jest bardziej odpowiedni do zastosowania w badaniach genetycznych do identyfikacji gatunkowej zwierząt, które mogą być wykorzystywane w kryminalistyce [59]. Tobe i in. (2010) przeprowadzili ocenę wewnątrzgatunkowej zmienności genetycznej na podstawie analizy sekwencji genów cyt b i COI na 217 różnych gatunkach ssaków. Siła dyskryminacji dla badań przeprowadzonych z wykorzystaniem cyt b była wyższa w porównaniu z COI [60].

Najnowsze metody identyfikacji DNA zwierzęcego pochodzącego z wyrobów tradycyjnej medycyny azjatyckiej

Pomimo dużej kampanii edukacyjnej i nagłośnienia w mediach problemu, jakim jest handel zwierzętami należącymi do gatunków zagrożonych wyginięciem, w odniesieniu do medykamentów tradycyjnej medycyny azjatyckiej wciąż notuje się przypadki występowania substancji pochodzących od gatunków objętych ochroną. W tabeli 1 przedstawiono najczęściej występujące na świecie ginące gatunki zwierząt, których ślady tkanek odnaleziono w lekach medycyny azjatyckiej [16].

Polski raport z 2010 roku [18] przedstawia badania rynku, z których wynika, że produkty zawierające składniki otrzymywane z chronionych gatunków zwierząt występowały w takich formach, jak: maści, plastry, tłuszczy, nalewki, tabletki, maseczki, kremy. W sklepach zielarskich i farmakologicznych znajdowały się środki na odchudzanie, kosmetyki, suplementy diety, maści zawierające w swym składzie substancje pochodzące od zwierząt chronionych prawem. Także na ponad 40 portalach internetowych zanotowano po 2 i więcej ofert produktów, w których składzie znajdowały się substancje pochodzące od chronionych gatunków. Na odbywających się w Warszawie cyklicznie targach medycyny naturalnej znaleziono m.in. tłuszcz niedźwiedzia, maseczki z koralowców, kremy z piżawki lekarskiej, plastry zawierające kości lamparta i piżmo. W raporcie przedstawiono charakterystykę produktów zawierających w swym składzie elementy pochodzące od chronionych gatunków zwierząt:

Tabela 1

Substancje pochodzące od najczęściej spotykanych ginących gatunków zwierząt występujących w lekach medycyny azjatyckiej oraz ich wykorzystanie

The most common endangered species which are ingredients of traditional Asian medicine

GATUNEK	NAZWA SPECYFIKU	WYKORZYSTANIE
1. Piżmowiec (<i>Moschus moschiferus</i>)	SHE XIANG	Piżmo tych zwierząt wykorzystywane jest do wyrobu perfum, ale zabijane są też całe okazy
2. Lampart (<i>Panthera pardus</i>)	NU BAO JIAONANG (GU)	Sproszkowane części ciała, pazury, mięso, szkielet, z którego wyrabia się wino, plastry
3. Suhak (<i>Saiga tatarica</i>)	LING YANG JI AO	Sproszkowane rogi
4. Pławikoniki (koniki morskie) (<i>Hippocampus</i>)	HAI MA	Sproszkowane lub całe okazy
5. Niedźwiedź brunatny (<i>Ursidae</i>)	XIONG (DAN)	Woreczki żółciowe, tłuszcz
6. Żółw (<i>Mauremys reevesii</i>)	GUI BAN	Plastry (brzuszną część pancerza) przerabia się na klej
7. Łuskowce (<i>Pholidota</i>)		Łuski

Źródło: opracowanie własne

- maści, kremy, tabletki powstałe na bazie tkanek pijawki lekarskiej oraz żywe osobniki,
- tłuszcz niedźwiedzia brunatnego,
- proszek lub całe okazy koników morskich,
- tran uzyskany z ości węgorka europejskiego,
- pazury, kości, sproszkowane części ciała, wnętrzności ssaków takich jak: tygrys, lampart, piżmowiec.

Molekularne metody identyfikacji DNA zwierzęcego występującego w produktach tradycyjnej medycyny azjatyckiej są szeroko badane przez różne ośrodki naukowe na całym świecie. Barkoding DNA ma najszerze zastosowanie w identyfikacji DNA pochodzenia zwierzęcego. Fragment mitochondrialnego DNA genu oksydazy cytochromowej cytochromu c podjednostki I (COI) o długości 658 par zasad ma zastosowanie jako barkod dla zwierząt. Badania Wallace L.J. i in. (2012) wykazały efektywność metody barkodingu DNA jako narzędzia służącego do identyfikacji DNA zwierzęcego zawartego w naturalnych produktach zdrowotnych [61]. Barkody DNA otrzymano w wypadku 72% spośród wszystkich testowanych zwierzęcych produktów, z czego 85% uzyskano dla produktów z płetw rekina, 60% dla próbek z ryb i 60% dla próbek pochodzących od ssaków (jeleni, fok, owiec). W przypadku próbek o wysokiej degradacji materiału nie udało się uzyskać pełnej długości sekwencji DNA (~650 p.z.). Dla tego rodzaju materiału zastosowano więc sekwencjonowanie minibarkodów (fragmenty o długości 130 par zasad). Spośród 26 sekwencji uzyskanych z produktów pochodzenia zwierzęcego 65% stanowiło sekwencje pełnej długości barkodów, a 35% stanowiło minibarkody (~130 p.z.). Co ciekawe, porównując sekwencje uzyskane z materiału badawczego z sekwencjami z materiału referencyjnego, tylko w 81% przypadków uzyskano zgodność dla obu typów materiału. Wynikało to z faktu,

że w 5 próbkach spośród 26 badanych zanotowano sekwencje charakterystyczne dla innych gatunków niż deklarowane przez producenta. Tak było w przypadku próbek z rekina tygrysięgo (*Galeocerdo Cuvier*), z których po zsekwencjonowaniu uzyskano sekwencje charakterystyczne dla *Sphyrna tiburo* i *Rhizoprionodon lalandii*. Wiele zidentyfikowanych próbek płetw rekina pochodziło od gatunków wymienionych w *Czerwonej księdze gatunków zagrożonych* publikowanej przez Międzynarodową Unię Ochrony Przyrody i Jej Zasobów (IUCN). Autorzy artykułu podkreślają, że barkoding DNA stosowany w celu identyfikacji gatunków zwierząt wykorzystywanych do produkcji medykamentów medycyny naturalnej może być skutecznym i pomocnym narzędziem dla organizacji zajmujących się sprawami eksploatacji zwierząt należących do gatunków chronionych.

W przypadku wyrobów tradycyjnej medycyny azjatyckiej w wielu przypadkach mamy do czynienia z mieszkankami materiału biologicznego pochodzącego od różnych gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem. Dodatkowym utrudnieniem w identyfikacji DNA zwierzęcego, oprócz wymieszania DNA jednego gatunku z drugim, jest także zdegradowanie materiału biologicznego. Autorem S.S. Tobe i A. Linacre (2011) udało się rozwiązać problemy identyfikacji gatunkowej zwierząt w mieszkankach medycyny azjatyckiej przez opracowanie specjalistycznego testu [62]. Został on przygotowany w ten sposób, że amplifikowane są gatunkowo specyficzne fragmenty mitochondrialnego DNA. Dla każdego gatunku długość amplifikowanego fragmentu jest inna dzięki czemu możliwe jest różnicowanie. Specjalnie dobrane startery umożliwiają identyfikację konkretnych gatunków, nawet jeśli występują one w mieszaninie z innymi gatunkami. Opracowany test jest bardzo czuły i umożliwia identyfikację nawet w przypadku

bardzo zdegradowanego DNA. Test ten jest przeznaczony dla takich gatunków zwierząt, jak: nosorożec, tygrys, niedźwiedź, lampart, łuskowiec, piżmowiec, a także wielu innych niezagrożonych wyginieciem ssaków, które często są podstawiane zamiast droższych produktów pozyskiwanych z gatunków chronionych.

Podczas opracowywania testu regiony wysoce konserwatywne mitochondrialnego DNA zostały wykorzystane do zaprojektowania uniwersalnych starterów, natomiast fragmenty charakterystyczne dla konkretnych gatunków wykorzystano do zaprojektowania starterów specyficznych gatunkowo. Dodatkowo został stworzony wewnętrzny standard do oszacowywania obecności ewentualnej kontaminacji w próbkach. Uniwersalne startery zostały zaprojektowane na podstawie analizy fragmentów genomu mitochondrialnego DNA regionów 12S, 16S, COI, cyt b. Ponadto zostały zaprojektowane po trzy specyficzne gatunkowo startery dla każdego z badanych chronionych gatunków zwierząt i po jednym starterze dla popularnych niechronionych gatunków, które często stanowią zamienniki dla produktów pozyskiwanych z drogich zagrożonych gatunków zwierząt. W ramach kontroli wewnętrznej zaprojektowano cztery startery, które wchodziły w reakcję z czterema uniwersalnymi starterami. Mając na uwadze występujące mutacje, wybrano trzy specyficzne gatunkowo startery. W przypadku wystąpienia mutacji trzy startery umożliwią na przykład wystąpienie dwóch charakterystycznych pików, które będą sygnałem do przeprowadzenia dalszych badań. Opracowany test umożliwia identyfikację produktów zawierających zagrożone wyginieciem gatunki ssaków. Kolejne gatunki ssaków mogą być dodawane do testu przez zaprojektowanie specyficznych gatunkowo starterów, które umożliwią rozbudowanie opracowanego testu.

Coghlan M.L. i in. (2012) w badaniach identyfikacyjnych dotyczących zawartości składników pochodzenia zwierzęcego i roślinnego w mieszankach tradycyjnej medycyny azjatyckiej zastosowali wysoko przepustową technikę sekwencjonowania drugiej generacji metodą HTS (*deep sequencing via HTS – high-throughput sequencing*). Uzyskano ponad 49 000 amplitonów z rejonów 16S rybosomalnego RNA oraz rejonu pętli P plastydowego trnL dla 15 próbek pobranych z produktów tradycyjnej medycyny azjatyckiej występujących w postaci proszku, tabletek, kapsulek, woreczków żółciowych i zielonych herbatek. Porównanie uzyskanych sekwencji z sekwencjami referencyjnymi wykazało obecność 68 różnych gatunków roślin oraz kilku chronionych gatunków zwierząt, takich jak: niedźwiedź himalajski (*Ursus thibetanus*), Suhak (*Saiga tatarica*), ssaki z rodziny krętorogich, jeleniowatych oraz płazy z rodziny ropuchowatych. Autorzy rekomendują metodę wysoko przepustowego sekwencjonowania jako wydajną i efektywną dla monitoringu gatunkowego mieszanek produktów należących do tradycyjnej medycyny azjatyckiej [63].

Zalecenia ISFG dotyczące standaryzacji w kryminalistycznych badaniach DNA zwierzęcego

Szeroko prowadzone przez naukowców z całego świata badania w zakresie identyfikacji gatunkowej zwierząt należących do gatunków chronionych zagrożonych wyginieciem, które stanowią przedmiot nielegalnego handlu na szeroką skalę, wymagają wspólnych standardów. W przypadku badań DNA pochodzenia zwierzęcego niezbędne jest wypracowanie przez ekspertów kryminalistyki wykonujących ekspertyzy z zakresu tzw. *wildlife forensic* (kryminalistyki dzięki przyrodzie) ujednoliconych praktyk dotyczących tego typu badań. Standaryzacja metod badawczych i sposobów opiniowania badań zwierzęcego DNA jest wciąż szeroko poruszonym tematem na różnego rodzaju spotkaniach branżowych i konferencjach kryminalistycznych [24]. W 2012 roku w ramach Europejskiej Sieci Laboratoriów Kryminalistycznych (European Network of Forensic Science Institutes – ENFSI) powołano nową grupę roboczą zajmującą się kryminalistycznymi badaniami śladów pochodzących od zwierząt, roślin i gleby (Animal Plant and Soil Traces – APST). Grupa ta popiera cele i zadania w ramach działania sieci w zakresie prowadzonych badań różnego rodzaju śladów biologicznych nie pochodzących od człowieka. Działania APST stanowią rodzaj swoistej naukowej platformy służącej wymianie doświadczeń dotyczących morfologicznych i molekularnych aspektów identyfikacji śladów pochodzenia zwierzęcego, roślinnego i glebowego. Grupa działa na zasadzie forum dyskusyjnego skoncentrowanego na tematach związanych z walidacją metod badawczych z zakresu śladów biologicznych nie pochodzących od człowieka [64].

Budowle B. i in. [2005] opracowali pierwsze rekomendacje dotyczące identyfikacji zwierząt na podstawie badań DNA wykorzystywanych w kryminalistyce [65]. Autorzy artykułu odnoszą się przede wszystkim do konieczności wykonywania ekspertyz na podstawie minimalnych wytycznych, które zapewniłyby ujednolicone standardy wykonywania badań kryminalistycznych w zakresie oznaczania DNA zwierzęcego przez różnych usługodawców. Analogicznie do zaleceń dotyczących analizy ludzkiego DNA sformułowano podobne wytyczne w zakresie analiz DNA pochodzenia zwierzęcego. Odnoszą się one m.in. do konieczności rozdzielenia procesów badawczych „przed PCR” i „po PCR” oraz stosowania w badaniach kontroli pozytywnej z próby o znanym pochodzeniu. W zakresie analizy uzyskanych wyników wymagane są usystematyzowane kryteria interpretacji (dotyczące identyfikacji poszczególnych alleli, występowania artefaktów, mieszanin, a także kontaminacji). Jeśli porównanie uzyskanych profili DNA oznaczonych z materiału dowodowego i porównawczego nie wyklucza indywidualnego składnika jako pochodzącego od „dawcy”, w celu potwierdzenia dowodzenia należy stosować analizę statystyczną uzyskanych

wyników lub probabilistyczne podejście do wnioskowania. Wszystkie stosowane w laboratorium metody badań zwierzęcego DNA powinny być zwalidowane przed wykorzystaniem ich przy opiniowaniu. Zalecany jest udział w badaniach biegłości, potwierdzających jakość wykonywanych w laboratorium badań. Autorzy wymieniają badania mitochondrialnego DNA jako główne metody identyfikacji DNA zwierzęcego w przypadkach identyfikacji gatunkowej, przynależności osobnika do danej populacji, weryfikacji składników produktów pochodzenia zwierzęcego, identyfikacji włosów zwierzęcych na ubraniach czy też w przypadkach spraw związanych z kłusownictwem.

Zalecenia dotyczące wykorzystania DNA nie pochodzącego od człowieka (zwierzęcego) dla celów badań kryminalistycznych sformułowano na XXIII Kongresie Międzynarodowego Stowarzyszenia Genetyków Sądowych (International Society for Forensic Genetics – ISFG) odbywającym się w Buenos Aires. Opublikowane w 2011 roku rekomendacje sformułowane przez A. Linacre'a i in. dotyczą kolekcjonowania próbek zwierzęcych do badań, walidacji nowo wprowadzanych metod do rutynowego stosowania w laboratorium, projektowania starterów do identyfikacji DNA dla poszczególnych gatunków, określania współczynnika pokrewieństwa w badaniach, metod raportowania z badań, akredytacji laboratoriów prowadzących badania DNA nie pochodzącego od człowieka [66]. Poniżej opisano poszczególne rekomendacje autorów:

Zalecenie 1: W przypadku zbierania i badania próbek zwierzęcych należy stosować takie same procedury, jak w przypadku innych badań kryminalistycznych w celu zachowania integralności i identyfikowalności dowodów rzeczowych pochodzących od zwierząt.

Zalecenie 2: W badaniach walidacyjnych autentyczność próbek referencyjnych pobranych do badań od nieudomowionych gatunków zwierząt powinna być w miarę możliwości potwierdzona przez specjalne zaświadczenia wydane na przykład przez instytuty zoologiczne. W przypadku braku zaświadczenia potwierdzenia autentyczności gatunku należy dokonać przez sekwencjonowanie locus genu (cytb, COI) i porównanie go z dostępnymi sekwencjami w bazach zawierających zbiory genowych sekwencji nukleotydowych, na przykład w GenBank.

Zalecenie 3: Wybór loci/locus używanych w identyfikacji gatunkowej, takich jak: mitochondrialne geny – cytb, COI, region pętli D – musi mieć uzasadnienie oparte na zdolności do identyfikacji nieznanych gatunków zwierząt spośród tych, które są ze sobą blisko spokrewnione.

Zalecenie 4: Sekwencja nukleotydów oraz mapa lokalizacji starterów używane w testach gatunkowych muszą się odwoływać do wcześniej publikowanych prac.

Zalecenie 5: Dla każdego nowego zestawu starterów używanych w identyfikacji gatunkowej należy przeprowadzać badania wewnątrzgatunkowe oraz międzygatun-

kowe. Walidacja nowych testów powinna obejmować badania czułości, specyficzności, powtarzalności i badania mieszanin.

Zalecenie 6: Startery użyte do amplifikacji polimorficznego DNA w testach identyfikacyjnych powinny być przetestowane pod kątem sprawdzenia specyficzności i powtarzalności, a także opublikowane.

Zalecenie 7: Przy identyfikacji osobniczej z wykorzystaniem polimorficznych loci powinny być preferowane systemy oparte na tetrametrycznych STR-ach.

Zalecenie 8: Przy analizie loci STR niezbędna do dokładnego oznaczenia alleli jest drabina alleliczna. Podstawą sprawozdania wyników z badań powinna być liczba powtórzeń, a nie liczba par zasad.

Zalecenie 9: Przy testowaniu pochodzenia należy oszacować prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji w allelach STR. Ostateczne prawdopodobieństwo pojawienia się mutacji należy wziąć pod uwagę wówczas, gdy niezgodność dotyczy pojedynczego locus czy kilku loci i gdy pozostałe loci są zgodne.

Zalecenie 10: Należy oszacować częstość występowania alleli w danej populacji.

Zalecenie 11: Współczynnik pokrewieństwa (F_{ST} lub θ) powinien być oszacowany dla każdej populacji i stosowany we wszelkiego rodzaju obliczeniach. Rodzaj użytego współczynnika powinien być jasno określony, a uzasadnienie jego zastosowania ujawnione.

Zalecenie 12: Sprawozdania z przeprowadzonych badań powinny być wyczerpujące. Rekomendowane jest zastosowanie ilorazu wiarygodności uwzględniające więcej niż jedną hipotezę przy szacowaniu wagi dowodów.

Zalecenie 13: Przy rutynowo wykonywanych badaniach z zakresu analizy DNA zwierzęcego laboratorium powinno być akredytowane.

Podsumowanie

Wildlife forensic, kryminalistyka dzięki przyrodzie, to dziedzina, która szybko się rozwija m.in. dzięki postępowi technologicznemu, jaki dokonał się w zakresie badań DNA. Obecne molekularne metody badawcze umożliwiają uzyskanie odpowiedzi na większość pytań, jakie mogą być formułowane do eksperta kryminalistyki w postanowieniu. Wprowadzenie do rutynowego stosowania w laboratorium kryminalistycznym nowych technik identyfikacji DNA pochodzenia zwierzęcego powinno być jednak poprzedzone badaniami walidacyjnymi. Należy także pamiętać o zapewnieniu efektywnego prowadzenia badań na materiale pochodzenia zwierzęcego, co można osiągnąć przez:

- prowadzenie porównań międzylaboratoryjnych z prowadzonych badań,
- ciągłą wymianę informacji pomiędzy laboratoriami w zakresie nowo wprowadzanych metod badawczych,

- opracowywanie standardów jakości dla stosowanych technik analitycznych w zakresie identyfikacji gatunkowej i osobniczej zwierząt,
- stosowanie właściwych opracowań statystycznych przy szacowaniu wartości dowodowej śladów pochodzenia zwierzęcego,
- udostępnianie zbiorów kryminalistycznych próbek materiału referencyjnego (bądź też wyników analizy zawartych w bazach danych DNA),
- wymianę informacji zawartych w bazach danych sekwencji nukleotydowych różnych gatunków zwierząt pomiędzy państwami,
- wymianę informacji na temat prowadzonych spraw i stosowanych metod badawczych na spotkaniach naukowych i przez kontakty osobiste.

BIBLIOGRAFIA

1. Linacre A.: Application of mitochondrial DNA technologies in wildlife investigations – species identification. *Forensic Sci Rev* (2006); 18(1): 1–8.
2. Ogden R., Dawnay N., McEwig R.: Wildlife DNA forensics – bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Res* (2009); 9: 179–195.
3. Alacs E.A., Georges A., FitzSimmons N.N., Robertson J.: DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Sci Med Pathol* (2009); 3: 180–194.
4. Tobe S.S., Linacre A.: DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identifications. *Forensic Sci Med Pathol* (2010); 6: 195–206.
5. Miller Coyle H.: Nonhuman DNA Typing Theory and Casework Applications. CRC Press. International Forensic Science and Investigation Series. (2008); 1–225.
6. Linacre A. i wsp.: Forensic Science in Wildlife Investigations. International Forensic Science and Investigation Series. Boca Raton: CRC Press, (2009); 1–162.
7. Hoffman J.E., Wallace J.R., Espinoza E.O., Espinoza J.L., Trail P.W., Baker B.W.: The future of Wildlife Forensic Science. John Wiley and Sons, Ltd. (2012); 1–352.
8. Branicki W., Kupiec T., Pawłowski R. Validation of Cytochrome b Sequence Analysis as a Method of Species Identification. *J Forensic Sci.* Vol. 48, No. 1 (2003): 83–87.
9. Dawnay N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G.R., Thorpe R.S. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int.* 173 (2007): 1–6.
10. Frezal L., Leblois R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* 8 (2008): 727–736.
11. Kitpipit T., Tobe S.S., Kitchener A.C., Gill P., Linacre A. The development and validation of a single SNaP-shot multiplex for tiger species and subspecies identification – Implications for forensic purposes. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012): 250–257.
12. White N.E., Dawson R., Coghlan M.L., Tridico S.R., Mawson P.R., Haile J., Bunce M. Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian blac – cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.). *Forensic Sci. Int. Genet.* (2011), doi: 10.1016/j.fsigen.2011.10.003.
13. Kepel A., Kala B.: CITES w Polsce i Unii Europejskiej podręcznik dla praktyków, Poznań (2010). Polskie Towarzystwo Ochrony Przyrody „Salamandra”, 1–191.
14. McGarth M.: „Wildlife crime profound threat to nations, says report” BBC News, 12.12.2012.
15. Linacre A., Tobe S. S.: An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative Genetics* 2011, 2:2.
16. Informacje uzyskane na szkoleniu przeprowadzonym przez Reijngoud J., Eastmead S. z użytkowania Bazy Danych Produktów Tradycyjnej Medycyny Azjatyckiej CPES w ramach IX warsztatów dla koordynatorów ds. CITES z Policji i Służby Celnej, Kazimierz Dolny 24–27.10.2011.
17. WHO (2008): Traditional medicine, Fact sheet N°134: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/.
18. Romanowicz M., Podgórska Z.: Badanie zaopatrzenia rynku internetowego oraz targów i sklepów specjalistycznych na terenie Warszawy w Tradycyjną Medycynę Azjatycką oraz inne produkty zawierające części zwierząt i roślin chronionych Konwencją CITES, Warszawa (2010) WWF Polska, Światowy Fundusz na Rzecz Przyrody, 1–24.
19. Oficjalna strona Konwencji o Międzynarodowym Handlu Dzikimi Zwierzętami i Roślinami Gatunków Zagrożonych Wyginięciem: www.cites.org.
20. Dane statystyczne z systemu policyjnego TEMIDA, stan na 2011 rok.
21. Dane statystyczne opublikowane przez Izbę Celną na stronie internetowej <http://www.mf.gov.pl/sluzba-celna> (2011).
22. CITES Podręcznik do oznaczania gatunków – Żółwie. Environment Canada, WWF Polska (2006).
23. Moore J. E.: A key for identification of animal hairs. *J. Forensic Sci Soc.* (1988); 28 (5–6): 335–339.
24. Linacre A., Wilson – Wilde L., Johnson R. N.: Non – human DNA typing: Reasons, scope and new technologies. Materiały konferencyjne: Convicts to Criminalistics: Past, Present and Future. 21st International Symposium on the Forensic Sciences, 23–27 September 2012, Hobart Tasmania. Australian and New Zealand Forensic Science Society; Australian Federal Police, 351.
25. Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemlak T.S., Francis C.M.: Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol* (2004); 2(10): e312, 1657–1663.
26. Hebert P.D.N., Barret R.D.H.: Reply to the comment by L. Prendini on “Identifying spiders through DNA barcodes”. *Can. J. Zool.* (2005) Vol. 83, 505–506.

27. Roe A.D., Sperling F.A.H.: Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (2007), 325–345.
28. Dawney N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G.R., Thorpe R.S.: Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int.* 173 (2007), 1–6.
29. Frézal L., Leblois R.: Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8 (2008), 727–736.
30. Dalton D.L., Kotze A.: DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. *Forensic Sci. Int.* 207 (2011) e51–e54.
31. Heaton M.P., Harhay G.P., Bennett G.L., Stone R.T., Grosse W.M., Casas E.: Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm Genome* (2002); 13(5): 272–281.
32. La Neve F., Civera T., Mucci N., Bottero M.T.: Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Sci.* (2008); 80(2): 216–224.
33. Martinshon J.T., Ogden R.: FishPopTrace-Developing SNP-based population genetic assignment methods to investigate illegal fishing. *Forensic Sci Int Genet Sup.* (2009); 2(1): 294–296.
34. Schwenke P.L., Rhydderch J.G., Ford M.J., Marshall A.R., Park L.K.: Forensic identification of endangered Chiok Salomon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using a multilocus SNP assay. *Conservation Genetics* (2006); 7(6): 983–989.
35. Mirek Z., Bieniek W., Sztorc A.: Barkoding DNA – nowe narzędzie do opisu bioróżnorodności. *Wiadomości Botaniczne* (2007); 51 (3/4): 41–50.
36. Tobe S.S., Kitchener A., Linacre A.: Cytochrome b or cytochrome c oxidase submit I for mammalian species identification – an answer to the debate. *Forensic Sci Int Genet Sup.* 2009; 2(1): 306–307.
37. Balitzki – Korte B., Anslinger K., Bartsh C., Rolf B.: Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene. *Int J Legal Med* (2005); 119(5): 291–294.
38. Melton T., Holland C.: Routine forensic use of mitochondrial 12S ribosomal RNA gene for species identification. *J Forensic Sci* (2007); 52(6): 1305–1307.
39. Vences M., Thomas M., Meijden A.V.D., Chiari Y., Vieites D.R.: Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool* (2005); 2(5).
40. Imaizumi K., Akutsu T., Miyasaka S., Yoshino M.: Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *Int J Leg Med* (2007); 121(3): 184–191.
41. Mitani T., Akane A., Tokiyasu T., Yoshimura S., Okii Y., Yoshida M.: Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. *Leg Med (Tokyo)* (2009); 11(Suppl1): S449–S450.
42. Clifford S.L., Anthony N.M., Bawe – Johnson M., Abernethy K.A., Tutin C.E., White L.J., Bermejo M., Goldsmith M.L., McFarland K., Jeffrey K.J.: Mitochondrial DNA phylogeography of western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Molec Ecol* (2004); 13(6): 1551–1565.
43. Zhang W., Zhang Z., Shien F., Hou R., Lv X., Yue B.: Highly conserved D – loop-like nuclear mitochondrial sequences (Numts) in tiger (*Panthera tigris*). *J Genetics* (2006); 85(2): 107–116.
44. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., et al.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* (1981); 290 (5806): 457–465.
45. Parson W., Pegoraro K., Niederstätter, Föger M., Steinlechner M.: Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int Legal Med* (2000); 114: 23–28.
46. Prusak B., Grzybowski T., Gralak M., Grzybowski G.: Applying sequence analysis of mtDNA cytochrome b gene in order to identify biological specimens of humans and animals. *Medycyna Wet.* (2005). 61(2): 162–165.
47. Wan Q.H., Fang S.G.: Application of species – specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Sci Int* (2003); 131(1): 75–78.
48. Wetton J.H., Tsang C.S., Roney C.A., Spriggs A.C.: An extremely sensitive species – specific ARMs PCR test for the presence of tiger bone DNA. *Forensic Sci Int* (2004); 140 (1): 139–145.
49. Moore M.K., Bemss J.A., Rice S.M., Quattro J.M., Woodley C.M.: Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. *Conservation Genetics* (2003); 4 (1): 95–103.
50. Hsieh H.M., Huang L.H., Tsai L.C., Liu C.L., Kuo Y.C., Hsiao C.T., Linacre A., Lee J. C.: Species identification of *Kachuga tecta* using the cytochrome b gene. *J. Forensic Sci* (2006); 51(1): 52–56.
51. Rohilla M.S., Tiwari P.K.: Restriction fragment length polymorphisms among five species of Indian freshwater turtles. *J Appl. Genetics* (2008); 49(2): 167–182.
52. Meganathan P.R., Dubey B., Haque I.: Molecular identification of crocodile species using novel primers for forensic analysis. *Conservation genetics* (2009); 10(3): 767–770.
53. Hsieh H.M., Huang L.H., Tsai L.C., Tsai L.H., Kuo Y.C., Meng H.H., Linacre A., Lee J.C.-I.: Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. *J. Forensic Sci* (2003); 136(1-3): 1–11.
54. Lee J.C.-I., Hsieh H.M., Huang L.H., Kuo Y.C., Wu J.H., Chin S.C., Lee A.H., Linacre A., Tsai L.C.: Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene. *Int J Legal Med.* (2009); 123(2): 117–121.
55. Wozney K.M., Wilson P.J.: Real-time pcr detection and quantification of elephantid DNA: Species identification

for highly processed samples associated with the ivory trade. *Forensic Sci Int* (2012); 219(1–3):106–112.

56. Pepin L., McEwing R., Carvalho G.R., Ogden R.: A DNA – Based Approach for the Forensic Identification of Asiatic Black Bear (*Ursus thibetanus*) in a Traditional Asian Medicine. *J Forensic Sci* (2008); 53(6): 1358–1362.

57. Lee J.C.-I., Tsai L.C., Huang M.T., Jhuang J.A., Yao C.T., Chin S.C., Wang L.C., Linacre A., Hsieh H.M.: A novel strategy for avian species identification by cytochrome b gene. *Electrophoresis* (2008); 29: 2413–2418.

58. Wilde L.W., Norman J., Robertson J., Sarre S., Georges A.: Current issues in species identification for forensic science and the validity of using the cytochrome oxidase I (COI) gene. *Forensic Sci Med Pathol* (2010); 6:233–241.

59. Tobe S.S., Kitchener A., Linacre A.: Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification an answer to the debate. *Forensic Sci Int: Genetics Suppl Series* (2009); 2(1): 306–307.

60. Tobe S.S., Kitchener A.C., Linacre A.: Reconstructing mammalian phylogenies a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS ONE* (2010) [<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0014156>].

61. Wallace L.J., Boilard M.A.L., Eagle S.H.C., Spall J.L., Shokralla S., Hajibabei M.: DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of Natural Health Products. *Food Research International* 49 (2012) 446–452.

62. Tobe S.S., Linacre A.: A new assay for identifying endangered species in Traditional East Asian Medicine. *Forensic Sci. Int.: Genetic Supplement Series* 3 (2011) e232–e233.

63. Coghlan M.L., Haile J., Houston J., Murray D.C., White N.E., Moolhuijzen P., Bellgrad M.I., Bunce M.: Deep Sequencing of Plant and Animal DNA Contained within Traditional Chinese Medicines Reveals Legality Issues and Health Safety Concerns. *PLoS Genet.* 8(4) 2012: e10002657. doi:10.1371/journal.pgen.1002657

64. Oficjalna strona internetowa ENFSI, zakładka dotycząca grupy Animal, Plant and Soil Traces: <http://www.enfsi.eu/about-enfsi/structure/working-groups/animal-plant-and-soil-traces>

65. Budowle B., Garofano P., Hellman A., Ketchum M., Kanthaswamy S., Parson W., Haering W., Fain S., Broad T.: Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int. J. Legal Med.* (2005) 119: 295–302, doi: 10.1007/s00414-005-0545-9.

66. Linacre A., Gusmão L., Hecht W., Hellmann A.P., Mayr W.R., Parson W., Prinz M., Schneider P.M., Morling N.: ISFG: Recommendations regarding the use of non – human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Sci. Int.: Genet.* (2011); 5(5): 501–505.

Streszczenie

W artykule omówiono bieżące kierunki badań z dziedziny biologii kryminalistycznej tzw. *wildlife forensics*, kryminalistyki dzikiej przyrody, w ujęciu badań identyfikacyjnych zwierzęcego DNA gatunków zagrożonych wyginięciem. Przedstawiono zarys problematyki związanej z handlem zwierzętami należącymi do gatunków zagrożonych wyginięciem oraz przytoczono przepisy prawne obowiązujące w tym zakresie. Wymieniono rodzaje śladów i dowodów rzeczowych pochodzenia zwierzęcego, a także sposoby ich zabezpieczania. Pośród różnych rodzajów identyfikacji zwierząt CITES wyróżniono i przedstawiono główne metody genetycznej identyfikacji materiału pochodzenia zwierzęcego gatunków zagrożonych wyginięciem. Osiągnięcia w dziedzinie badań genetycznych z ostatnich dziesięciu lat wskazują na najczęstsze i najbardziej skuteczne zastosowanie w identyfikacji zwierzęcego DNA metod wykorzystujących polimorfizm mitochondrialnego DNA (barkoding DNA, analiza SNP). W przypadkach gdy ocena na podstawie morfologii okazu danego gatunku nie jest możliwa lub dałaby niewiarygodne wyniki badań, zastosowanie molekularnych metod identyfikacji gatunkowej może być bardzo pomocnym narzędziem. Na przykładzie badań przeprowadzonych na wysoko przetworzonych tkankach zwierzęcych wchodzących w skład mieszanek medykamentów tradycyjnej medycyny azjatyckiej przedstawiono rozwiązania umożliwiające identyfikację poszczególnych gatunków zwierząt objętych ochroną. Podsumowaniem artykułu są zalecenia ISFG dotyczące standaryzacji przeprowadzania kryminalistycznych badań DNA pochodzenia zwierzęcego.

Słowa kluczowe: kryminalistyka dzikiej przyrody, DNA pochodzenia zwierzęcego, identyfikacja gatunkowa, CITES, tradycyjna medycyna azjatycka

Summary:

The article discusses current research in the field of forensic biology – wildlife forensics in terms of identification of endangered species by DNA analysis. The author provides an overview of illegal trafficking in endangered animal species and relevant legislation. Types of traces and evidence of animal origin and methods of their preservation have been presented. The genetic ways of endangered species identification were shown amongst various methods of CITES identification. The recent decade of DNA research has demonstrated that the use of mitochondrial DNA (mtDNA barcoding, single nucleotide polymorphisms – SNPs) is the best and most effective method of animal DNA identification. In cases where morphological identification of species is not possible or fails to produce reliable results, the application of molecular methods of species identification can be quite helpful. The studies conducted on highly processed animal tissues which are used in traditional Asian medicine products provided solutions for the identification of protected species contained in mixtures. In a final part of the paper, the author presents the ISFG recommendations for standardization in the field of non-human (animal) forensic DNA investigations.

Keywords: wildlife forensics, non-human DNA, species identification, CITES, traditional Asian medicine