

Katarzyna Porycka

Wewnętrzna walidacja metody wykrywania ludzkiej α -amylazy ślinowej testem RSID-SalivaTM przeprowadzona w Laboratorium Kryminalistycznym Komendy Wojewódzkiej Policji w Olsztynie

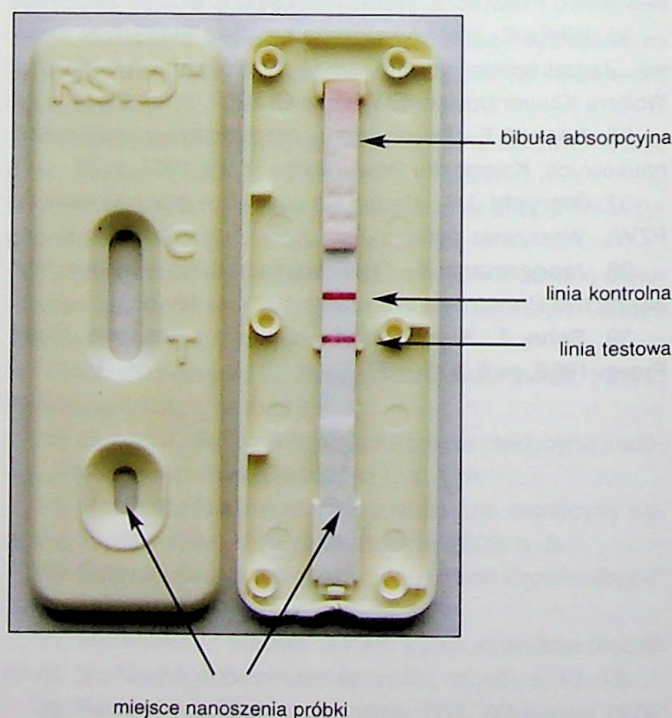
Wstęp

Standard walidacji w laboratoriach badawczych i pomiarowych podyktowany jest europejską normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005, w której Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (International Standards Organization) wskazuje na konieczność przeprowadzenia walidacji metod badawczych oraz oszacowania zakresu niepewności wyników badań. Zgodnie z punktem 5.4.5. normy każde laboratorium powinno przeprowadzić walidację metod nieznormalizowanych (opracowanych lub zmodyfikowanych w laboratorium), natomiast metody standardowe powinny być zatwierdzone do stosowania po uzyskaniu potwierdzenia, że laboratorium potrafi właściwie je stosować [1]. Wyróżnia się dwa rodzaje walidacji – rozwojową i wewnętrzną. Pierwsza z nich dotyczy wdrażania nowej technologii, opracowywania nowych metod badawczych, które do tej pory nie były znane i stosowane. Proces ten przeprowadza producent lub też zleca go organizacjom technicznym, instytucjom lub laboratoriom naukowym. Wyniki takiej walidacji muszą być opublikowane przez producenta i powszechnie dostępne. Walidacja wewnętrzna natomiast przeprowadzana jest przez indywidualne laboratoria, które zamierzają stosować daną metodę badawczą. Podczas tego procesu przeszkolony personel laboratorium weryfikuje metodę zwalidowaną przez producenta, sprawdza na ile procedura jest skuteczna w warunkach pracy konkretnego laboratorium, bada jej ograniczenia i dokumentuje swoje spostrzeżenia. Proces ten musi prowadzić do ustalenia parametrów zapewniających wiarygodność uzyskanych wyników oraz wytycznych do ich interpretacji, ma gwarantować, że metoda będzie stosowana za każdym razem w ten sam sposób [2]. Walidacja powinna być na tyle obszerna, na ile jest to konieczne dla przyjętych zastosowań. Jej zakres jest kompromisem między kosztami, ryzykiem i możliwościami technicznymi laboratorium [3, 4]. Do procesu tego należy zastosować różne rodzaje próbek, najlepiej takie, które są najczęściej spotykane.

Test RSID-SalivaTM

Od kilku lat na rynku światowym, a teraz również polskim, dostępny jest nowy test do wykrywania śliny RSID-SalivaTM firmy Independent Forensics. Jest to pierwszy test specyficzny dla ludzkiej α -amylazy ślinowej, który wykrywa obecność enzymu, a nie jego hydrolityczną aktywność [5]. Test ten ma postać kasetki, wewnątrz której umieszczony jest pasek bibuły chromatograficznej (ryc. 1).

RSID-SalivaTM zawiera dwa mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne dla ludzkiej α -amylazy. Jedno z nich związane jest z koloidalnym złotem i umieszczone na płytce powyżej okienka nanoszenia próbki, dru-



Ryc. 1. Otwarta kasetka testu RSID-SalivaTM
Fig. 1. Open cassette of the RSID-SalivaTM test kit
źródło (ryc. 1–13): autor

gie związane jest z membraną, w miejscu gdzie tworzy się pozytywna linia testowa. Linia kontrolna zawiera antymysie przeciwciała IgG. Na drugim końcu membrany przymocowana jest bibuła, która absorbuje przepływający płyn i zapobiega jego cofaniu się. W momencie, gdy próbka zawierająca ślinę ludzką trafia do okienka testu, tworzą się kompleksy antygen (α -amylaza) – przeciwciała związane z koloidalnym złotem. Próbkę i przeciwciała (związane w kompleksy i wolne) transportowane są dzięki sile przepływu płynu do membranowej części testu. Przeciwciała anty- α -amylazie umieszczone na membranie na wysokości paska testowego wychwytyują kompleksy α -amylaza – przeciwciała – złoto. Uzyskuje się pozytywny wynik testu jeżeli utworzy się czerwona linia (ryc. 2a). W przypadku gdy w próbce nie jest obecna ślina ludzka, nie powstają kompleksy antygen – przeciwciała – złoto, złoto nie kumuluje się na wysokości paska testowego i nie zachodzi barwna reakcja – uzyskuje się wynik negatywny (ryc. 2b). Antymysie przeciwciała IgG umieszczone na wysokości paska kontrolnego wiążą wszystkie przepły-

wające przez membranę mysie przeciwciała, tworząc czerwoną linię kontrolną, daje to pewność, że badany płyn pokonał całą długość membrany oraz że wszystkie elementy testu funkcjonują prawidłowo.

W skład opakowania testu RSID-Saliva™ wchodzi 25 testów kasetkowych, każdy pakowany osobno oraz dwa bufor – ekstrakcyjny (PBS) w ilości 25 ml i do chromatografii (TBS+) w ilości 10 ml. Zgodnie z zaleceniami producenta testy kasetkowe należy przechowywać w temperaturze pokojowej, oba bufor natomiast w temperaturze 2–8°C. Na opakowaniach testów jak i buforów umieszczone są numery seryjne partii testów oraz daty przydatności do użycia (ryc. 3).

Metoda wykrywania śliny ludzkiej za pomocą testu RSID-Saliva™ została zwalidowana przez producenta i może być z powodzeniem stosowana w badaniach kryminalistycznych [6]. Zgodnie z zaleceniami producenta ekspert dostosowuje pierwszy etap protokołu badawczego (pobranie próbki i jej ekstrakcja) do indywidualnego charakteru każdego śladu. I tak w przypadku śladów zabezpieczonych na wymazówkach do badań można pobierać wacik w całości, a ekstrakcję jego prowadzić w 200–300 μ l buforu PBS, ewentualnie odcinać tylko część wacika, a objętość buforu dobierać tak, by przykrywał próbkę w całości. W przypadku plam śliny na tkaninach i papierze producent sugeruje wycięcie fragmentu podłoża (o powierzchni około 20 mm²) wraz ze śladem i jego ekstrakcję w 100 μ l buforu. Badaniom próbek procesowych muszą towarzyszyć próbki kontrolne. Kontrolę pozytywną stanowi ludzka ślina w ilości 50 μ l naniesiona na sterylne wacik wymazówki, kontrolę negatywną – jałowa woda destylowana lub czysty bufor ekstrakcyjny. W przypadku próbek kontrolnych waciki wymazówek należy pobierać w całości, a ekstrakcję przeprowadzić w 1000 μ l PBS. Proces ekstrakcji powinien przebiegać w temperaturze pokojowej przez 1–2 godziny z kilkukrotnym, intensywnym worteksowaniem. W kolejnym etapie należy pobrać od 20 do 40 μ l ekstraktu (generalnie nie więcej niż 10%), przenieść do nowej probówki i uzupełnić go buforem TBS+ do objętości 100 μ l, następnie całość nanieść do okienka kasetki testu. Objętość 100 μ l uznana została za optymalną i nie należy jej przekraczać. Wynik testu należy odczytać po 10 minutach. Nie zleca się stosowania śliny bez jej rozcieńczenia w buforach dołączonych do zestawu ze względu na jej gęstą i włóknistą strukturę, która uniemożliwia właściwy przebieg reakcji [5, 6].

Cel badań

Celem badań było przeprowadzenie walidacji wewnętrznej w Laboratorium Kryminalistycznym Komendy Wojewódzkiej Policji w Olsztynie nowej metody identy-



Ryc. 2. Pozytywny wynik (a) i wynik negatywny (b) testu RSID-Saliva™, C – linia kontrolna, T – linia testowa

Fig. 2. Positive (a) and negative (b) result of the RSID-Saliva™ test kit, C – control line, T – test line



Rys. 3. Składniki opakowania testu RSID-Saliva™
Fig. 3. Components of the RSID-Saliva™ test kit

fikacji ludzkiej śliny za pomocą testu RSID-Saliva™ w zakresie: powtarzalności, specyficzności, selektywności, granic wykrywalności oraz wykorzystania w badaniu potencjalnych próbek procesowych.

Materiał i metoda

Badania przygotowano i przeprowadzono na podstawie metody zastosowanej przez Old i in. (2006) [7].

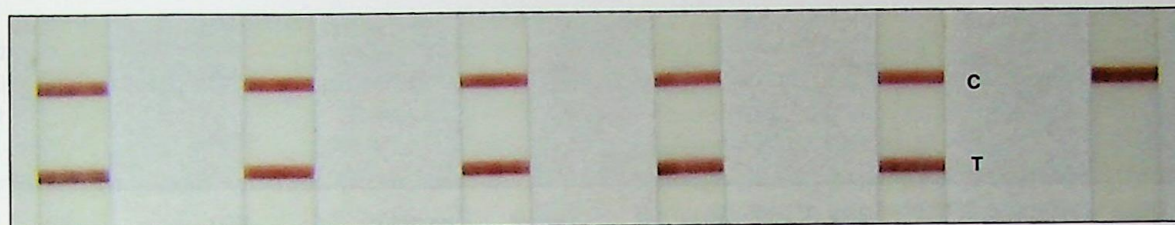
Do badań przygotowano próbki zawierające ludzką ślinę, krew, moczu, nasienie, wydzielinę z pochwy, mleko i fekalia. Sporządzono również próbki będące mieszaninami ludzkiej śliny z krwią, moczem i nasieniem w proporcji 1 : 1 oraz ludzkiej śliny z krwią w proporcji 1 : 5 oraz 1 : 10. Substancje naniesiono na sterylne waciki wymazówek, pozostawiając do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Dodatkowo do badań pobrano na wymazówki ślinę zwierząt domowych: psa, kota, konia, krowy, świni, świnki morskiej i szczura. W celu sprawdzenia, czy test RSID-Saliva™ nie identyfikuje β -amylazy, do badań pobrano fragment zielonego liścia trawy, który mechanicznie zmacerowano. Aby sprawdzić, czy za pomocą testu RSID-Saliva™ można ujawnić ślinę ludzką naniesioną na różne przedmioty, do badań przygotowano próbki, które pobrano z: bawełnianej tkaniny, niedopałków papierosów, gwintów plastikowych butelek, okolic otworów puszek aluminiowych i ludzkiej skóry. Na każde z podłoży naniesiona została ślina różnych osób. Na niedopałki, butelki i puszki materiał naniesiono w sposób wynikający ze zwyczajowego użytkowania tych przedmiotów, na skórze symulowano śla-

dy pocałunku, natomiast tkanina zawierała bezpośrednio naniesione plamy śliny. Do badań pobrano przez wycięcie fragmenty tkaniny o wymiarach około 25 mm² (5 x 5 mm) oraz o takich samych wymiarach bibułę stanowiącą zewnętrzną powierzchnię filtra niedopałków. Z pozostałych przedmiotów materiał biologiczny pobierano przez przetarcie sterylnymi wacikami wymazówek nasączonych jałową wodą destylowaną. Ekstrakcję próbek prowadzono w buforze ekstrakcyjnym (PBS) przez 1–2 godziny w temperaturze pokojowej. W tym czasie próbki kilkakrotnie, intensywnie worticowano. Następnie z każdej pobierano po 20 μ l supernatantu i przenoszono do nowych, sterylnych probówek Eppendorf, dodając jednocześnie po 80 μ l buforu do chromatografii (TBS+). Tak uzyskany roztwór w całości, tj. 100 μ l, nanoszono do okienka kasetki testu. Wyniki odczytywano po upływie 10 minut. Kontrole dodatnie stanowiła ślina ludzka, kontrole ujemne – jałowa woda destylowana, nanoszono je w ilości 50 μ l na sterylne waciki wymazówek.

Wyniki

Powtarzalność

Dla wszystkich próbek zawierających ślinę ludzką uzyskano pozytywne wyniki testu RSID-Saliva™. Nie stwierdzono różnic w intensywności barwy linii testowych. W przypadku kontroli ujemnej uzyskano negatywny wynik testu świadczący o braku w próbce ludzkiej α -amylazy ślinowej (ryc. 4).



Rys. 4. Wyniki powtarzalności testu RSID-Saliva™, K(-) – kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 4. Repeatability results of RSID-Saliva™ test kit, K(-) – negative control, C – control line, T – test line

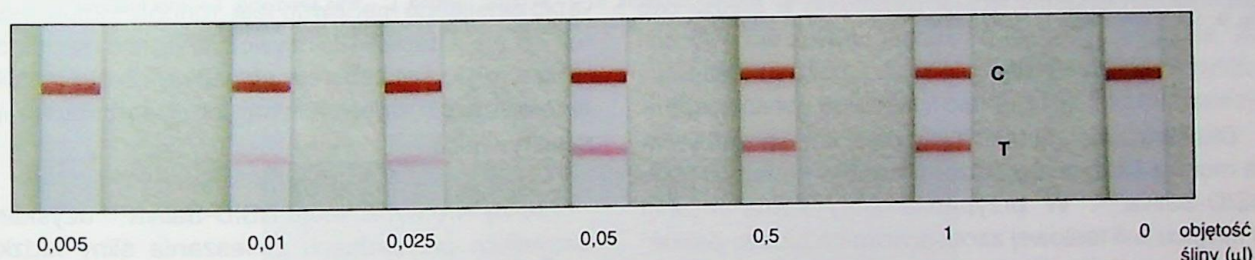
Granice wykrywalności

Dolną granicę wykrywalności ludzkiej α -amylazy ślinowej testem RSID-Saliva™ wyznaczono na poziomie 0,01 μ l śliny (ryc. 5). Nie wyznaczono natomiast górnej granicy wykrywalności, tj. nie uzyskano „efektu Ho-oka”. Największa zastosowana objętość śliny, tj. 30 μ l, nie spowodowała fałszywie ujemnego wyniku testu (ryc. 6).

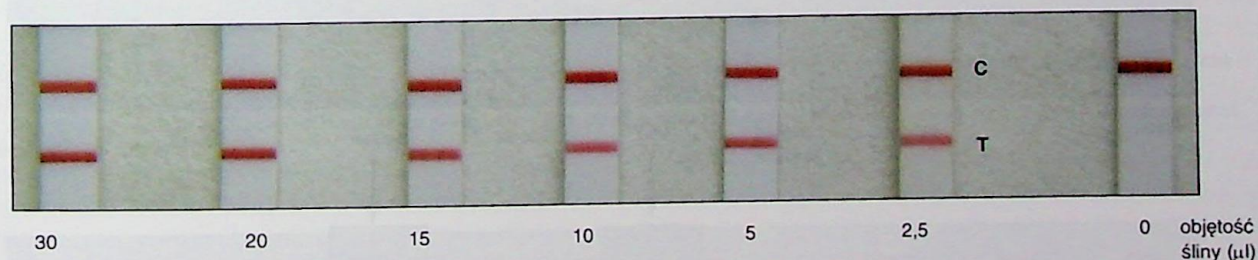
Specyficzność

Dla próbki zawierającej roślinną β -amylazę uzyskano negatywny wynik testu RSID-Saliva™ (ryc. 7).

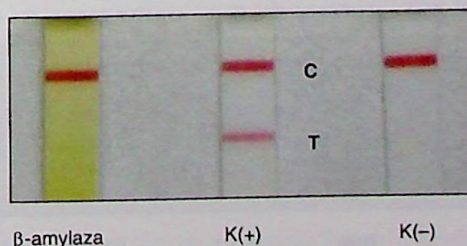
Negatywne wyniki testu stwierdzono również we wszystkich próbkach zawierających ludzkie: krew, moczu, nasienie, wydzielinę z pochwy i fekalia (ryc. 8). Wyniki pozytywne uzyskano natomiast w próbkach zawierających ludzkie mleko (ryc. 8 i 9).



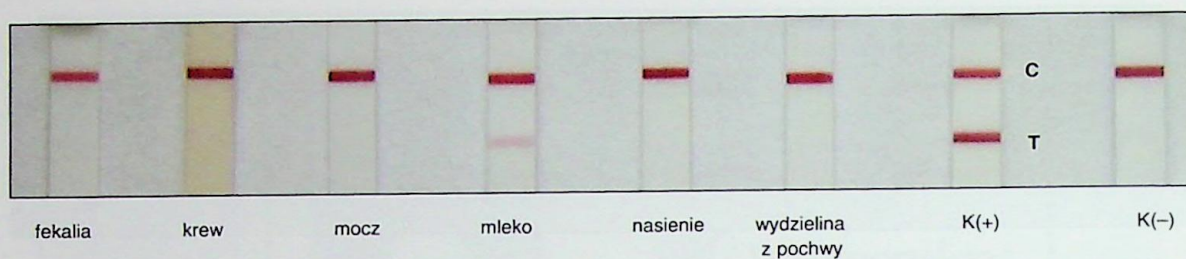
Rys. 5. Wyniki testu RSID-Saliva™ uzyskane przy wyznaczaniu dolnej granicy wykrywalności, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 5. Results of RSID-Saliva™ test kit obtained for lower border detection, C – control line, T – test line



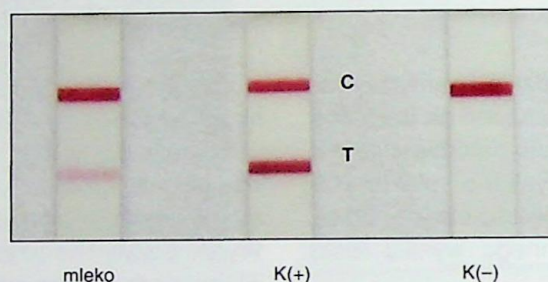
Rys. 6. Wyniki testu RSID-Saliva™ uzyskane przy wyznaczaniu górnej granicy wykrywalności, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 6. Results of RSID-Saliva™ test kit obtained for higher border detection, C – control line, T – test line



Ryc. 7. Wyniki specyficzności testu RSID-Saliva™, K(+) – kontrola dodatnia, K(-) – kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 7. Specificity results of RSID-Saliva™ test kit, K(+) – positive control, K(-) – negative control, C – control line, T – test line



Ryc. 8. Wyniki specyficzności testu RSID-Saliva™, K(+) – kontrola dodatnia, K(-) – kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 8. Specificity results of RSID-Saliva™ test kit, K(+) – positive control, K(-) – negative control, C – control line, T – test line

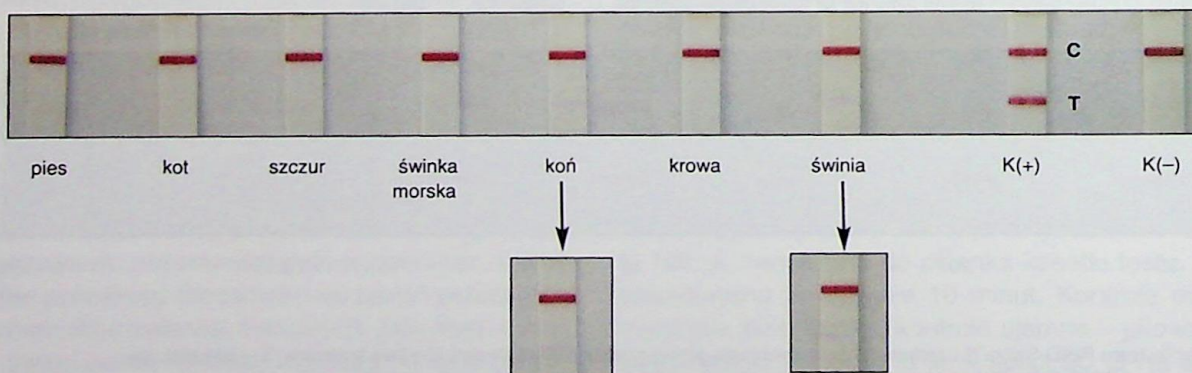


Rys. 9. Wyniki specyficzności testu RSID-Saliva™, K(+) – kontrola dodatnia, K(-) – kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 9. Specificity results of RSID-Saliva™ test kit, K(+) – positive control, K(-) – negative control, C – control line, T – test line

Dla śliny zwierząt takich jak: pies, kot, szczur, świnka morska i krowa stwierdzono negatywne wyniki testu RSID-Saliva™. W przypadku śliny konia i świni w miejscu linii testowej zaobserwowano bardzo delikatne, różowe zabarwienie – wynik ten określono jako „niejednoznaczny” (ryc. 10).

Selektywność

Pozytywne wyniki testu RSID-Saliva™ uzyskano we wszystkich przypadkach zmieszania śliny ludzkiej z: krwią, moczem i nasieniem w proporcji 1 : 1 (ryc. 11).



Ryc. 10. Wyniki specyficzności testu RSID-Saliva™, K(+) – kontrola dodatnia, K(-) – kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 10. Specificity results of RSID-Saliva™ test kit, K(+) – positive control, K(-) – negative control, C – control line, T – test line



Ryc. 11. Wyniki selektywności testu RSID-Saliva™, K(+) – kontrola dodatnia, K(-) – kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa
Fig. 11. Selectivity results of RSID-Saliva™ test kit, K(+) – positive control, K(-) – negative control, C – control line, T – test line

Pozytywne wyniki testu uzyskano również dla ludzkiej śliny zmieszanej z krwią w proporcji 1 : 5 i 1 : 10 (ryc. 12).

Badanie potencjalnych próbek procesowych

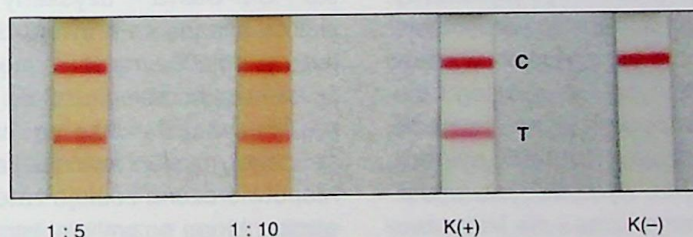
W przypadku wszystkich badanych próbek pobranych z bawełnianej tkaniny, niedopałków, gwintów plastikowych butelek, okolic otworów puszek aluminiowych i ludzkiej skóry uzyskano pozytywne wyniki testu RSID-Saliva™. Najmniejszą intensywność barwy linii testowych stwierdzono w próbkach pobranych z niedopałków i gwintów butelek plastikowych. Najbardziej intensywną barwę posiadały linie testowe próbek pobranych z tkaniny i ludzkiej skóry (ryc. 13).

Dyskusja

Walidacja metody jest niezwykle ważnym zadaniem związanym z procesem opracowywania procedury badawczej w laboratorium, jest dowodem spełnienia określonych kryteriów jakościowych. Sprowadza się do doświadczalnego sprawdzenia metody oraz oceny zakresu jej przydatności do prawidłowego rozwiązywania

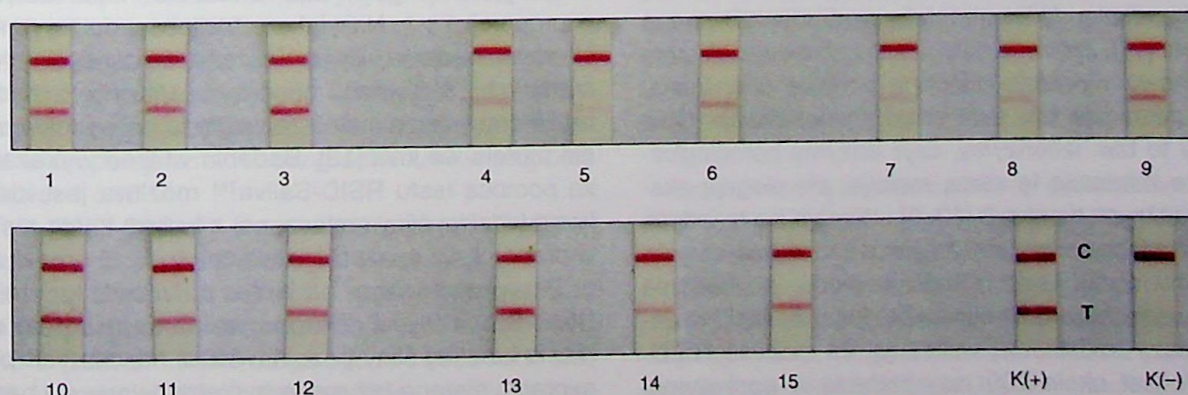
zleconego zadania. Świadczy o tym, że laboratorium panuje nad metodą i wydaje wiarygodne wyniki badań. Przeprowadzenie walidacji wewnętrznej umożliwia udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy metoda spełnia wymagania dotyczące jej zastosowania (wykrywa badany czynnik z odpowiednią precyzją), a co za tym idzie, czy dana metoda może być wykorzystana w rutynowej praktyce laboratoryjnej [2, 3, 4].

Walidacja metody identyfikacji śliny ludzkiej za pomocą testu RSID-Saliva™ przeprowadzona w LK KWP w Olsztynie wykazała, że test ten jest doskonałym narzędziem wspomagającym pracę ekspertów biologii. Badania przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych potwierdziły powtarzalność wyników uzyskiwanych tą metodą. Dolną granicę wykrywalności ludzkiej śliny wyznaczono na poziomie 0,01 µl, (wartość stu-krotnie niższa od tej, którą deklaruje producent testu), nie wyznaczono natomiast górnej granicy. Największa zastosowana objętość śliny, tzn. 30 µl, nie spowodowała wystąpienia tzw. „efektu Hooka”. Zjawisko to jest bardzo częste w przypadku testów immunochromatograficznych, nie zostało jednak do tej pory osiągnięte, jak informuje producent, przy stosowaniu się do prawidłowej (zalecanej) procedury badania [5]. Wysoką specy-



Ryc. 12. Wyniki selektywności testu RSID-Saliva™ dla śliny zmieszanej z krwią w proporcji 1 : 5 oraz 1 : 10, K(+) – kontrola dodatnia, K(-) – kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa

Fig. 12. Selectivity results of RSID-Saliva™ test kit for saliva mixed with blood in ratio 1 : 5 and 1 : 10, K(+) – positive control, K(-) – negative control, C – control line, T – test line



Rys. 13. Wyniki testu RSID-Saliva™ uzyskane dla potencjalnych próbek procesowych, 1–3 tkanina, 4–6 niedopałki, 7–9 butelki, 10–12 puszki, 13–15 skóra ludzka, K(+) kontrola dodatnia, K(-) kontrola ujemna, C – linia kontrolna, T – linia testowa

Fig. 13. Results of RSID-Saliva™ test kit obtained for potential case work samples, 1–3 fabric, 4–6 cigarette butts, 7–9 bottles, 10–12 cans, 13–15 human skin, K(+) – positive control, K(-) – negative control, C – control line, T – test line

ficzność metody potwierdzono, badając zmacerowaną tkankę roślinną (liść trawy), a także płyny, wydzieliny i wydaliny ludzkiego ciała. Stwierdzono, że test RSID-Saliva™ nie wykazuje dodatniej reakcji z β -amylazą pochodzenia roślinnego. Podobne badania opisywane w literaturze wskazują na negatywny wynik tego testu przy badaniu β -amylazy pochodzącej z homogenatów owoców i warzyw (jabłek, kukurydzy, marchwi, rzodkiewki, kabaczka) [8]. Prowadząc badania walidacyjne, uzyskano negatywne wyniki testu RSID-Saliva™ dla wszystkich badanych próbek ludzkiego moczu, krwi, fekalii, wydzieliny z pochwy i nasienia. Biorąc pod uwagę fakt, że praktycznie wszystkie płyny, wydaliny i wydzieliny ludzkiego ciała zawierają α -amylazę w bardzo niskich stężeniach, przynajmniej pięćdziesięciokrotnie mniejszych niż w ślinie, nie należy spodziewać się pozytywnych wyników testu, gdy badane substancje pochodzą ze zdrowego, prawidłowo funkcjonującego organizmu [9]. Niemniej jednak zjawiska takie jak zmiany hormonalne, przeżycia psychiczne, obecne lub przebyte stany chorobowe, a także dieta mogą wywołać niestandardowy stan fizjologiczny organizmu [10, 9]. Skutkiem tego mogą być zaburzenia gospodarki wodno-mineralnej organizmu, a co za tym idzie zmiany składu chemicznego produkowanych przez niego płynów, wydalin i wydzielin. W takich stanach fizjologicznych niektórzy badacze upatrują źródła pozytywnych wyników testu RSID-Saliva™ uzyskiwanych dla ludzkiego moczu i potu. Mimo że są to bardzo nieliczne przypadki, autorzy prac nie wykluczają również sytuacji, w której skład chemiczny płynu, wydzieliny lub wydaliny jest cechą indywidualną organizmu i nie jest powodowany żadnym stanem patologicznym [11]. W literaturze opisany jest przypadek, w którym dla fekalii pochodzących od niemowląt i dzieci w wieku od 4 do 24 miesięcy uzyskano pozytywny wynik testu RSID-Saliva™. Autorzy artykułu źródła takiego wyniku dopatrują się w obecności znikomych ilości amylazy trzustkowej w ludzkim kale, która mogłaby być identyfikowana przez test [11]. Zarówno amylaza trzustkowa, jak i amylaza ślinowa wykazują podobną budowę chemiczną, w 94% posiadają taki sam skład aminokwasów. Obie amylazy to tzw. izoenzymy, czyli enzymy homologiczne, które katalizują tę samą reakcję, ale ulegają ekspresji w różnych tkankach [12, 8]. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, aby amylaza trzustkowa dawała pozytywny wynik testu z tego względu, że badania przeprowadzone z zastosowaniem ludzkiej zliofilizowanej amylazy trzustkowej wskazują, że czułość RSID-Saliva™ jest około 200 razy słabsza w porównaniu z ludzką amylazą ślinową [8]. Badania własne potwierdziły pozytywny wynik testu RSID-Saliva™ dla ludzkiego mleka z piersi, który zgodnie z informacją producenta powinien być około 40 razy słabszy od wyników uży-

skiwanych dla śliny [5]. Wizualna ocena wykonana przez porównanie intensywności barwy linii testowych uzyskanych dla mleka i śliny wskazywała, że różnica ta wydaje się być przynajmniej o połowę mniejsza. Wynik taki potwierdzają również inne opublikowane badania [7]. Specyficzność testu RSID-Saliva™ w stosunku do ludzkiej α -amylazy ślinowej weryfikowano, badając również ślinę zwierząt domowych. Negatywny wynik testu uzyskano dla śliny: psa, kota, krowy, a także śliny szczura i świnki morskiej. Na świecie badania te prowadzone były na znacznie szerszą skalę. Specyficzność testu RSID-Saliva™ sprawdzano, stosując ślinę: różnych ras psów, kotów, królika, konia, krowy, świni, owcy, kozy, lamy, osła, jeża, oposa, świstaka, łasicy, mangusty, różnych gatunków małpiek, mewy, kameleona i węża. Dla śliny wszystkich wyżej wymienionych zwierząt uzyskano negatywne wyniki testu [7, 8, 11]. Podczas badań własnych „słabo pozytywne” wyniki testu, które można określić mianem niejednoznacznych, uzyskano dla śliny konia i świni. Weryfikując prawdopodobieństwo takich wyników wykluczono możliwość zanieczyszczenia próbek ludzką śliną podczas ich pobierania oraz badań laboratoryjnych. W literaturze opisywany i szeroko komentowany jest pozytywny wynik testu RSID-Saliva™ uzyskany dla śliny szczura [8]. Został on uznany za prawdopodobny z tego względu, że geny kodujące amylazę ślinową szczura, myszy, a także świni są homologiczne do genów kodujących amylazę ślinową człowieka, a skład chemiczny ludzkiej, szczurzej, mysiej i świńskiej amylazy jest podobny [11]. Niepotwierdzona zostaje zatem informacja producenta, według której pozytywny wynik testu daje wśród zwierząt wyłącznie ślina goryli [5]. Zarówno badania własne, jak i dane zawarte w literaturze potwierdzają wysoką selektywność testu RSID-Saliva™ [7]. Stosując tę metodę, można doskonale identyfikować ślinę ludzką w mieszaninie z ludzką krwią, moczem i nasieniem, w przypadku gdy oba składniki zmieszane są w proporcji 1 : 1. Największe trudności do tej pory nastręczało badanie śliny zmieszanej z intensywnymi plamami krwi. Aktywność amylazy w takich przypadkach może drastycznie maleć ze względu na wysokie stężenie protein we krwi [13]. Badania własne wykazały, że za pomocą testu RSID-Saliva™ możliwa jest identyfikacja ludzkiej śliny zmieszanej z ludzką krwią nie tylko w proporcji 1 : 1, ale też większej, tj. 1 : 5 oraz 1 : 10.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że test RSID-Saliva™ jest doskonałym narzędziem do ujawniania ludzkiej śliny pozostawionej na różnych przedmiotach, dlatego też może być stosowany do badania próbek procesowych. Stwierdzono nieznaczne różnice w intensywności barwy linii testowych uzyskanych dla próbek pobranych z tego samego rodzaju podłoża. Wynik taki tłumaczyć może fakt, iż zdolność do

wydzielania amylazy jest różna u różnych osób, a także u tej samej osoby może zmieniać się w czasie [9]. Najmniej intensywny kolor linii testowych świadczących o obecności ludzkiej α -amylazy uzyskano dla próbek pobranych z gwintów plastikowych butelek i filtrów niedopałków. W przypadku pozostałych próbek pobranych z bawełnianej tkaniny, puszek i ludzkiej skóry stwierdzono wyraźnie pozytywne wyniki testu. Różnice te mogą wynikać z indywidualnego dla każdej osoby sposobu „użytkowania” poszczególnych przedmiotów mającego wpływ na ilość śliny nanoszonej na poszczególne podłoża, a także charakteru samego podłoża. Potwierdzają to również informacje dostępne w literaturze. Za pomocą tego testu z powodzeniem identyfikowano ślinę ludzką pozostawioną na gwintach plastikowych i szklanych butelek, niedopałkach, puszkach aluminiowych, plastikowych kubkach, papierowych kopertach [7].

Podsumowanie i wnioski

- Metoda identyfikacji śliny ludzkiej za pomocą testu RSID-Saliva™ charakteryzuje się powtarzalnością wyników otrzymywanych w warunkach laboratoryjnych.
- Za pomocą testu RSID-Saliva™ możliwa jest identyfikacja śliny ludzkiej na poziomie 0,01 μ l, czyli znacznie niższym niż deklaruje to producent.
- Prawidłowe stosowanie procedury badania za pomocą testu RSID-Saliva™ wyklucza powstanie „efektu Hooka”.
- Metoda wykrywania ludzkiej śliny za pomocą testu RSID-Saliva™ jest wysoko specyficzna, test ten nie daje krzyżowej reakcji z ludzką krwią, nasieniem, moczem, wydzieliną z pochwy i fekaliami, z roślinną β -amylazą oraz ze śliną psa, kota, szczura, świnki morskiej i krowy. Słabo pozytywne wyniki daje ludzkie mleko, wyniki niejednoznaczne – ślina konia i świni.
- Metoda wykrywania ludzkiej śliny za pomocą testu RSID-Saliva™ jest wysoce selektywna, identyfikuje ludzką ślinę w mieszaninie z innymi płynami ciała w proporcji 1 : 1, w przypadku krwi w proporcji nawet 1 : 10.
- Test RSID-Saliva™ z powodzeniem może być stosowany do badania próbek procesowych.
- Bardzo uważnie i ostrożnie należy interpretować słabo pozytywne lub niejednoznaczne wyniki testu RSID-Saliva™, które mogą być spowodowane słabą „kondycją” śladu rzeczywiście pochodzącego z ludzkiej śliny, bądź wynikiem fałszywie pozytywnym, jaki daje, np. ludzkie mleko, ślina konia lub świni. W takich przypadkach należy potwierdzić wynik innymi dostępnymi badaniami.

BIBLIOGRAFIA

1. PN-EN ISO/IEC 17025 (2005), Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
2. Spólnicka M., Zbieć-Piekarska R.: Proces walidacji w kryminalistycznych badaniach profilowania DNA, „Problemy Kryminalistyki” 2008, 262, 5.
3. Gąsior R.: Wybrane aspekty walidacji metod analitycznych, „Wiadomości Zootechniczne” 2007, 3, 55.
4. Jaźwińska-Kuliś J.: Walidacja w diagnostyce laboratoryjnej, „Laboratorium” 2008, 12, 42.
5. Rapid Stain Identification of Human Saliva (RSID™) Technical Information Sheet 2008, Galantos Genetics and Independent Forensics.
6. Rapid Stain Identification of Human Saliva (RSID™) Provided Protocols 2008, Galantos Genetics and Independent Forensics.
7. Old J., Schweers B., Boonlayangoor P.W., Reich K.: Developmental Validation Studies of RSID-Saliva Lateran Flow Immunochromatographic Strip Test for the Forensic Detection of Saliva, „Independent Forensics” 2006, 1.
8. Pang B.C.M., Cheung B.K.K., Phil M.: Applicability of Two Commercially Available Kits for Forensic Identification of Saliva Stains, „Journal of Forensic Science” 2008, 5, 1117.
9. Pawłowski R.: Medyczo-sądowe badania śladów kryminalistycznych, Instytut Ekspertyz Sądowych, Kraków 1997.
10. Gutowski S.J., Henthorn P.L.: The Preliminary Evaluation of a Commercial Test Kit in the Identification of Saliva, „Journal of the Forensic Science Society” 1983, 23, 135.
11. Casey D.G., Price J.: The sensitivity and specificity of the RSID™-saliva kit for the detection of human salivary amylase in the Forensic Science Laboratory, Dublin, Ireland, „Forensic Science International” 2010, 194, 67.
12. Hames B.D., Hooper N.H.: Biochemia krótkie wykłady, PWN, Warszawa 2007.
13. Tsutsumi H., Higashide K., Mizuno Y., Tamaki K., Sumata Y.: Identification of saliva stains by determination of specific activity of amylase, „Forensic Science International” 1991, 50, 37.

Streszczenie

Celem badań było przeprowadzenie walidacji wewnętrznej w LK KWP w Olsztynie nowej metody identyfikacji ludzkiej śliny za pomocą testu RSID-Saliva™ w zakresie: powtarzalności, specyficzności, selektywności, granic wykrywalności oraz wykorzystania w badaniu potencjalnych próbek procesowych. Badania przygotowano i przeprowadzono na podstawie metody zastosowanej przez Old i in. (2006). Uzyskane wyniki wykazały, że test ten jest doskonałym narzędziem wspomagającym pracę ekspertów biologii. Za pomocą RSID-Saliva™ identyfikowano obecność ludzkiej α -amylazy ślinowej, a nie jej enzymatyczną aktywność. W praktyce laboratoryjnej bardzo uważnie i ostroż-

nie należy interpretować słabo pozytywne lub niejednoznaczne wyniki testu RSID-Saliva™, ponieważ mogą być spowodowane słabą „kondycją” śladu rzeczywiście pochodzącego z ludzkiej śliny lub też wynikiem fałszywie pozytywnym, jaki daje, np. ludzkie mleko, ślina konia lub świni. W takich przypadkach należy potwierdzić wynik innymi dostępnymi badaniami.

Słowa kluczowe: walidacja wewnętrzna, α -amylaza ślinowa, RSID-Saliva™.

Summary

The conducted tests aimed at carrying out internal validation of a new method of human saliva identification by means of RSID-Saliva™ test in scope of repeatability, specificity, selectivity, border detection and usage in potential case work samples. The validation took place in Forensic Laboratory of

Voivodeship Police in Olsztyn. The conducted tests were designed and carried out on the basis of the method applied by Old et al. (2006). The obtained results show that the test is a perfect tool facilitating work of biology experts. RSID-Saliva™ test allowed to identify the presence of human alpha-amylase, and not its enzymatic activity.

Laboratory casework demands careful and conscious interpretation of weak positive or ambiguous results of RSID-Saliva™, due to the fact that they may be caused by a poor „condition” of sample of human saliva or false positive result caused by human milk, horse or pig's saliva. In such cases, it is essential to support the tests by other available tests.

Keywords: internal validation, alpha-amylase, RSID-Saliva™.