



Proces walidacji w kryminalistycznych badaniach profilowania DNA

*Jakość nie jest dziełem przypadku,
zawsze jest wynikiem wysiłku człowieka*

John Ruskin

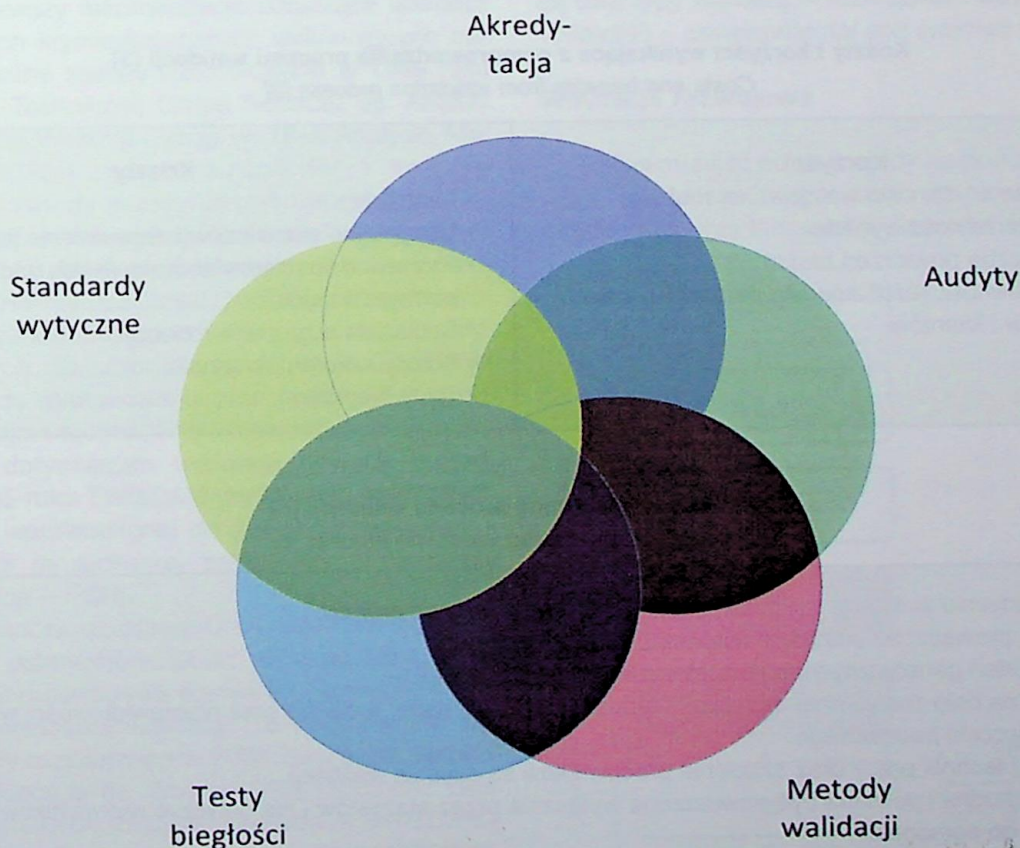
Wprowadzenie

Biorąc pod uwagę moc dowodową, jaką daje profilowanie DNA, niezmiernie ważnym staje się utrzymywanie wysokich standardów badań i stosowanie sprawdzonych zasad postępowania. W celu zapewnienia wysokiej jakości wyników badań laboratorium kryminalistyczne muszą:

- stosować standardy i wytyczne ustalone przez międzynarodowe stowarzyszenia,

- poddawać systematycznej kalibracji urządzenia badawcze,
- przeprowadzać walidację stosowanych metod, urządzeń i oprogramowań komputerowych,
- prowadzić dokumentację wyników,
- przystępować do testów biegłości,
- poddawać się audytom,
- uczestniczyć w procesie akredytacji.

Wymienione elementy przenikają się, gwarantując wielopoziomową kontrolę oraz optymalne funkcjonowanie laboratorium (ryc. 1) [1]. Celem tego opracowania jest przybliżenie zagadnienia walidacji w laboratoriach kryminalistycznych zajmujących się profilowaniem DNA.



Ryc. 1. Elementy kontroli laboratorium [1]
Fig. 1. Elements of control in laboratory [1]

Charakterystyka procesu walidacji

Termin walidacja pochodzi od łacińskiego słowa *validus*, czyli silny, mocny, skuteczny. W odniesieniu do procedur laboratoryjnych oznacza nadawanie im cech trafności, sprawdzenie ich wiarygodności, ustalenie celowości badania oraz określenie dokładności urządzenia pomiarowego. Proces ten weryfikuje samą metodę, dopasowuje ją do postawionych celów, identyfikuje krytyczne aspekty procedury, które powinny być uważnie kontrolowane [2]. Walidacja metod stosowanych w kryminalistycznych badaniach DNA odgrywa istotną rolę, dając gwarancję uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników.

Walidacja, jako nieodzowny etap procesu wdrożeniowego, gwarantuje optymalną jakość rezultatów pracy. Laboratoria muszą być pewne otrzymywanych wyników, jakości aparatury badawczej oraz oprogramowania. Walidacja wiąże się z określonymi kosztami, które są jednak niewspółmiernie mniejsze niż wynikające z niej korzyści. Poniesione nakłady finansowe obejmują w głównej mierze zakup niezbędnych do badań materiałów oraz prowadzenie szkoleń personelu (tab. 1) [3].

Niezaprzeczalną korzyścią walidacji jest fakt, że dzięki niej cała społeczność naukowa otrzymuje niezbędne informacje pozwalające zarówno na oszacowanie zdolności procedury do uzyskiwania wiarygodnych rezultatów, ustalenie warunków, w jakich będą one otrzymywane, jak również zdefiniowanie ograniczeń metody. Z problematyką walidacji wiąże się wiele utartych stereotypów (tab. 2) [6].

W celu zredukowania źródeł niepewności organizacje międzynarodowe dążą do ujednolicenia technik analitycznych, praktyk i metod laboratoryjnych. Opracowują także wytyczne i standardy dotyczące procedur walidacyjnych (tab. 3) [1].

Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (International Standards Organization) w normie ISO PN/EN 17025:2005 stwierdza, że laboratoria powinny przeprowadzać walidację metod badawczych oraz oszacować zakres niepewności wyników badań. Punkt 5.4.5. normy mówi, że 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. Norma ISO

Koszty i korzyści wynikające z przeprowadzania procesu walidacji [3]
Costs and benefits from validation process [3]

Korzyści	Koszty
• Zwiększenie wydajności walidowanej metody. • Duża powtarzalność wyników. • Mniejsza liczba powtórzeń badań. • Większa pewność rezultatów dla personelu, innych laboratoriów i klientów.	• Materiały. • Utrzymanie standardów i zapewnienie jakości. • Prowadzenie międzylaboratoryjnych badań porównawczych. • Spotkania w grupach roboczych. • Koszty szkoleń personelu. • Testy biegłości.

Tabela 1

Stereotypy dotyczące procesu walidacji [6]
Stereotypes concerning validation process [6]

• Do przeprowadzenia walidacji niezbędne są setki, a nawet tysiące próbek. • Walidacja jest prowadzona wszędzie tak samo. • Każdy etap badań genetycznych musi zostać zwalidowany oddzielnie. • Walidacja ma na celu znalezienie wszelkich niedoskonałości w danej technice oraz nieprawidłowości w sposobie użytkowania sprzętu badawczego. • Nauka metod i technik pracy oraz szkolenie pracowników są częścią walidacji. • Walidacja jest nudna i powinna być prowadzona wyłącznie przez stażystów i nie dotyczyć wykwalifikowanego, doświadczonego personelu. • Sporządzenie dokumentacji z przeprowadzonej walidacji jest trudne i długotrwałe. • Walidację sporządza się tylko raz i nie podlega ona zmianom.
--

Tabela 2

Tabela 3

Lista organizacji zajmujących się problematyką walidacji [1]
Organisations dealing with validation issues [1]

International Standards Organization (ISO)	http://www.iso.ch
AOAC International	http://www.aoas.org
Eurochem	http://www.eurochem.ul.pt
VAM (Valid Analytical Measurement)	http://vam.org.uk
CCQM (Comite Consultatif la Quantite de Matiere)	http://www.bipm.org/en/committees/cc/ccqm/
CITAC (Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry)	http://www.citac.cc
ASTM International (American Society for Testing and Materials)	http://www.astm.org
CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)	http://www.clsi.org
ANSI (American National Standards Institute)	http://www.ansi.org
ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation)	http://www.ilac.org
FDA (U.S. Food and Drug Administration)	http://www.fda.gov

PN/EN 17025:2005 nie określa sposobu, w jaki walidacja powinna zostać przeprowadzona, wskazuje tylko działania i narzędzia mogące jej służyć [13]. Dyrektywa ta nakłada obowiązek wykonywania walidacji, natomiast konkretne wytyczne co do sposobu przeprowadzania walidacji w laboratoriach kryminalistycznych, wykonujących badania DNA, zostały sformułowane w postaci wytycznych i standardów pracy.

Po raz pierwszy rekomendacje dotyczące walidacji w laboratoriach kryminalistycznych wykonujących badania genetyczne zostały sformułowane w 1989 roku w USA przez Techniczną Grupę Roboczą ds. Analizy DNA (Technical Working Group on DNA Analysis Methods – TWGDAM), utworzoną przez FBI, i dotyczyły one walidacji metody analizy długości fragmentów restrykcyjnych (*Restriction Fragment Length Polymorphisms – RFLP*). Punktem przełomowym był proces przeciwko Dianie Hernandez Casto, podczas którego zwrócono uwagę na jakość badań DNA w laboratoriach kryminalistycznych. Zainicjowało to działania TWGDAM prowadzące do wypracowania jednolitych wytycznych. Wraz z rozwojem technik DNA rozszerzano zakres rekomendacji dotyczących walidacji nowych metod. W 1991 i 1995 roku TWGDAM dostarczyło wytycznych dotyczących wprowadzonej do powszechnego stosowania reakcji łańcuchowej polimerazy (*Polimerase Chain Reaction – PCR*).

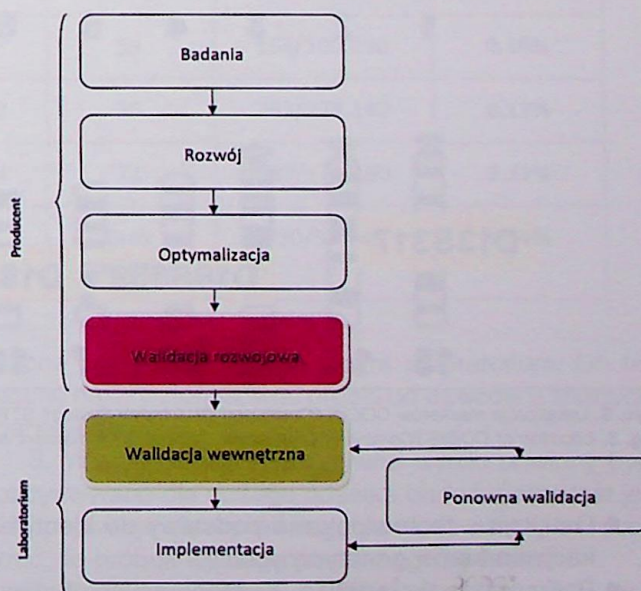
Rada Doradcza do spraw DNA (DNA Advisory Board – DAB), ustanowiona przez Kongres USA, w latach 1998–99 przedstawiła standardy określające sposób przeprowadzania walidacji. Te podstawowe wytyczne zostały rozszerzone w 2004 roku przez Naukową Grupę Roboczą ds. Analizy DNA (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods – SWGDAM), działającą przy FBI, i na tej podstawie stworzono obecnie obowiązujące wytyczne do przeprowadzenia walidacji [7].

Rodzaje walidacji

Walidacja jest procesem, w ramach którego procedura zostaje poddana ocenie celem określenia jej efektywności i wiarygodności dla analizy kryminalistycznej [9]. Proces ten jest nieodzownym elementem wdrażania nowej technologii. Aby wprowadzić lub zmodyfikować technologię analizy DNA w kryminalistyce, wymagane są dwa typy walidacji – rozwojowa i wewnętrzna (ang. *validation – developmental and internal*) (ryc. 2) [1].

Walidacja rozwojowa

Wprowadzając nowe metody na potrzeby typowania DNA, producenci, organizacje techniczne, instytucje akademickie czy laboratoria naukowe muszą przepro-



Ryc. 2. Proces wdrażania nowej technologii [1]
 Fig. 2. Process of implementation of new technology [1]

wadzić walidację rozwojową. W procesie tym konieczne jest ustalenie dokładności oraz powtarzalności takiej technologii. Ten typ walidacji obejmuje testowanie nowych markerów STR i ich zestawów, nowych par starterów oraz technologii oznaczania alleli. Każdy etap procesu musi być dokładnie udokumentowany [9], a wyniki tych prac opublikowane w branżowej literaturze. W procesie walidacji rozwojowej, zgodnie z rekomendacjami SWGDAM, powinny zawierać się wy-szczególnione poniżej elementy:

1. Charakterystyka markerów genetycznych, w tym:

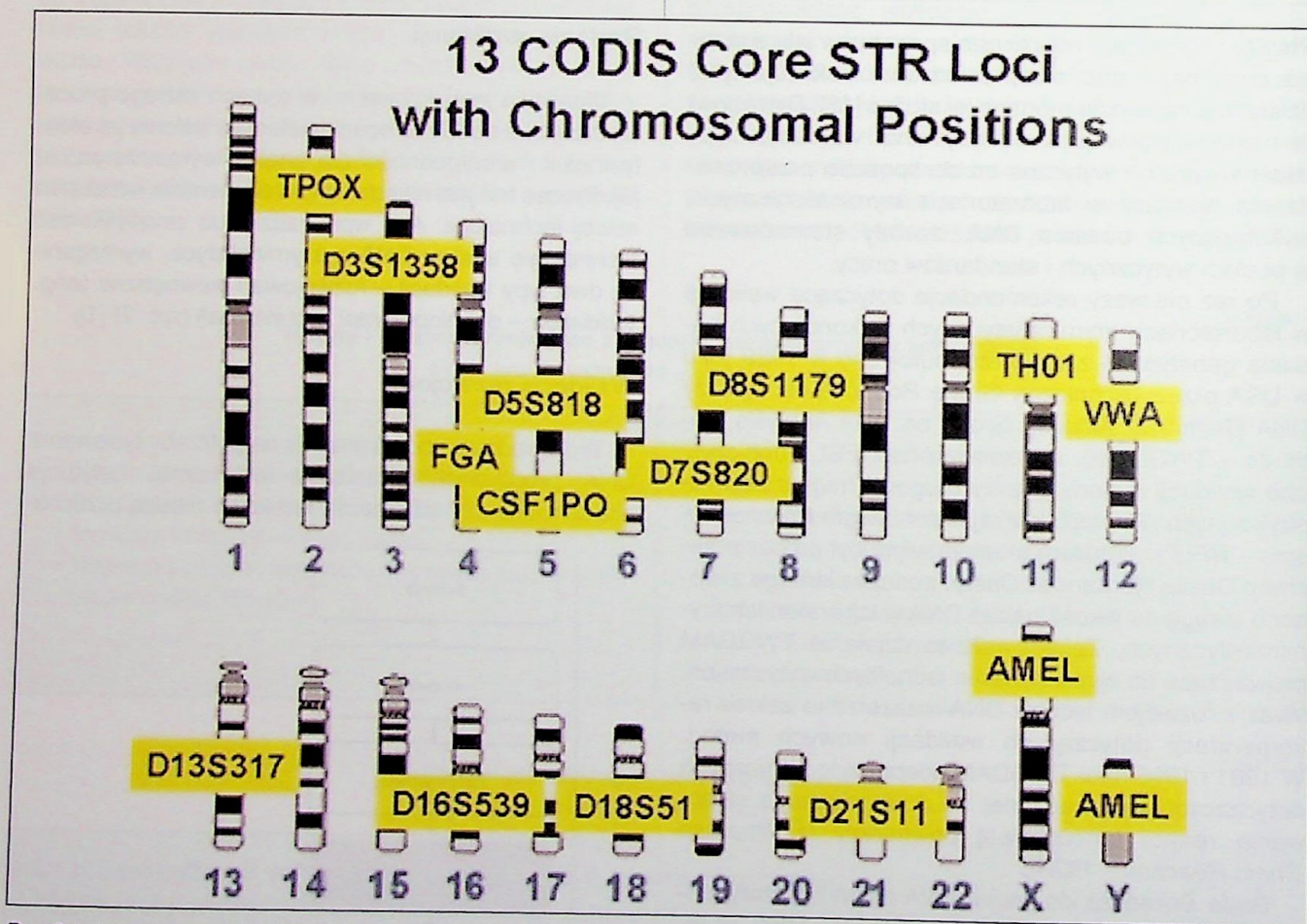
- Mapowanie – zlokalizowanie markerów genetycznych na chromosomie, podane przez Komitet Nomenklatury Organizacji Ludzki Genom (Nomenclature Committee of the Human Genome Organization – HGNC) (ryc. 3) [11].

- Mutacyjność – określenie częstości mutacji markerów DNA demonstrowane za pośrednictwem badań rodzinnych (tab. 4) [11].

2. Swoistość gatunkowa – badanie potencjalnej możliwości powiązania ludzkiego DNA w śladach z obcogatunkowym DNA. Należy określić możliwość wykrycia profili DNA z gatunków niebędących przedmiotem badań. Jednocześnie obecność niespecyficznych produktów amplifikacji gatunków niestanowiących przedmiotu badań nie musi eliminować markera z wykorzystania go do analizy DNA w kryminalistyce.

3. Badania czułości – należy określić zakres ilościowy DNA umożliwiający otrzymanie każdorazowo wiarygodnych rezultatów.

4. Stabilność – metoda powinna mieć określoną możliwość otrzymywania pozytywnych rezultatów



Ryc. 3. Lokalizacja markerów CODIS (Combined DNA Index System) STR na poszczególnych chromosomach
Fig. 3. Location of CODIS (Combined DNA Index System) STR markers on specific chromosomes

- Detekcja – technologiczne podstawy do identyfikacji markerów genetycznych.
- Polimorfizm – analiza występujących typów zmienności.

z profilowania DNA, pochodzącego ze śladów biologicznych, składowanych na różnych podłożach zależnych od środowiskowych oraz chemicznych czynników. W wielu przypadkach ocena efektów ich działania w nowych procedurach badawczych DNA w kryminali-

Tabela 4

Mutacyjność poszczególnych loci [11]
Mutation of specific loci

STR System	Mejoza matczyzna (%)	Mejoza ojcowska (%)	Liczba od obydwójga	Całkowita liczba mutacji	Mutacyjność
<u>CSF1PO</u>	95/304,307 (0.03)	982/643,118 (0.15)	410	1,487/947,425	0.16%
<u>FGA</u>	205/408,230 (0.05)	2,210/692,776 (0.32)	710	3,125/1,101,006	0.28%
<u>TH01</u>	31/327,172 (0.009)	41/452,382 (0.009)	28	100/779,554	0.01%
<u>TPOX</u>	18/400,061 (0.004)	54/457,420 (0.012)	28	100/857,481	0.01%
<u>VWA</u>	184/564,398 (0.03)	1,482/873,547 (0.17)	814	2,480/1,437,945	0.17%
<u>D3S1358</u>	60/405,452 (0.015)	713/558,836 (0.13)	379	1,152/964,288	0.12%
<u>D5S818</u>	111/451,736 (0.025)	763/655,603 (0.12)	385	1,259/1,107,339	0.11%
<u>D7S820</u>	59/440,562 (0.013)	745/644,743 (0.12)	285	1,089/1,085,305	0.10%
<u>D8S1179</u>	96/409,869 (0.02)	779/489,968 (0.16)	364	1,239/899,837	0.14%
<u>D13S317</u>	192/482,136 (0.04)	881/621,146 (0.14)	485	1,558/1,103,282	0.14%
<u>D16S539</u>	129/467,774 (0.03)	540/494,465 (0.11)	372	1,041/962,239	0.11%
<u>D18S51</u>	186/296,244 (0.06)	1,094/494,098 (0.22)	466	1,746/790,342	0.22%
<u>D21S11</u>	464/435,388 (0.11)	772/526,708 (0.15)	580	1,816/962,096	0.19%
<u>Penta D</u>	12/18,701 (0.06)	21/22,501 (0.09)	24	57/41,202	0.14%
<u>Penta E</u>	29/44,311 (0.065)	75/55,719 (0.135)	59	163/100,030	0.16%
<u>D2S1338</u>	15/72,830 (0.021)	157/152,310 (0.10)	90	262/225,140	0.12%
<u>D19S433</u>	38/70,001 (0.05)	78/103,489 (0.075)	71	187/173,490	0.11%
<u>SE33</u> (ACTBP2)	0/330 (<0.30)	330/51,610 (0.64)	Brak doniesień	330/51,940	0.64%

stycie nie jest wymagana. Jeżeli jednak w jakikolwiek sposób mogłyby one wpłynąć na proces analityczny, wówczas należy go oszacować przy użyciu znanych próbek, w celu określenia efektów, jakie wywarły czynniki środowiskowe i chemiczne na profilowanie DNA.

5. Powtarzalność – metoda powinna być oszacowana w laboratorium w celu zapewnienia zgodności rezultatów. Powtarzalność metody oznacza, że te same lub podobne wyniki badań powinny być otrzymywane za każdym razem, ilekroć badanie zostanie przeprowa-

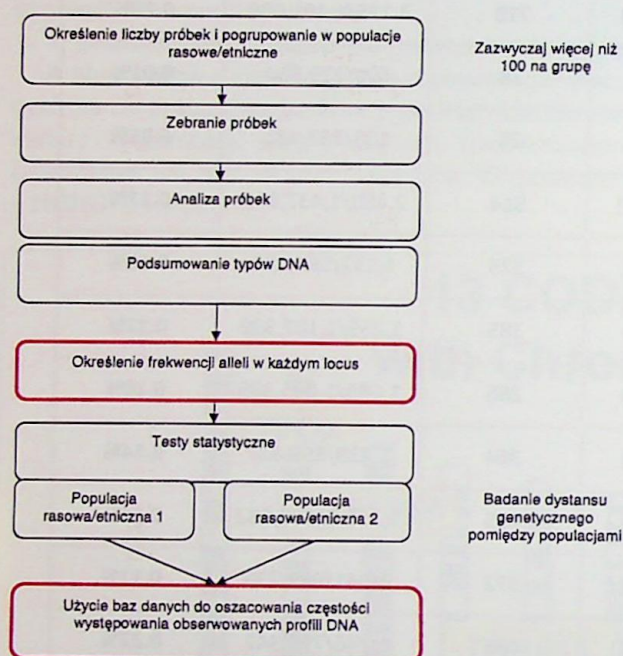
dzone w tym samym lub innym laboratorium. Do tej oceny należy zastosować próbki od dawców o znanych genotypach.

6. Wiarygodność – pozytywne wyniki powinny być otrzymywane dla dużego odsetka badań, natomiast jeżeli pojawiają się wyniki negatywne, to należy oszacować, ile próbek wymaga powtórnego badania.

7. Próbkę procesową – wiarygodność wyników powinna być oceniona przy użyciu próbek ze śladów, standardowo badanych w testujących je laboratoriach.

Ich ilość powinna być reprezentatywna. Gdy jest to możliwe, zgodność rezultatów uzyskanych z zastosowaniem walidowanej metody powinna być sprawdzona przez porównanie z wynikami poprzednio stosowanych procedur.

8. Badania populacyjne – należy je przeprowadzić w powiązanych grupach populacyjnych, trzymając się określonego schematu (ryc. 4) [1].



Ryc. 4. Schemat badań populacyjnych [1]
Fig. 4. Scheme of population study [1]

9. Badania mieszanin – powinna być określona zdolność otrzymywania wiarygodnych rezultatów z próbek mieszanin DNA.

10. Precyzja i dokładność – należy określić rzetelność procesu badawczego oraz zakres uzyskiwanych wyników badań.

11. Charakterystyka procedur opartych na reakcji PCR, w tym:

- Specyficzność i rzetelność – zakres badań powinien objąć określenie: profilu termicznego, stężenia starterów, stężenia chlorku magnezu, stężenia polimerazy DNA i innych składników reakcji.
- Potencjał – powinna zostać wyznaczona wydajność reakcji dla poszczególnych markerów. Istotne jest również scharakteryzowanie amplifikacji preferencyjnej oraz efektu stochastycznego, czyli funkcji losowej, występującej w procesie.
- Koamplifikacja – w przypadku amplifikacji więcej niż jednego locus należy określić możliwość wy-

stępowania niespecyficznych produktów amplifikacji (np. artefaktów).

- Sprawdzenie pozytywnych i negatywnych kontroli.
- Detekcja produktów PCR [4].

Dla każdego komercyjnego zestawu markerów STR, sprzętu i oprogramowania stosowanego w laboratoriach kryminalistycznych wykonujących analizy DNA zostały opracowane i przedstawione w fachowej literaturze wyniki badań walidacyjnych, które stanowią referencję do ich stosowania (tab. 5) [15].

Walidacja wewnętrzna

Walidacja wewnętrzna musi zostać przeprowadzona przez laboratorium, które zamierza stosować daną procedurę. Jest ona wewnętrznym testem niezawodności metody i bada jej ograniczenia. Podczas tego procesu weryfikuje się metodę, zwalidowaną przez producenta, co pozwala sprawdzić, na ile procedura jest skuteczna w warunkach pracy konkretnego laboratorium.

Badania wewnętrzne muszą być udokumentowane i prowadzić do ustalenia parametrów zapewniających jakość uzyskiwanych wyników oraz wytyczne do ich interpretacji. Walidacja powinna obejmować pewne stałe etapy (tab. 6) [10].

Przed wprowadzeniem procedury do laboratorium cały personel zaangażowany w proces analityczny powinien przejść odpowiednie przeszkolenie i testy kompetencji. Należy pamiętać, że wszelkie modyfikacje procedury wymagają ponownej walidacji, co powinno zostać odnotowane w stosownej dokumentacji [9].

Do procesu walidacji należy przystąpić, mając na uwadze poniższe założenia:

- Wyposażenie, które będzie wykorzystywane do badań walidacyjnych, powinno być skalibrowane i sprawne technicznie.
- Osoby zaangażowane w prace walidacyjne powinny mieć odpowiednie kompetencje.
- Warunki panujące w laboratorium muszą być stałe.
- Próbkki wykorzystywane do badań walidacyjnych muszą być znane [5].

Ważne jest, aby proces walidacji nie był sztucznie rozciągnięty w czasie.

Zgodnie z wytycznymi SWGDAM proces walidacji wewnętrznej powinien objąć następujące aspekty:

1. Próbkki wykorzystywane do badań walidacyjnych – badania powinny zostać przeprowadzone na grupie co najmniej 50 próbek. Próbkki te powinny pochodzić ze znanego źródła i stanowić reprezentatywną grupę dla codziennej pracy laboratorium. Jeżeli próbki zostały wcześniej oznaczone metodą porównywalną z proce-

Tabela 5

Lista referencji dla różnych badań walidacyjnych dotyczących użycia komercyjnych zestawów markerów STR, sprzętu i oprogramowania [15]

Reference list for various validation studies concerning the use of commercial STR marker kits, hardware and software [15]

Zestaw, badanie lub sprzęt	Referencje
Profiler Plus	Frank et al. (2001), LaFountain et al. (2001), Tomsey et al. (2001), Holt et al. (2002), Frageau et al. (2003), Bouse et al. (2003), Wallin et al. (2002), Pawlowski et al. (2002), Moretti et al. (2001)
COfiler	LaFountain et al. (2001), Tomsey et al. (2001), Holt et al. (2002), Bouse et al. (2003), Wallin et al. (2002), Moretti et al. (2001)
SGM Plus	Cotton et al. (2000)
AmpFISTR Blue	Wallin et al. (1998)
AmpFISTR Green I	Holt et al. (2002)
Profiler	Holt et al. (2002)
Profiler Plus ID	Leibelt et al. (2003)
Identyfiler	Collins et al. (2004)
SEfiler	Coticone et al. (2004)
PowerPlex 1.1	Micka et al. (1999), Tomsey et al. (2001), Greenspoon et al. (2001)
PowerPlex 1.1 + D16 primer	Nelson et al. (2002)
PowerPlex 2.1	Tomsey et al. (2001), Levedakou et al. (2002)
PowerPlex 16	Krenke et al. (2002), Tomsey et al. (2001)
PowerPlex 16 BIO	Greenspoon et al. (2001)
Y-PLEX 6	Sinha et al. (2003a)
Y-PLEX 5	Sinha et al. (2003b)
Y-PLEX 12	Shewale et al. (2004)
PowerPlex Y	Krenke et al. (2004)
genRES MPX-2	Junge et al. (2003)
Reduced volume PCR for Profiler Plus STR kit	Gaines et al. (2002), Frageau et al. (2003)
SGM	Sparkes et al. (1996a), Sparkes et al. (1996b), Kimpton et al. (1996)
TH01, vWA, F13A1, FES	Lygo et al. (1994), Clayton et al. (1995), Andersen et al. (1996)
CTT	Budowle et al. (1997)
D3S1358, D8S1179, D18S51	Potter (2003)
TH01, vWA, F13A1, FES, LPL	Pestoni et al. (1995)
STR sets	Crouse and Schumm (1995), Micka et al. (1996)
TH01	Van Oorschot et al. (1996), Wiegand et al. (1993)
D12S391	Junge et al. (1999)
Amelogenin	LaFountain et al. (1998)
Y-STR 4plex	Prinz et al. (2001)
Y-STR 10plex	Johnson et al. (2003)
19-locus Y-STR system	Daniels et al. (2004)
ABI 377	Frasier et al. (1996), Frageau et al. (1999)
ABI 310	Lazaruk et al. (1998), Isenberg et al. (1998), Moretti et al. (2001)
ABI 3100	Squeglia et al. (2003), Koumi et al. (2004)
ABI 3700	Gill et al. (2001), Koumi et al. (2004)
MegaBACE	Koumi et al. (2004)
DNA quant (RT-PCR Alu)	Nicklas and Buel (2003)
DNA quant (RT-PCR CSF)	Richard et al. (2003)
DNA quant (AluQuant)	Mandrekar et al. (2001)
BodeQuant	Fox et al. (2003)
Quantifiler	Applied Biosystems (2003)
Biomek 2000 with DNA IQ	Greenspoon et al. (2004)
mtDNA sequencing	Wilson et al. (1995), Holland and Parsons (1999)
mtDNA minisequencing	Morley et al. (1999)
TrueAllele software	Kadash et al. (2004)
CompareCallas software	Ryan et al. (2004)

Główne kroki walidacji wewnętrznej [10]
Main steps of internal validation [10]

Główne etapy walidacji wewnętrznej

- Zebranie niezbędnej literatury i zapoznanie się z techniką.
- Zgromadzenie niezbędnej aparatury i odczynników.
- Określenie zakresu badań walidacyjnych (zalecana liczba próbek – co najmniej 50).
- Zebranie próbek.
- Przeprowadzenie badań walidacyjnych.
- Sporządzenie stosownej dokumentacji.
- Podsumowanie badań i przekazanie do zatwierdzenia kierownikowi technicznemu.
- Stworzenie procedury badawczej z uwzględnieniem charakterystyki kontroli, standardów, kluczowych odczynników, aparatury, jak również wymaganych danych interpretacyjnych.
- Zaplanowanie niezbędnych szkoleń.
- Zaprojektowanie testów kwalifikacyjnych lub kompetencyjnych.

durą poddaną walidacji należy otrzymane wyniki ocenić względem siebie.

2. Powtarzalność i precyzja – laboratorium powinno mieć udokumentowane dane dotyczące powtarzalności wyników i rzetelności badanej procedury.

3. Kryteria dopasowania – laboratorium powinno przedstawić i udokumentować kryteria dopasowania oparte na danych doświadczalnych.

4. Czulość i badania stochastyczne – w przypadku amplifikacji metodą PCR badania powinny uwzględniać obserwację efektu stochastycznego i poziomu czulości.

5. Badania mieszanin – należy wyznaczyć kryteria analizy mieszanin.

6. Kontaminacja – laboratorium poprzez uwzględnienie między innymi wszelkiego rodzaju kontroli i określonych procedur stanowiących „dobrą praktykę laboratoryjną” powinno wykazać, że ryzyko kontaminacji zostało zminimalizowane.

7. Testy jakości – sprawdzeniu metody powinno towarzyszyć przeprowadzenie testów biegłości [4].

Dokumentacja

Rekomendacje odnośnie do procesu walidacji zalecają każdorazowo tworzenie dokumentacji obejmującej otrzymywane w trakcie walidacji wyniki, opis zastosowanej procedury i podsumowanie w postaci wniosków końcowych [13]. Jest to niezwykle istotne, aby technologia mogła być jednoznacznie i jasno zaimplementowana. Sporządzenie takiej dokumentacji gwarantuje, że metoda będzie stosowana za każdym razem w ten sam sposób, nawet po dłuższej przerwie w jej wykonywaniu. Brak dokumentacji mógłby spowodować brak spójności w kolejnym stosowaniu metody, przyczyniając się do zachwiania wiarygodności uzyskiwanych wy-

ników. Dokumentacja ogranicza możliwość wprowadzania przypadkowych zmian w metodzie, dlatego jest wymogiem bezwzględnym. Prawidłowa dokumentacja może zostać również wykorzystana w procesie audytu oraz do celów regulacyjnych [2, 8, 9].

Oprogramowanie służące do usprawnienia procesu walidacji

Ponieważ proces walidacji jest bardzo istotnym elementem w prawidłowym funkcjonowaniu każdego laboratorium, istotne znaczenie ma tworzenie oprogramowań usprawniających ten etap pracy.

Oprogramowanie jest projektowane w celu wprowadzenia zintegrowanych narzędzi do efektywnej oceny wykonania i zarządzania walidacją, której zwieńczeniem jest raport końcowy. Oprogramowania znacząco minimalizują czas walidacji i implementacji nowych technologii. Ich zastosowanie pozwala na bardziej efektywne i kompletne badania walidacyjne wprowadzanych metod. Programy tego typu wspomagają laboratorium w procesie walidacji poprzez zaplanowanie schematów doświadczeń [8].

Przykładem takiego typu oprogramowania służącego do walidacji jest VALID Software stworzony przez firmę Applied Biosystems. Program ten ma na celu wsparcie, uproszczenie i standaryzację badań walidacyjnych zgodnie z wytycznymi SWGDAM i DAB. Badania profilowania DNA złożone są z izolacji DNA, ilościowego oznaczenia DNA w ekstrakcie, reakcji amplifikacji PCR, elektroforezy i analizy wyników. Program pozwala na zintegrowanie każdego wymienionego etapu badań walidacyjnych, jak również umożliwia analizę statystyczną. Ponadto koordynuje cały proces poprzez:

- stworzenie wstępnego projektu doświadczenia,
- analizę danych walidacyjnych,

- dostarczenie narzędzi graficznych, które pomagają ustalić optymalne parametry,
- scharakteryzowanie niezbędnych wymagań do standaryzacji procedury oraz wskazówek interpretacyjnych,
- tworzenie arkuszy roboczych dla poszczególnych etapów badań [14].

Podsumowanie

Środowiska naukowe, eksperci kryminalistyki oraz wymiar sprawiedliwości widzą konieczność utrzymania bardzo wysokich standardów jakości pracy w laboratoriach kryminalistycznych i zmierzają do ich ujednolicenia na całym świecie. Wraz z rozwojem nowych technologii pojawiają się z całą pewnością nowe zestawy do profilowania DNA, wymagające walidacji i implementacji. Dlatego też prowadzone są dalsze prace nad standaryzacją walidacji, poprzez ustalenie minimalnego zestawu kryteriów dla oszacowania wiarygodności metody [15].

Stale rosnące wymagania co do jakości pracy laboratoriów zajmujących się profilowaniem DNA powodują, że walidacja staje się bardzo ważnym, wręcz nieodzownym elementem prawidłowego funkcjonowania każdej organizacji.

BIBLIOGRAFIA

1. **Butler J.M.:** (2006) Validation Workshop, HID University/ABI Future Trends in Forensic and Technology, www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm.
2. **EURACHEM Guide** (1998) The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
3. **Taylor J.K.:** (1987) Quality Assurance of Chemical Measurements. Lewis Publishers: Chelsea, MI.
4. **SWGDM** Revised Validation Guidelines (2004).
5. **Roper P. et al.:** (2001) Applications of Reference Materials in Analytical Chemistry. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
6. **Butler J.M.:** (2006) Debunking Some Urban Legends Surrounding Validation Within the Forensic DNA Community, Profiles in DNA (Promega Corporation), vol. 9 (2), pp 3–6.
7. **Presley L.A.:** (1999) The Evolution of Quality Standards for Forensic DNA Analyses in the United States, Profiles in DNA (Promega Corporation), vol. 3 (2), pp 10–11.
8. **Reeder D.J. et al.:** (2007) The Evolution of Forensic DNA Laboratories and The Challenges They Face, Forensic Magazine.
9. **DNA Advisory Board (DAB)** (1998) Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories.
10. **Ragsdale R.:** (FDLE) (2005) Validation Workshop.
11. **American Association of Blood Banks (AABB)** 2003 Annual Report.
12. **13 CODIS Core STR Loci with Chromosomal Positions.** National Institute of Standards and Technology, www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/images/codis.jpg.
13. **PN-EN ISO/IEC 17025** (2005) Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
14. **Product bulletin Human Identification, VALID™ Software v1.0, Validation Workflow. Automated™.**
15. **Butler J.M. et al.:** (2004) Can the Validation Process in Forensic DNA Typing Be Standardized?, 15th International Symposium on Human Identification (October 6, 2004).

Streszczenie

Walidacja jest nieodzownym elementem pracy każdego laboratorium. Proces ten powinien być przeprowadzony według jednolitych wskazówek. W przypadku laboratoriów kryminalistycznych wykonujących profilowanie DNA podstawą do przeprowadzenia walidacji są wytyczne Naukowej Grupy Roboczej ds. Analizy DNA (SWGDM) oraz standardy Rady Doradczej do spraw DNA (DAB). Zgodnie z tymi dokumentami wdrożenie nowej metody obejmuje dwa typy walidacji – rozwojową, przeprowadzaną przez producenta, i wewnętrzną, wykonywaną przez każde laboratorium implementujące nową technologię. Obecnie dostępne są komercyjne programy komputerowe wspomagające proces walidacji, poprzez zaplanowanie schematu doświadczeń i sporządzenie niezbędnej dokumentacji.

Słowa kluczowe: profilowanie DNA, walidacja, system jakości

Summary

Validation is an indispensable element of every laboratory daily work. The process should be performed in accordance with uniform procedures. In case of forensic DNA profiling laboratories the validation procedure is based on the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) guidelines, as well as the DNA Advisory Board (DAB) standards. According to these documents implementation of a new method undergoes two types of validation – developmental, carried out by a manufacturer and internal, carried out by every laboratory implementing a new technology. At present commercial software supporting validation execution by assisting proficiency planning processes and documentation preparation is available.

Keywords: DNA profiling, validation, Quality System