

Streszczenie

Obecne przemiany społeczno-gospodarcze i towarzyszące im zróżnicowane, często skrajne zachowania ludzi w stosunku do zwierząt, a przy tym coraz wyższy poziom świadomości sprawców czynów karalnych oraz roszczeniowości społeczeństwa w aspekcie ochrony zwierząt, wymagają od biegłego lekarza weterynarii stosowania coraz bardziej zaawansowanych, precyzyjnych i wiarygodnych narzędzi wykrywania prawdy materialnej. Dlatego też zasadnym jest skupienie uwagi nad aspektem metodycznym opiniowania sądowo-weterynaryjnego.

Celem pracy było wykazanie na przykładzie pośmiertnej diagnostyki obrażeń postrzałowych, użyteczności nowoczesnych technik obrazowania radiologicznego oraz opracowanie procedur identyfikacji genetycznej zwierząt, na potrzeby opiniowania sądowo-weterynaryjnego. W przypadku badań molekularnych, realizacja założonego celu obejmowała zaprojektowanie panelu markerów mikrosatelitarnych do identyfikacji osobniczej i ustalania pokrewieństwa norek amerykańskich (*Neovison vison*) oraz weryfikację metod umożliwiających identyfikację gatunkową psa (*Canis lupus familiaris*) na podstawie szczątków poddanych działaniu wysokiej temperatury.

Badania dotyczące wykorzystania technik radiologicznych w sądowo-weterynaryjnej diagnostyce obrażeń postrzałowych przeprowadzono na grupie 13 psów domowych, które z uwagi na wskazanie stanu klinicznego poddano zabiegowi eutanazji, a zwłoki przekazano jako materiał naukowo-dydaktyczny. Wstępnym etapem eksperymentu było ostrzeliwanie doświadczalnej powierzchni, tj. głowy oraz klatki piersiowej psa domowego, z różnych odległości i przy użyciu różnego rodzaju amunicji. Następnie wykonano sekcję sądowo-weterynaryjną, poprzedzoną pośmiertnym badaniem RTG i TK. Obserwacje na każdym etapie nekropsji konfrontowano na bieżąco z wynikami badań obrazowych.

Opracowanie panelu STR do identyfikacji osobniczej norek amerykańskich rozpoczęto od pozyskania krwi oraz tkanek miękkich od zwierząt hodowlanych i wolno żyjących (łącznie 80 osobników). Z pobranych prób izolowano DNA, a następnie prowadzono jego amplifikację metodą multiplex-PCR, którą uprzednio poddano optymalizacji. Powielone z zastosowaniem 13 par starterów fragmenty DNA analizowano w programie GeneMapper software v 3.5. Z kolei, przy użyciu programu Cervus 3.0.3. oraz Powerstats v. 12 określono wskaźniki polimorfizmu badanych markerów.

Badania poświęcone metodom identyfikacji zdegradowanych termicznie szczątków zwierzęcych przeprowadzono na kościach i zębach pobranych podczas sekcji zwłok psów. Materiał badawczy spalano w piecu laboratoryjnym w temperaturze 400°C przez 5, 10, 15, 30,

45 i 60 minut. Izolację DNA przeprowadzono zgodnie z czterema różnymi protokołami, obejmującymi 3 komercyjne zestawy, tj: PrepFiler[®] Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems), QIAamp[®] DNA Investigator Kit (Qiagen) i Syngen DNA Mini Kit (Syngen) oraz klasyczną metodę organiczną. Efektywność tych metod porównano oceniając ilość wyizolowanego DNA za pomocą Real-Time PCR oraz jego czystość przy użyciu spektrofotometru NanoDrop[™]. Każdy izolat poddano także reakcji PCR ze starterami zaprojektowanymi do amplifikacji fragmentów DNA mitochondrialnego psa. Skuteczność identyfikacji gatunkowej oceniono poprzez sekwencjonowanie.

Analiza wyników nekropsji, poszerzonej o uprzednio wykonane badania obrazowe, pozwoliła stwierdzić, iż nowoczesne metody obrazowania radiologicznego wykazują istotną przydatność w opiniowaniu sądowo-weterynaryjnym, wykonywanym na potrzeby prowadzonych postępowań przez właściwe organy procesowe. Stosowane jako uzupełnienie klasycznej - makroskopowej sekcji zwłok, zwiększają możliwości pośmiertnej diagnostyki obrażeń postrzałowych. Szczególną rolę odgrywa tomografia komputerowa. TK oprócz tego, że dostarcza szeregu istotnych danych wpływających na wnioski końcowe oględzin, a tym samym treść opinii lekarsko-weterynaryjnej, to stanowi również prostą i obiektywną metodę dokumentowania obserwacji sekcyjnych. W ten sposób techniki obrazowania radiologicznego zwiększają wartość merytoryczną opinii sądowo-weterynaryjnej.

W wyniku przeprowadzonych badań genetycznych opracowano panel mikrosatelitarny złożony z 13 polimorficznych *loci* STR, mogący stanowić przydatne narzędzie w praktyce sądowo-weterynaryjnej, w sprawach cywilnych, czy też karnych, których rozstrzygnięcie wymaga ustalenia pokrewieństwa zwierząt z gatunku *Neovison vison*, bądź przeprowadzenia identyfikacji osobniczej w oparciu o DNA osobników żywych, martwych, śladów biologicznych, czy produktów przemysłu futrzarskiego. Skupiając się natomiast na metodach identyfikacji gatunkowej w aspekcie zdegradowanych termicznie szczątków psa wykazano wysoką użyteczność komercyjnego zestawu QIAamp[®] DNA Investigator Kit (Qiagen) do izolacji materiału genetycznego. Stwierdzono także, iż w przypadku daleko posuniętej degradacji termicznej szczątków zwierzęcych, większą przydatność do określania przynależności gatunkowej wykazują kości, aniżeli zęby. Odpowiednie przygotowanie materiału kostnego oraz zastosowanie właściwej metody izolacji, pozwala na wiarygodną identyfikację przy użyciu sekwencjonowania i analizy bioinformatycznej.

Wskazać w tym miejscu należy, iż schemat badań radiologicznych oraz genetycznych, stanowiących główną tezę niniejszej rozprawy doktorskiej, wykonanych eksperymentalnie na określonym gatunku zwierząt, w sposób prosty może być zastosowany u innych gatunków.

Podniesiony fakt, istotnie poszerza spektrum wykorzystania przeprowadzonych badań na potrzeby opiniowania sądowo-weterynaryjnego, czyniąc je tym samym bardziej użytecznymi naukowo.

Słowa kluczowe: opiniowanie sądowo-weterynaryjne, RTG, TK, obrażenia postrzałowe, identyfikacja osobnicza, multiplex PCR, metody izolacji DNA, zdegradowane termicznie kości i zęby, identyfikacja gatunkowa