

ADLI TOKSİKOLOJİ LABORATUVAR REHBERİ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ
2. KAPSAM
3. TANIMLAR
4. LABORATUVAR GÜVENLİĞİ
 - 4.1. Laboratuvar-içi Güvenlik
 - 4.2. Ekipman Güvenliği
5. PERSONEL
 - 5.1. Laboratuvar Yöneticisi/Koordinatörü
 - 5.2. Laboratuvar Sorumlusu
 - 5.3. Teknik Personel
 - 5.4. Örnek Alma Personeli
6. ANALİZ ÖNCESİ (PRE-ANALİTİK) AŞAMA
 - 6.1. Numune Alınması
 - 6.2. Numunelerin Taşınması ve Teslim Alınması
7. ANALİTİK AŞAMA
 - 7.1. Ön Tarama Aşaması
 - 7.2. Doğrulama Aşaması
 - 7.3. Kalibrasyon ve Validasyon
8. ANALİZ SONRASI (POST-ANALİTİK) AŞAMA
 - 8.1. Kayıtların Kontrolü
 - 8.2. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi
 - 8.3. Sonuçların Yorumlanması ve Raporlama
 - 8.4. Arşivleme ve Kayıtların Saklanması
 - 8.5. Analiz Rapor Terminolojisi
9. KALİTE KONTROL
 - 9.1. Standart Operasyon Prosedürleri
 - 9.2. Kalite Güvence

ADLI TOKSİKOLOJİ LABORATUVAR REHBERİ

1. GİRİŞ

Adli ve Klinik Toksikoloji Derneği (AKTOD) tarafından hazırlanan bu rehber, ülkemizde adli amaçlı analiz yapan (ölümlerin medikolegal yönünden incelenmesi, trafik, iş yeri, denetimli serbestlik, cinsel şiddet suçları vb. adli olgularda) laboratuvarlarda işleyişle ilgili uyulması gereken yasal düzenlemeleri ve uygulamaları göstermeyi amaçlamıştır. Adli toksikoloji laboratuvarlarında olması gereken asgari koşullar için önerileri içeren bu rehber, ülkemizde adli amaçlı analizler yapan laboratuvarların işleyişlerine katkı sağlamayı hedeflemektedir. Adli Toksikoloji Laboratuvarları'nda çalışan deneyimli, konusunda uzman kişiler tarafından hazırlanan bu rehberin uluslararası mevcut uygulamalarla eşgüdümlü olması hedeflenmiştir. Dünya'da bu alanda çalışan laboratuvarlara yol gösterici olan Adli Toksikologlar Derneği (Society of Forensic Toxicologists,SOFT), Uluslararası Adli Toksikologlar Derneği (The International Association of Forensic Toxicologists, TIAFT), Toksikoloji ve Adli Kimya Derneği (Society of Toxicological and Forensic Chemistry, GTFCH) gibi ilgili derneklere ait rehberler değerlendirilerek hazırlanmıştır.

Bu rehberin amacı, ülkemizdeki Adli Toksikoloji Laboratuvarları'nda asgari çalışma ölçütlerini, sürecin emniyet & gözetim zinciri içerisinde yapılmasını, doğru sonuç elde edilmesini, verilerin değerlendirilerek doğru olarak yorumlanmasını ve yasal düzenlemelere uygun olarak raporlanması süreçlerinde ülkemiz için ortak kalite standartlarını sağlamaktır. Adli toksikoloji laboratuvarlarının TS EN ISO/IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar standardının şartlarını karşılayarak en kısa süreçte akredite olması uygundur.

2. KAPSAM

Adli Toksikoloji yasa ve adalet alanında somut ve nesnel sonuçları olan ve yargının kararında en önemli yol gösterici bulguları sağlayan bir bilim dalıdır. Toksikoloji disiplini altında kanun ve adalet için uygulanma alanı olarak tanımlanan bu alan, Postmortem Adli Toksikoloji, İnsan Davranış Adli Toksikolojisi ve Adli

Amaçlı İlaç/Madde Testi olarak tanımlanan üç alt ana alandan oluşur. Bu rehber Adli Toksikolojide tanımlanmış bu üç ana alt alanını kapsamaktadır.

3. TANIMLAR

Postmortem Toksikoloji: Ölüme neden olabilecek ana madde ve/veya metabolitlerinin insan vücut sıvı ve dokularındaki varlığı veya yokluğu, varsa miktar tayini ile ölüm nedeninin açıklanması ile ilgilenen adli toksikolojinin bir alt alanıdır.

İnsan Davranış Adli Toksikolojisi: Uygun biyolojik materyallerde ana madde ve/veya metabolitlerinin varlığının veya yokluğunun tayini, varsa miktar tayini ile insan davranışına (kişinin ilgili performansına) etkisinin değerlendirildiği adli toksikoloji alt alanıdır.

Adli Amaçlı Madde Testi: İşyeri, askeriye, denetimli serbestlik gibi kurumlardaki ilgili kişilerin yasaklı/kontrole tabii maddelerin ve/veya metabolitlerinin biyolojik materyallerde analizi ile madde kullanımının adli olarak değerlendirmesini kapsamaktadır.

Emniyet & Gözetim Zinciri: Her bir numunenin bütünlüğünü, tanımlanmasını ve emniyetini açıklayan bu süreç; numunenin alımı anından itibaren saklanması, taşınmasını, idaresinin takibini ve teslimini içeren bir işlemdir. Bu sürecin her aşamasının, yazılı olarak belgelendirilerek sonucu etkileyebilecek her türlü girişim için güvenliğin sağlanması uygulanır.

Eşik Değer: Bir numunede bir maddenin pozitif veya negatif olduğunu saptamak için kullanılan derişim

Negatif Sonuç: Maddenin numunede hiç olmadığını ya da maddenin derişiminin eşik değerinin altında olduğunu gösteren sonuç

Pozitif Sonuç: Maddenin numunede kesin olarak eşik değer veya üzerinde olduğunu gösteren sonuç

Kalibratör: Analitin farklı derişimlerde hazırlanmış çözeltisi.

Kontrol: Referans materyal ile hazırlanmış çözelti

Olgu: Biyolojik materyalin alındığı birey

Numune: Olgudan alınan biyolojik materyaller

Örnek: Olgunun biyolojik materyalinden alınan pay

Referans Materyal: Yüksek derecede saf madde

Sertifikalı Referans Materyal (CRM veya SRM): Belli bir yöntem ile belli bir güven aralığında belirsizliği tam olarak verilerek sertifikalandırılmış referans materyal

Standart: Saflığı ve derişimi bilinen referans materyal ya da bilinen derişimde referans materyali bilinen çözeltilerdir.

Standart Operasyon Prosedürü (SOP): Biyolojik materyalin analizi ile ilgili yapılan işlemin detaylı bilgilerin tamamını kapsayan doküman

Çapraz Reaksiyon: Antijen-antikor bağlanması ile birbirine benzeyen yapılar arasındaki birleşme sonucu oluşan reaksiyon

Şahit Numune: Biyolojik materyalin gerektiğinde analizi yapılmak üzere ayrılan ve saklanan yedek kısmı

Kontrol Tabi Maddeler: Ticareti ve kullanımı T.C. ilgili hukuki düzenlemeleri belirlenmiş maddeler

Tarama Testi: Negatif örnekleri elimine etmek için kullanılan test sistemi

Doğrulama Analizi: Tarama testinden sonra metabolit ya da ana maddenin varlığını, nitelik ve nicelik olarak farklı bir teknik ve/veya yöntemle doğruluğunu sağlamak için kullanılan analitik bir işlem

Belirtme (Tespit) Alt Sınırı (LOD): Bir analitik prosedürün belirtme alt sınırı, bir numunedeki analitin tespit edilebilen ancak mutlak kesin bir değer olarak nicelleştirilemeyen en düşük miktardır. Tipik olarak sinyal / gürültü (S/N) oranının 3 katıdır.

Saptama (Tayin) Alt Sınırı (LOQ): Uygulanan test koşulları altında, kabul edilebilir hassasiyet (tekrarlanabilirlik) ve doğrulukla tayin edilebilen en düşük analit derişimidir. Tipik olarak sinyal / gürültü (S/N) oranının 10 katıdır.

İç (Internal) Standart: Analizi yapılan maddeye kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından benzeyen, matriksin içinde kendiliğinden bulunmayan standart madde.

4. LABORATUVAR GÜVENLİĞİ

4.1. Laboratuvar-içi Güvenlik

Yetkisiz kişilerin laboratuvar bölümlerine erişimi engellenmelidir. Yetkisiz kişiler laboratuvarı ancak yanlarında yetkili bir personel ile ziyaret edebilirler. Laboratuvarda güvenli alanlara kimin girip çıktığını kayıt eden bir sistem bulunmalıdır. Laboratuvarda güvenli alanlara girme yetkisi olan tüm personelin kayıtları bulunmalıdır. Bu liste düzenli olarak yenilenmeli ve güncellenmelidir.

Laboratuvar alanı her bir maddenin nitel ve nicel tayinini yapabilecek yeterli laboratuvar ekipmanını içerecek kadar uygun alana sahip olmalıdır. Numunelerin ve analitik amaçlı kullanılan kimyasalların uygun saklanması ve yetkisiz erişimlerden korunması için güvenliği sağlanmış olmalıdır.

4.2. Ekipman Güvenliği

Laboratuvarda kullanılan ekipmanlar, çalışır şekilde tutulmalı (tümüyle fonksiyonel), düzenli bakımları yapılmalı ve kalibre edilmelidir. Üretici kullanım yönergeleri takip edilmelidir. Kullanım ve bakım ile ilgili kayıt defterleri tutulması tavsiye edilir. Laboratuvar güvenlik ekipmanı yönetmeliklere göre bulundurulmalı ve düzenli kontrol edilmelidir. Laboratuvar için güvenlik kuralları ile ilgili yönergeler düzenli uygulanmalı ve belgelendirilmelidir.

5. PERSONEL

Adli toksikoloji laboratuvarında uygun niteliklere sahip konusunda eğitilmiş, deneyimli, etik ve ahlak kurallarına uyan personeller çalışmalıdır. Laboratuvarda çalışan tüm personel gizlilik ve güvenlik konusunda bilgilendirilmelidir. Laboratuvarda kişilerin buldukları pozisyondaki yetkinliklerini gösteren kayıtlar tutulmalıdır. Personel dosyasında yeterliliğini ve iş deneyimini, şu anki görevi ile ilgili eğitim kayıtlarını gösteren özgeçmişini bulunmalıdır. Tüm laboratuvar personeli laboratuvar güvenliği ile ilgili eğitim almış olmalı ve mevcut kurallara uymalıdır. Kilit roller, nitelikler ve sorumluluklar aşağıda tanımlanmıştır.

5.1. Laboratuvar Yöneticisi/Koordinatörü

Adli toksikoloji laboratuvar yöneticisi/koordinatörü; organizasyonel, eğitimsel, yönetsel alanda becerilere sahip, aşağıda belirtilen, uygun eğitim ve deneyime sahip kişi olmalıdır.

- a) Tıbbi Farmakoloji, Adli Toksikoloji ve ilgili adli bilimler alanında eğitimi olan, en az 3 yıl adli laboratuvarında çalışma deneyimine sahip, organizasyon becerisi yüksek, yönetici ve idarecilik konusunda sorumluluk alabilecek kişiler tarafından yönetilir.
- b) Alternatif olarak Sağlık ve Fen Bilimlerinin ilgili alanlarından mezun, en az 7 yıl adli laboratuvarında çalışma deneyimine sahip, organizasyon becerisi yüksek, yönetici ve idarecilik konusunda sorumluluk alabilecek kişiler tarafından yönetilir.

Bu yöneticilerin eğitim ve deneyimleri, Adli ve Klinik Toksikoloji Derneği (AKTOD) tarafından yetkilendirilmiş kişiler tarafından değerlendirilmelidir. Tanımlanan sorumluluklar;

- Laboratuvar yöneticisi; adli toksikoloji alanı ile ilgili araştırma, eğitim programlarına katılım ve bu alanda yayın yapılmasının yanında mahkemelerde şahitlik gibi kanıtlayıcı süreçleri içeren eğitim ve düzenlemelerin belgelendirilmesini yapmalıdır.
- Laboratuvar yöneticisi laboratuvar personelinin gerekli eğitim ve desteği almasından sorumlu olmalıdır.
- Laboratuvar yöneticisi laboratuvar personelinin performanslarını takip ederek, niteliklerinin belirlenmesinden sorumlu olmalıdır. Bu eğitim ve deneyimler kayıt altına alınmalıdır.
- Laboratuvar yöneticisi laboratuvar personelinin takip ettiği süreci, kılavuzları güncellemek ve geliştirmekle sorumlu olmalıdır.
- Laboratuvar yöneticisi yeni analitik yöntemleri valide etmek için sistem geliştirebilmeli, kalite kontrol programının sürekliliği için tüm test sonuçlarının uygun çalışıldığından ve raporlandığından emin olmalıdır.
- Laboratuvarında, kontrole tabi maddeler ile analiz yapıldığı adalet işleyişi

kapsamında hizmet verildiği için, yöneticiler, çalışan personelin etik ve ahlaki standartlara uygunluğu konusunda emin olmalıdır.

- Preanalitik, analitik ve postanalitik süreçleri bütün olarak adli toksikoloji açısından değerlendirebilmelidir.

5.2. Laboratuvar Sorumlusu

Adli toksikoloji laboratuvar sorumlusu yönetsel ve analitik süreçte yeterli eğitim ve deneyimi olan kişidir.

- Fen, mühendislik, sağlık bilimlerinin bölümlerinden mezun olup adli toksikoloji laboratuvarında tam zamanlı olarak en az 3 yıl çalışma deneyimi olmalıdır.
- Adli toksikoloji alanında yüksek lisans eğitimi alanlar için; adli toksikoloji laboratuvarında tam zamanlı olarak en az 2 yıl çalışma deneyimi olmalıdır.
- Adli toksikoloji alanında doktora eğitimi alanlar için; adli toksikoloji laboratuvarında tam zamanlı olarak en az 1 yıl çalışma deneyimi olmalıdır.

5.3. Teknik Personel

Laboratuvar içi analizleri gerçekleştirebilmeli, uygulanan tüm süreç ve yöntemlere ait eğitimi ve/veya en az 2 yıl Adli Toksikoloji Laboratuvarında veya en az 3 yıl analitik bir laboratuvarda çalışmış olma deneyimi olmalıdır. Analitik sonuçların raporlanmasından önce, verilerinin derlenmesinden ve kalite kontrol sonuçlarından sorumlu kişilerdir.

5.4. Numune Alma Personeli

Numune alma konusunda eğitilmiş, yetkilendirilmiş bir kişi olmalıdır.

6. ANALİZ ÖNCESİ (PRE-ANALİTİK) AŞAMA

Numunelerin doğru seçimi ve toplanması; numunelerin analizi ve yorumlanması için çok önemli bir aşamadır. Resmi makamların istek yazısıyla gönderilen, tanı,

takip ve/veya tedavi amacına yönelik numune alma girişimleri sırasında İnsan Hakları ve Etik Kurallara özen gösterilir.

6.1. Numune Alınması

Toksikolojik analizlerde uygun numunenin seçimi, toplanması ve gönderilmesi, analitik sonucun doğru olması, sonuçların bilimsel olarak yorumlanması ve adli olgularda hükmün doğru verilmesi aşamaları için önemlidir.

Emniyet & Gözetim Zincirinin ilk basamağıdır. Örneğin kişiden uygun şekilde alındığını kanıtlamak için kayıtlar yapılmalı, ileri dönemde istenildiğinde sonuçların toplanan örneğe ait olduğunu gösterilmelidir. Numunenin alındığı kişi ile ilgili tıbbi öykü, enfeksiyon riskine karşı (tüberküloz, hepatit veya HIV v.b.) analizi yapacak laboratuvara bildirilmelidir.

Numune kapları, ilgili numunelere ve numune hazırlığına (temiz, yeterli miktar, kapaklı cam veya sentetik malzeme) uygun olmalıdır.

Numune toplama/onam formu hazırlanmalı, olgular için ayrı ayrı doldurulmalı ve laboratuvar yöneticisi, numunelerin geldiği birimlere, numune toplama/onam formlarını göndermeli ve gerektiğinde güncellemelidir. Numune kabı ve numune toplama/onam formu tam ve açık olarak etiketlenmeli ve/veya barkodlanmalı, numune alma tarih ve saati, numune tipi, olgu bilgisi analizi istenen parametreler ve numuneyi alan kişi istek formunda belirtilmelidir.

Ölüme neden olan maddenin belirlenmesi için postmortem doku ve sıvı numunelerinin alınması gerekmektedir. Postmortem numuneler sırasıyla; Periferik kan:10 ml, İdrar: hepsi, Vitröz hümör: hepsi, Kalp kanı: 25 ml, Saç: Posterior vertex bölgesinden, köke yakın yerden 300 mg, Safra: hepsi, Karaciğer: 20 g, Mide içeriği: hepsi, Beyin: 20 g, Böbrek: 20 g olacak şekilde alınmalıdır.

Canlı kişilerden kan numuneleri en az 10 ml, idrar numuneleri en az 30 ml ve saç numuneleri Posterior vertex bölgesinden köke yakın yerden en az 300 mg olacak şekilde alınmalıdır. Bu numune miktarları, laboratuvarların mevcut analiz yöntemlerine göre değişiklik gösterebilir.

6.2. Numunelerin Taşınması ve Teslim Alınması

Numuneleri alan kuruma ait emniyet ve gözetim zincirini gösteren belgeleri (örneğin alınma aşamasından itibaren tüm süreçleri) mutlaka doldurulmuş ve

laboratuvar istem formu numune toplama/onam formu ile birlikte gönderilerek, bozulma (soğuk zincir), kontaminasyon, tahrifat ve değiştirmeye olanak vermeyecek şekilde güvenli olarak (emniyet& gözetim zinciri) taşınmalıdır. Taşınan numunelerin içine konulduğu barkodlu delil poşetlerinin tek açımlik poşetler olması gereklidir. Laboratuvarlara dışarıdan gelen numunelerin kimler tarafından (polis, jandarma, resmi personel v.b.) veya güvenli bir posta yolu ile gelip gelmediği kayıt altına alınmalıdır. Gelen tüm numuneler güvenli bir alanda saklanmalıdır. Numunenin analiz için ve şahit örnek olarak ayrılması ve kalan numunenin analiz edilinceye kadar buzdolabında/derin dondurucuda saklanması da yine bu güvenli alanda olmalıdır. Gelen numuneler tüm formları ile birlikte laboratuvar personeli tarafından kayıt edilip, laboratuvarın numune kabul ölçütlerine (bu ölçütler, laboratuvarların mevcut analiz yöntemlerine göre değişiklik gösterebilir) uygunluğu açısından kontrol edilmelidir. Uygun olmayan numuneler işleme konulmaz ve bir tutanak/iade formu ile geri iade edilir. Bu durum kayıt altına alınarak, ilgili kurum ve kişi bilgilendirilmelidir. Bu yönergeler yazılı kayıt altına alınmalıdır.

7. ANALİTİK AŞAMA

7.1. Ön Tarama Aşaması

Tarama testleri biyolojik numunelere uygun (tam kan, serum, idrar v.b.) olmalı ve kullanılan biyolojik örneğe göre yöntem valide edilmelidir. Ticari firmalar tarafından sağlanan analitler için verilen eşik değerleri kontrol edilerek, mevcut laboratuvar koşullarına göre yeniden düzenlenmelidir. Madde panelleri, yeni çıkan maddelere göre güncellenmelidir. Saptanan maddelerin raporlanmadan önce doğrulanması yapılmalıdır. Negatif çıkan sonuçlar, sadece panel içeriğinde yer alan analitlerin olmadığını gösterir. Eğer idrar ve mide içeriği gibi yüksek derişimde madde içeren biyolojik örnek ile çalışılıyorsa, bulaşı (kontaminasyon) karşı ön tarama aşaması farklı bir odada yapılmalıdır.

7.2. Doğrulama Aşaması

Ön tarama testinde taraması yapılan biyolojik numunelerdeki ön tarama testi ile pozitif olarak saptanan maddelerin, farklı bir kimyasal prensibe dayalı ikinci bir teknik kullanılarak doğrulanması yapılmalıdır (Örneğin; immunoassay cihazlarında

kullanılan UV yöntemi ile tespit edilen maddenin, kütle spektrometresi ile ölçüm yapan başka bir cihazla doğrulanması gibi). Kullanılacak ikinci test yöntem daha seçimli ve hassas olmalıdır. Bu amaçla kullanılacak cihazlar Gaz Kromatografisi (GC), Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC/MS), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) veya Sıvı Kromatografi-Tandem (ardışık) Kütle Spektrometresidir (LC/MS/MS) cihazlarıdır.

Rutin uygulamalarda, GC/MS-EI Full Scan (tam tarama modu) kullanılıyor ise, cihazın sağladığı kütle spektrum kütüphanelerinden yararlanılabilir. Elektron iyonizasyonuna dayalı bu kütüphanelerde, ilgili analite benzetme oranı % 100 olsa bile, adli toksikolog deneyimlerini kullanarak spektrumunu doğru yorumlamalıdır. Kolon kanamalarından, plastik malzemelerden veya difüzyon pompa yağlarından kaynaklanan ekstra iyonlar olabilir. GC/MS kimyasal iyonizasyon veya LC/MS kullanılıyorsa, niteleyici iyonu seçmek için farklı iyonizasyon enerjisi veya güçlü ikincil bir iyon seçilebilir. Bu yöntemlerde izotop veya iyon eklenmesi ile oluşan iyonlar nitelik belirlenmesinde kullanılmaz.

Kütle spektrometresinde Seçili İyon Taraması (SIM) modu kullanıldığında analit ve iç standardın her biri için en az iki niteleyici iyon seçilmelidir. Genellikle analiz sonucu belirlenen maddenin iyon oranları ile ilgili kalibratör ve kontrollerin iyon oranları kıyaslandığında $\pm\%20$ kabul edilebilir aralıkta olmalıdır. İyon oranları LC/MS için ise $\pm\%25$ ile $\%30$ arasında olmalıdır. Bazı maddeler için doğrulamada aynı yöntemde kimyasal türevlendirme işlemi yapılarak analiz yapılıyorsa, GC'de alıkonma zamanları da değişecektir. Benzer şekilde doğrulamada ikinci bir GC yöntemi kullanıldığında kolonlar farklı ise analit alıkonma zamanları yine değişecektir.

Numunelerin analizi sonrası, gerektiğinde aynı olgunun başka bir alternatif numunesi analiz için kullanılabilir. Bu aşamada; aynı numuneden farklı ekstraktları veya ikinci bir alternatif biyolojik numunenin kullanılması genel bir uygulamadır. Tek bir numunenin hazırlanarak ilaç veya toksik maddenin doğrulanması doğru bir yaklaşım değildir. Çünkü, numunenin ekstraksiyonu sırasında kontaminasyon oluşmuş veya yanlış numune test edilmiş olabilir.

7.3. Kalibrasyon ve Validasyon

Validasyon parametreleri arasında genellikle seçicilik, kalibrasyon aralığı, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, geri kazanım ve kararlılık temel değerler olarak kabul edilmektedir. Analiz yapılırken numuneler seriler halinde çalışılır. Her bir analiz serisi, yapılan analize göre yeterli sayıda kör numune, kalibratör ve kontrol numunelerini içermelidir. Analizlerde mümkün olduğunca aynı matrikste hazırlanan kalibratörler kullanılmalıdır. Ekstraksiyon yapılmadan kullanılan kalibratörlerde iç standartlar mutlaka olmalıdır.

İmmunoassay analizlerinde kör numune ve negatif kalibratör $\pm 2SD$ eşik değeri aralığında çalışmalıdır. Belirtme (Tespit) alt sınırı (LOD) kör örneğin ortalama değerine $3SD$ eklenerek bulunabilir ($LOD = \bar{X} + 3SD$). Ancak GC, HPLC gibi diğer yöntemler için gerçek LOD değeri bu değerden yüksek olabilir. Saptama (Tayin) alt sınırı (LOQ) değeri; kabul edilebilir varyasyon katsayısına sahip, en düşük belirlenebilir derişim olarak tanımlanabilir. Rutinde yapılan analizler ile deneysel olarak saptanması uygundur.

İlgili kromatografik analizlerde uygun bir iç standart kullanılmalıdır. İç standart, analizi yapılan maddeye kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından benzemeli ve matriksin içinde kendiliğinden bulunmamalıdır. İç standart olarak analitin döteryumlu izotopu kullanılmalıdır, bu özellikle LC/MS analizlerinde iyon baskısının sonucu etkilemesini önlemek için tek seçenektir. İç standart, matrikse, ekstraksiyon ve tampon ekleden önce, olabildiğince ilk basamaklarda eklenmelidir. Ekstraksiyondan sonra eklenen maddeler “dış standart” olarak kabul edilir ve nicel analizlerde kullanılmaz.

Doğrusallık için en az 5 ayrı noktadan geçen kalibrasyon derişimi kullanılmalıdır. Bu derişimler aynı zamanda matriks içinde öngörülen derişimi kapsayan değerlerde olmalıdır. Eğer sonuç, en yüksek kalibratör derişiminden de yüksek çıkarsa, numune seyreltilip tekrar ekstraksiyon yapılmalıdır.

Kalibrasyonda kullanılan ölçüm parametreleri yöntemde belirtilmelidir. Kalibrasyon korelasyon katsayısı $R^2 > 0.99$ olmalıdır. Kalibrasyonda kullanılan her bir kalibratörün tespit edilen değerinin, gerçek değerinden sapma aralığı $\pm \%20$ 'dir. Ancak alkol analizlerinde bu değer $\pm \%10$ 'dur. En yüksek derişimdeki kalibratörden daha yüksek derişim içeren numune için taşınma (carry over) riski olacağından, bir sonraki örnek kontrol edilmelidir.

Kromatografik analizlerde alıkonma zamanı ölçütlere dâhil edilmelidir. GC analizlerinde alıkonma zamanında %1-2'lik sapma kabul edilebilir. Mobil faz kullanılan HPLC analizlerinde bu yüzde analize göre daha yüksek olabilir.

8. ANALİZ SONRASI (POST-ANALİTİK) AŞAMA

8.1. Kayıtların Kontrolü

Laboratuvar sorumlusu tarafından yapılır. Laboratuvara ulaşmış olgulara ait tüm kayıtlar gerektiği takdirde ulaşılabilir olmalı ve saklanmalıdır (Bölüm 8.5.).

- Emniyet ve gözetim zinciri belgeleri (Numune toplama/onam formu)
- Kalite kontrol kayıtları
- Tüm analiz parametrelerine ait kalibrasyon eğrileri ve analiz sonuçları hesaplanırken kullanılan tüm hesaplamaları
- Cihaz/test çıktıları
- Bireylere ait kimlik bilgisini içeren tüm veriler koruma altında olmalıdır.

8.2. Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Standart operasyon prosedürlerine analiz sonucunda elde edilen verilerin analizi yapan laboratuvar teknik personeli tarafından ilk onayı verilir.

8.3. Sonuçların Yorumlanması ve Raporlanması

Laboratuvarlar için nitel ve nicel analiz sonuçlarının yorumlanması adli toksikolojik analizin ayrılmaz bir parçasıdır. Tarama test sonucunun ne ifade ettiği laboratuvar uzmanı tarafından bilinmelidir. Test sonucu; konu ile ilgili yasal düzenlemeler ve olguya ait özellikler dikkate alınarak, testin hangi amaçla istendiği, analizi istenen biyolojik materyale ait kısıtlılıklar, uygulanan analitik yöntemin özellikleri, sınırlamaları (çapraz reaksiyon vb.), analizi yapılan analite ait farmakokinetik/farmokodinamik bilgiler, emniyet & gözetim zincirinin uygun olup olmadığı, pozitif sonuçların mutlaka doğrulaması yapılması gerekliliği, doğrulama yapılamamış ise hangi gerekçe ile doğrulamanın yapılmadığının sorgulanması gerekmektedir.

Kişiye ait analiz sonuçları ya bir rapor ya da uzman raporu (mütaala) şeklinde verilmelidir. Rapor araştırma sorularına göre ilgili yasal düzenlemeler kapsamında oluşturulmalıdır. Her bir sonuç verilmeden önce laboratuvar yöneticisi tarafından gözden geçirilmelidir. Rapor ve /veya analiz sonuçları yazılı ve sözlü olarak kişiye bildirilmez, sadece analizi isteyen ilgili kişi, kurum veya hekime gizlilik içerisinde verilir. İlgili birim dışındaki diğer hekim ve personelin otomasyon sistemi üzerinde analiz sonuçlarına erişimi engellenmiş olmalıdır.

Rapor; laboratuvar koordinatörü/yöneticisi, laboratuvar sorumlusu ve analizi yapan teknik personeli ile birlikte değerlendirilip, laboratuvar koordinatörü/yöneticisi tarafından yorumlandıktan sonra yazılmalıdır. Raporda; Numune tipi, numune numarası, kişinin adı, protokol numarası, T.C. Kimlik numarası, Analize uygunluğu / Numune bütünlük test sonuçları, Kullanılan analitik yöntem, Analiz edilen madde veya grubun adı ve eşik değerleri, Nitel sonuç (negatif/ pozitif şeklinde), Nicel (sayısal şekilde) sonuç elde edilmişse verilmesi önerilir (zorunlu değil). Ayrıca idari bilgiler, istem tarihi, istem yapan kurum/kişi, numunenin alındığı tarih, Numune kabul tarihi/saati, Analiz tarihi, Onaylayanın adı, imzası ve uzmanlık alanı, Laboratuvar adı - adresi ve Raporlama tarihi bilgileri yer almalıdır.

8.4.Analiz Rapor Terminolojisi

Numune içerisinde olmadığı bilinen bir maddenin analitik yöntemle tespit edilememesi durumuna (madde yok + test negatif) *gerçek negatiflik*, gerçekte numunede olduğu bilinen bir maddenin, analitik yöntemle tespit edilememesi durumuna (Madde var + test negatif) ise *yanlış negatiflik* denmektedir. Numunenin karışması, numune içine hile amacıyla kimyasalların eklenmiş olması, matriks içinde madde derişiminin çok düşük olması, idrar numunesi ise hile yapılmış olması, hedeflenen analitin doğru şekilde aranmaması, yöntemin yeterince hassas olmaması vb. durumlar olası yanlış negatifliğe neden olabilir.

Numune içerisinde mevcut olduğu bilinen bir maddenin analitik yöntemle de tespit edilme durumuna (Madde var + test pozitif) *gerçek pozitiflik*, gerçekte numune içerisinde olmadığı bilinen bir maddenin analitik yöntemle tespit edilmesi durumuna (Madde yok + test pozitif) ise *yanlış pozitiflik* denmektedir. Geçmiş madde kullanım hikâyesi (kronik kullanıcı), çapraz reaksiyonlar (reçeteli veya reçetesiz ilaç, bitkisel

ürün, gıda kullanımı) ve girişimler (yapısal olarak benzer veya benzer olmayan bileşiklerle) olası yanlış pozitiflik nedenleri arasındadır.

8.5. Arşivleme/Kayıtların Saklanması

Laboratuvarda raporlanan testler için uygun bir iç kalite kontrol programı uygulanır ve kayıt altına alınır. Kayıtların saklanması sürecinde gizlilik ve güvenlik önemlidir. Laboratuvarda iç ve dış kalite kontrol sonuçları en az 5 yıl, cihaz test kalibrasyon kayıtları en az 1 yıl süre ile saklanmalıdır. Kayıtlar raporların, istem ve güvenlik zinciri formları, çalışma kağıtları, laboratuvar dataları, kalite kontrol ve yeterlilik test sonuçlarını içermelidir. Kayıtlar elektronik ortamda saklanabilir (CD, DVD v.b). Şahit numuneler, yetkili kişilerce kontrol altında erişimi kısıtlı derin dondurucuların (-15 °C ve daha düşük) bulunduğu soğuk odada en az 6 ay süre ile saklanmalıdır. Laboratuvar yöneticisi/koordinatörü kayıtların saklanmasından sorumludur.

9. KALİTE KONTROL

Kontrol Materyalleri: Kontrol örnekleri, analiz edilecek olan numunenin matriksi ile aynı matrikste ve bilinen derişimde hazırlanır. Kontrol örnekleri, tekli ya da çoklu analit içeren her analiz setinin içine dâhil edilerek, numunelere uygulanan aynı prosedürlerle analiz edilir. Her analiz seti, örnek sayısının en az %10'u kadar kontrol örneği içermelidir. Kontrollerde mutlaka en az bir negatif ve bir pozitif kontrol içermelidir. Nitel analiz için negatif ve pozitif kontrolün, negatif ve pozitif sonuç vermiş olması yeterlidir. Nicel analizlerde negatif kontrol için sonuç tamamen negatif veya LOD değerinin altında çıkmalıdır.

Bazı adli toksikoloji laboratuvarlarında kontrol analizleri aynı matriks ile yapılabilirken, özgün örneklerde (bozulmuş dokular, kemik, tırnak vb.) kontrol analizi için özdeş örnek matriksi bulunamamaktadır. Kontroller, kalibrasyonda kullanılan standart materyallerden (örnek matriksi, standart solüsyonlar) farklı standart materyaller ile hazırlanmalıdır. Kalibrasyon için kullanılan standart materyallerin, kontrol örneklerinin hazırlanmasında kullanılamaz, çünkü yapılan hata

kontrollere de yansır ve olası hatalar saptanamaz. Kontrol örneklerine ait derişimler kalibrasyon derişimlerinden farklı olmalıdır.

Açık Kontroller: Açık kontroller analizleri yapan kişiler tarafından içeriği bilinen numunelerdir. Bunlar ticari firmalar veya profesyonel kurumlar tarafından hazırlanmış, olabilir. Analizlerde kullanmadan önce, alındığı kaynağa bakılmaksızın, mevcut laboratuvar koşullarında içeriği doğrulanmalıdır.

Doku numuneleri ve diğer özgün numuneler için daha farklı yaklaşımlar gerekebilir. Örneğin özgün numunelere benzemesi nedeni ile doku kontrolleri için, doku homojenatları; postmortem kan analizleri için ise, kan bankasından alınan tarihi geçmiş kanlar kullanılabilir. Boş kontrol (negatif kontrol) herhangi bir analiz eklenmeden hazırlanmalıdır.

Kalibratör, kontrol ve çözeltilerle ilgili olası problemler (degradasyon vb.) kantitatif kalite kontrol sonuçları kayıt altında takip edilerek denetlenir. Sürekli tekrarlanan analizler için kontrol örnekleri grafikler ile takip edilirken (Levy-Jennings grafiği vb.), daha az sıklıkta yapılan analizler için tablolaştırma yöntemleri kullanılabilir. Analize ait varyasyon katsayısının takibi de yöntemin geçerliliği veya geliştirmesinin gerekliliği hakkında bilgi verir.

Kör Kontroller: Özellikleri açık kontrol örnekleri ile aynı, ancak içeriği analiz yapan tarafından bilinmeyen kontrollerdir. Kalite kontrolünün sağlanması ve devamlılığı için kör kontrolle denetleme gereklidir. Kör kontrol analizi, laboratuvardaki numune kabulü, analize gönderme, analiz ve raporlama basamaklarının hepsini kapsamalıdır. Analizi yapan kişilerin bu örneğin kontrol örneği olduğunu bilmemeleri esastır. Bu örneklere “çift kör” de denilir.

Referans Materyaller: Sertifikalı bir referans madde (CRM) veya SRM, kalibrasyon materyalinin karşılaştırılacağı uygunlukta bir standart olarak, bilimsel bir kurul tarafından tanınmış bir yöntem ile sertifikalandırılmış olmalıdır.

Referans materyallerin büyük bir kısmı %100 saf değildir. Ambalajlar veya etiketlerde saflık oranı veya safsızlık içeriğinin belirtilmesi gerekir. Hangi koşullarda saklanması gerektiği (örneğin ışıktan korunarak, düşük sıcaklıkta veya nemsiz ortamda vb.) gibi bilgiler de olmalıdır. Bu talimatlara uygun olarak referans materyaller saklanır ve kullanılır. Etkin maddeler de dahil olmak üzere birçok toksik

maddenin raf ömrü kısa olabilir. Çözelti içinde temin edilen ve saklanan maddeler; saf ve katı olanlara kıyasla daha erken bozular.

Metabolitler: Birçok analiz yöntemi, analiz edilen maddelerin metabolitlerini de içerir. LC/MS ve GC/MS analizlerinde kullanılan metabolitler iç standart olarak kullanılan dötoryumlu formları ile birlikte ticari olarak temin edilebilir. Saflık dereceleri mutlaka belirtilmeli ve doğrulanmış olmalıdır.

9.1. Standart Operasyon Prosedürleri

Laboratuvarlar; tüm personelin erişimine açık ve güncel standart operasyon prosedürlerine (SOP) sahip olmalıdır. SOP'lerin içeriğinde, numune kabulü ve kaydı, gözetim zinciri, analizler, kalite güvence ile kalite kontrolü, analiz sonuçlarının değerlendirilmesi, raporlama ve numune imha prosedürleri detaylı olarak tarif edilmiş olmalıdır.

SOP kullanım kılavuzu, eğer uygunsa her bir analiz için şu bilgileri içermelidir;

- a) Yöntemin prensibi
- b) Reaktiflerin hazırlanması
- c) Analitik uygulamanın detayları,
- d) Kalibratör ve kontrol çözeltilerinin hazırlanması
- e) Reaktiflerin saklanması veya emniyeti ile ilgili bilgiler
- f) Validasyon parametreleri Nitel veya nicel sonuçların kabul veya red ölçütleri
- g) Referanslar

Sık karşılaşılmayan bir analiz için gerekli belgeler mevcut değilse her bir analiz parametresi için ilk kez yapıldığı eklenmelidir. Laboratuvar SOP'larda güncelleme yaptı ise eski belgeler arşive kaldırılmalı, gerektiğinde ulaşılabilir durumda olmalıdır.

9.2. Kalite Güvence

Kalite güvencesi; örnek alımı ve kabulü ile başlayan, verilerin değerlendirilmesi ve sonuçların raporlanması, kayıt altına alınıp arşivlenmesine

kadar olan süreçteki tüm işlemleri kapsar. Aynı zamanda her bir analizin ve laboratuvarların yeterlilik testlerinin kalite kontrollerini de içerir. Sonuçlar adli yargı makamlarınca değerlendirildiği için “kalite güvencesi” özellikle adli bilimler alanında önemli bir role sahiptir. Kalite güvencesinin amaçlarından biri rastlantısal veya sistematik olan hataları tespit etmek ve uygun düzeltmelerin yapılması için gerekli işlem ve faaliyetleri başlatmaktır.

Kullanılan standartlar yapılan testler için uygun olmalı, kaynaklar ve yapılan işlemlerin tarihleri sürekli kayıt altında tutulmalıdır. Referans materyaller stabiliteelerini ve bütünlüklerini koruyan uygun koşullarda saklanmalıdır. Analizlerde kullanılan standart çözeltiler laboratuvar içinde hazırlanmışsa, hangi madde ve yöntemler ile hazırlandığı ve testlerde kullanıma uygun olup olmadığı test edilerek, kayıt altına alınmalıdır. Pratik olarak uygulanabiliyorsa, referans maddenin nitel analizi yapılmalı ve safsızlığı laboratuvar içinde doğrulanmalıdır.

Tüm standartlar ve çözeltilere ait ortak bilgilerin olduğu bir etiketleme sistemi belirlenmelidir. Etiketlerde; çözeltilerin hazırlanma tarihi, hazırlayanın adı/adının baş harfleri ve son kullanma tarihi mutlaka olmalıdır. Hazır alınan kimyasal maddelerin ambalajı üzerinde son kullanma tarihi veya uygun kullanım süresi bulunmaktadır, bu tarihten sonra doğrulama testleri yapılmamış olan kimyasallar, analizlerde kullanılmamalıdır.

Analiz için kullanılan kalibratör sayısı, uygun kalibrasyon eğrisini çizebilecek yeterlilikte olmalıdır; başlangıç olarak bir adet kör (negatif) örnek ile en az 5 kalibrasyon noktası olmalıdır. Kalibrasyon korelasyon katsayısı $R^2 > 0.99$ olmalıdır. Bazı durumlarda $r^2 > 0.98$ değeri de kabul edilebilir. Analiz sırasında kalibrasyon eğrisinin güvenilirliği değişik derişimlerde pozitif ve negatif kontrol örnekleri verilerek test edilmelidir.

Kontrol için hazırlanan örnekler, kalibrasyon eğrisi oluşturmak için; kalibrasyon eğrisi için kullanılan örnekler ise kontrol amaçlı kullanılmaz. Kontroller; içinde analitin olmadığı örnek (Negatif Kontrol) ile, kalibrasyon eğrisinin performansını kontrol eden, çalışma aralığına uygun derişimlerde analit içeren pozitif kontrol örneklerinden oluşur. Çalışılan kalibrasyon aralığının dışındaki örnekler için, bu aralık dışındaki derişimlerde, verilen kontrollerle kalibrasyon eğrisinin doğrusalığı kontrol edilmelidir. SOP kılavuzları, kontrol örnekleri kabul

edilebilir değerler aralığında çıkmadığında yapılması gereken işlemleri içermelidir. Laboratuvarın kalite kontrol işlemlerini denetleyen ayrı bir personeli/danışmanı olmalıdır. Laboratuvarda alışan herhangi bir personelin, aynı zamanda ek görev olarak kalite kontrol denetleyicisi olması uygun/doğru değildir. Adli Toksikoloji Laboratuvarları, laboratuvarda analizi yapılan tüm biyolojik materyal analizleri için mutlaka dış yeterlilik test programına katılmalıdır. Yeterlilik test programı, laboratuvarın nicel analiz yapabilme kapasitesini belirleyip, kontrol/takip edebilen düzeyde olmalıdır.

Laboratuvar yöneticisi düzenli olarak kalite kontrol ve yeterlilik test sonuçlarını takip etmelidir. Sonuçların incelendiği tarih not düşülmeli ve kayıtlar imzalanmalıdır. Tüm laboratuvar personeli kalite kontrol ve yeterlilik test sonuçları hakkında bilgilendirilmelidir. Yapılan hataların olası kaynakları tespit edilerek, bu konuda gerekli düzeltici faaliyetler yapılmalıdır. Yeterlilik testine tabi tutulan materyaller, sonuçlar raporlanıp laboratuvara geri ulaşıncaya ve oluşan hataları düzelten basamaklar prosedürlere ekleninceye kadar saklanmalıdır.

Yeterlilik testi sonucunda görülen hatalar, acil olarak prosedürlere uygun Şekilde düzeltilmelidir. Özellikle hatalı pozitif sonuçlarda, öncelikle bulaş veya taşınma (carry-over) araştırılarak sebebin ne olduğu acilen bulunmalı ve düzeltilmelidir. Hatalı negatif sonuçlar, laboratuvarın analiz ettiğini bildirdiği ancak negatif çıkan madde için analiz yönteminin başarısız olmasından veya kullanılan rutin analiz yönteminin o maddeyi analiz edemiyor olmasından kaynaklanabilir. Hatalı negatif sonuçların sebebi hızlı bir Şekilde araştırılmalı prosedürlerdeki problemler giderilmelidir. Böyle durumlarda laboratuvar yöneticisi prosedürlerdeki düzenlemelere, sonuçların kabul edilebilirliğine karar vermelidir. Tüm düzenlemeler kayıt altında tutulmalıdır.

Nicel yeterlilik testlerindeki hatalar mutlaka araştırılmalıdır. Genellikle analitlerin hedef konsantrasyonu, teste katılan tüm laboratuvarların bulduğu ortalama değer $\pm 1SD$ veya $2SD$ olarak ifade edilir. Bazen analitin gerçek miktarı da açıklanır. Eğer hata payı çok büyükse sorun kolay anlaşılabilecek ve çözümlenecek Şekilde olabilir. Özellikle çok sık nicel analizi yapılmayan bazı analitler için sonuçlar normalde kabul edilen $\pm 2SD$ değerinde bile olsa dahi kabul edilmeyebilir. Bu yüzden $\pm 20\%$ veya $\pm 30\%$ Şeklinde ifade edilen gerçekçi ve uygun yüzde oranı veren

sapmalar kullanılmalıdır. Hatanın büyüklüğüne bağı olarak düzenlemeler yapılır. Hataların, kalibrasyon eğrisinde ve belgeden kaynaklı minör değişikliklerin yapılmasını gerektiren minör sebeplerinin yanı sıra, analizin tekrar validasyonunu veya yöntemin baştan yenilenmesini gerektiren major sebepleri de olabilir. Yapılan tüm düzenlemeler kayıt altına alınmalı ve belgelenmelidir.

Analizlerin değerlendirilirken düzenli aralıklarla varyasyon katsayısı (CV) hesaplanmalı ve kontrol edilmelidir. Kromatografik analizler için CV değerinin %15'ten büyük olması, analizin kesinliğinin iyi olmadığını ve analiz yönteminin geliştirilmesi gerektiğinin göstergesidir.

Kalite güvence programının en önemli kısımlarından biri de laboratuvar ekipman ve cihazlarının rutin bakımlarıdır. Rutin ve rutin dışı tüm bakım ve onarımlar kayıt altına alınmalıdır (GC cihazında septa değişimi vb.). Bunun için, kayıt defterleri veya takip/kontrol çizelgeleri kullanılmalıdır. Aynı tip ekipmanlar varsa, bu ekipmanlar birbirinden ayırt edebilmek için kodlanmalı, ilgili kod ile kayıtlar yapılmalıdır.