



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Praca pogładowa
Review paper

Nowy wymiar ekspertyzy DNA – potrzeba szkoleń ekspertów i odbiorców ekspertyz A new dimension of the forensic DNA expertise – the need for training experts and expertise recipients

Wojciech Branicki^{1,2}, Ewelina Pośpiech², Tomasz Kupiec¹, Józefa Styrna²

¹Institut Ekspertyz Sądowych, Kraków, Polska

²Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Institut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

¹Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

²Department of Genetics and Evolution, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

Streszczenie

Genetyka sądowa jest dynamicznie rozwijającą się dyscypliną naukową. Genetyczna identyfikacja człowieka prowadzona jest z zastosowaniem kompleksowych rozwiązań, które zapewniają wysoką czułość analizy, eliminują niekorzystny wpływ inhibicji i degradacji śladów biologicznych, a także dostarczają maksymalnej liczby informacji przydatnych dla sądu. Ostatnio uwydatniły się jednak problemy, które wcześniej miały mniejsze znaczenie, jak transfer wtórny, mieszaniny DNA czy niekompletność profili DNA. Wydaje się, że potencjał narodowej bazy danych DNA w Polsce wciąż nie jest należycie wykorzystywany i konieczna jest odpowiednia polityka informacyjna w tym względzie. Do nowych metod, które można wykorzystać na poziomie prowadzonego dochodzenia, należą: określanie pochodzenia biogeograficznego, predykcja cech fizycznych, a także przybliżanie chronologicznego wieku człowieka. Metoda sekwencjonowania następnej generacji może już wkrótce całkowicie wyeliminować zastosowanie elektroforezy kapilarnej w genetyce sądowej. Konieczne są dalsze prace umożliwiające wdrożenie jednolitych standardów w interpretacji i ocenie dowodów pochodzących z badania DNA. Utrzymanie odpowiednio wysokich standardów wymaga ustawicznego szkolenia ekspertów oraz właściwego informowania i szkolenia odbiorców ekspertyz.

Słowa kluczowe: genetyka sądowa, ślady LT-DNA, baza danych DNA, pochodzenie biogeograficzne, predykcja cech fizycznych, szkolenie ustawiczne.

Abstract

Forensic genetics is a rapidly developing discipline. Nowadays, human genetic identification relies on the application of complex solutions ensuring high sensitivity and resistance to the inhibition and degradation of biological traces, and revealing maximum information which has relevance for the justice system. However, recent improvements in forensic DNA identification testing are associated with problems including secondary transfer, DNA mixtures and incompleteness of DNA profiles, which were formerly less significant. It also seems that the potential of the national DNA database in Poland has not been fully developed, and it is necessary to implement an appropriate information policy in order to improve it. Novel methods that can be applied at the level of investigation include analysis of biogeographic ancestry, prediction of visible traits, and estimation of human chronological age. Moreover, next-generation sequencing has a potential to entirely replace capillary electrophoresis in forensic genetics. Further works are necessary to ensure a proper implementation of uniform standards of data interpretation and evaluation of DNA evidence in forensic genetics. In order to maintain proper standards of forensic DNA assessment, continuous training of DNA experts and appropriate information policy for recipients of DNA assessments are required.

Key words: forensic genetics, LT-DNA traces, DNA database, biogeographic ancestry, prediction of appearance traits, continuous training.

Wstęp

Genetyka sądowa jest dyscypliną, która wśród nauk sądowych wyróżnia się szczególnie dynamicznym rozwojem. Postęp w dziedzinie identyfikacji genetycznej, który rozpoczął się w latach 80. XX wieku, dotyczy zarówno stosowanych markerów genetycznych, jak i metod ich analizy. Poza nieustannym usprawnianiem standardowo stosowanych metod identyfikacji genetycznej, genetyka sądowa opracowuje również nowe narzędzia przydatne zarówno na etapie prowadzonego śledztwa, jak i na etapie przygotowania dowodów procesowych, korzystając przy tym z postępu w naukach biomedycznych, zwłaszcza w badaniach nad ludzkim genomem. Ciągły postęp w genetyce sądowej sprawia, że eksperci zaangażowani w rutynowe badania DNA, a także odbiorcy ekspertyz muszą nieustannie uaktualniać i poszerzać swoją wiedzę na temat możliwości i metod badawczych, które oferuje współczesna genetyka sądowa. Szczególne zapotrzebowanie dotyczy, jak się wydaje, etapu interpretacji danych DNA i ich statystycznej analizy. Szanse na pogłębianie wiedzy daje bez wątpienia udział w międzynarodowych konferencjach i warsztatach przykonferencyjnych. Zapotrzebowanie na szkolenia wydaje się jednak dużo większe i organizowanie tego typu spotkań na poziomie lokalnym może się przysłużyć jakości badań genetycznych i ujednoczeniu sposobu interpretacji oraz prezentacji dowodu z badania DNA w sądzie. Wnioski te poparte są wynikami badań prowadzonych w ramach europejskiego projektu badawczego EUROFORGEN-NoE, który ma na celu m.in. lepszą integrację europejskiego środowiska genetyków sądowych. Badania EUROFORGEN-NoE pozwoliły na identyfikację 179 laboratoriów zajmujących się genetyką sądową chętnych do udziału w sieci doskonałości tworzonej przez tę grupę. Z Polski na kwestionariusz EUROFORGEN-NoE odpowiedziało 15 laboratoriów zajmujących się genetyką sądową (www.euroforgen.eu), co należy uznać za wynik zadowalający.

Nowe możliwości standardowych narzędzi badawczych

Analizę sekwencji mikrosatelitarnych, tj. markerów typu STR (*short tandem repeats*), stosuje się w celu identyfikacji osobniczej od ponad 20 lat.

Background

Forensic genetics is a discipline which distinguishes itself among other forensic sciences by its extremely rapid development. Progress in the field of genetic identification which started in the 1980s includes both genetic markers which are in use, and methods of their analysis. In addition to continuously improving standard methods of genetic identification, forensic genetics has also been developing new tools which are suitable both at the stage of investigation and preparation of legal evidence. In the process, forensic genetics has been relying on progress in biomedical sciences, especially on research into the human genome. Because of ongoing advances in forensic genetics, both experts involved in routine DNA testing and recipients of DNA assessments must constantly update and expand their knowledge of possibilities offered by contemporary forensic genetics and available test methods. The need seems especially critical at the stage of interpretation and statistical analysis of DNA data. A good opportunity of extending knowledge is definitely participation in international conferences and conference workshops. It seems, however, that the demand for training is much larger, and locally organized meetings of this type could contribute to an improvement in the quality of genetic testing, and harmonization of methods of interpreting and presenting DNA testing evidence in court. The above conclusions arise from studies conducted within the framework of the European EUROFORGEN-NoE research project which, as one of its goals, seeks to achieve a better integration of the European community of forensic geneticists. EUROFORGEN-NoE identified a total of 179 laboratories specializing in forensic genetics which are willing to join the excellence network created by the group. In Poland, replies to the EUROFORGEN-NoE questionnaire were submitted by 15 laboratories dealing with forensic genetics (www.euroforgen.eu), which should be regarded as a satisfactory result.

New possibilities of standard testing tools

Analysis of microsatellite sequences, i.e. STR (short tandem repeats) markers, is a method which has been used for personal identification for over

Pierwsze prace donoszące o możliwości zastosowania sekwencji mikrosatelitarnych w badaniach identyfikacyjnych pojawiły się na przełomie lat 80. i 90. XX wieku [1, 2]. Od początku zwracano uwagę na zalety markerów STR wynikające z niewielkiej długości badanych *loci*, łatwości ich analizy i stosunkowo wysokiej zmienności. Markery STR wykorzystano niemal jednocześnie z ich odkryciem w badaniach identyfikacyjnych materiału kostnego, sprawiającego wówczas szczególne problemy analityczne [3]. Metodę multipleksowej reakcji łańcuchowej polimerazy (multiplex PCR), która pozwala na jednoczesną analizę wielu markerów STR i szybką analizę identyfikacyjną śladowych ilości DNA, zaproponowano po raz pierwszy już w 1988 r. [4]. Została ona błyskawicznie zaadaptowana przez środowisko genetyków sądowych w postaci pierwszego tetrapleksu do identyfikacji człowieka [5]. Po ponad 20 latach od pojawienia się pierwszych systemów multipleksowych zwalidowano dla potrzeb sądowych pierwsze zestawy pozwalające na jednoczesną amplifikację ponad 20 *loci* genetycznych. Przykładowymi zestawami tego typu są GlobalFiler® PCR Amplification Kit i PowerPlex® Fusion System. GlobalFiler® PCR Amplification Kit poza 21 autosomalnymi markerami STR zawiera również 1 *locus* Y-STR, 1 *locus* insercyjno-delecyjny zlokalizowany na chromosomie Y, a także dobrze znany *locus* amelogeniny będący od ponad 20 lat podstawowym markerem do oznaczania płci. PowerPlex® Fusion System zawiera 22 autosomalne markery STR, 1 *locus* Y-STR oraz *locus* amelogeniny. Zestawy przedstawiane są jako rozwiązania, które poza polimorficznymi danymi dostarczają informacji na temat stopnia degradacji DNA, a także kompleksowych informacji o płci genetycznej. GlobalFiler® PCR Amplification Kit zawiera aż 10 *loci*, których amplikony nie przekraczają długości 220 pz, co daje bardzo duże możliwości analizy mocno zdegradowanych próbek badawczych. PowerPlex® Fusion System zawiera 8 *loci* o takiej charakterystyce. Siła różnicująca obu zestawów (odpowiednio $7,12 \times 10^{-26}$ i $6,58 \times 10^{-29}$) jest wystarczająca nawet w sytuacji bliskiego pokrewieństwa identyfikowanych osób. Warto zwrócić uwagę na poprawę działania buforów do PCR, których obecny skład sprzyja wysokiej czułości analiz i zapewnia minimalną wrażliwość na inhibicję. W 1993 r. uzyskano pierwsze wyniki analizy *loci* STR z zastosowaniem aparatów do elektroforezy kapilarnej [6].

20 years. The first studies reporting the possibility of applying microsatellite sequences in identification tests were published at the turn of the 1990s [1, 2]. From the very outset, attention was paid to the advantages of STR markers resulting from the small size of investigated *loci*, ease of analysis and relatively high variability. Almost instantly after their discovery STR markers were applied in identification tests of bone material which, at the time, posed serious analytical problems [3]. The multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) method, which allows the simultaneous analysis of multiple STR markers and rapid identification analysis of trace amounts of DNA was first proposed as early as in 1988 [4]. The technique was instantly embraced by the community of forensic geneticists in the form of the first tetraplex for human identification [5]. Over 20 years after the emergence of the first multiplex systems, the first kits for the simultaneous amplification of more than 20 genetic *loci* were validated for forensic purposes. Kits of this type include, for example, GlobalFiler® PCR Amplification Kit and PowerPlex® Fusion System. In addition to 21 autosomal STR markers, GlobalFiler® PCR Amplification Kit also contains one Y-STR *locus*, one insertion/deletion *locus* residing on the Y chromosome, as well as the well-known amelogenin gene *locus* which has been the basic sex-typing marker for over 20 years. PowerPlex® Fusion System contains 22 autosomal STR markers, one Y-STR *locus* and amelogenin *locus*. The kits are marketed as solutions which, in addition to polymorphic data, provide information about the degree of DNA degradation and comprehensive information about genetic sex. GlobalFiler® PCR Amplification Kit includes as many as 10 *loci* with amplicons not exceeding 220 bp in length. The feature creates extensive possibilities for the analysis of heavily degraded test samples. PowerPlex® Fusion System contains 8 *loci* with such characteristics. The discrimination power of both kits (7.12×10^{-26} and 6.58×10^{-29} , respectively) is sufficient even in cases involving a close biological relationship between the persons being identified. Another important factor is the improvement in the quality of PCR buffers. Their present composition is designed to provide high sensitivity of analysis and minimum sensitivity to inhibition. The year 1993 saw the first results of STR *loci* analysis using capillary electrophoresis units [6]. At the time, there was a debate on the

Dyskutowano wówczas nad wadami i zaletami elektroforezy kapilarnej, która dziś jest standardem, a powszechnie wtedy stosowaną elektroforezę płytową wycofano. Co więcej, czułość ostatnich aparatów do elektroforezy kapilarnej z serii ABI 3500 (Applied Biosystems) jest nieporównywalnie wyższa od czułości poprzednich aparatów, a detekcja produktów PCR odbywa się z zastosowaniem 6 barwników fluorescencyjnych.

Genetyczna identyfikacja człowieka prowadzona jest z zastosowaniem systemowych rozwiązań, które na wszystkich etapach, począwszy od zabezpieczenia śladów, mają zapewnić wysoką czułość analizy, eliminować niekorzystny wpływ inhibicji i degradacji śladów biologicznych, a także wydobywać maksymalną ilość informacji przydatnych do przygotowania opinii. Zabezpieczanie niektórych śladów biologicznych z wykorzystaniem folii kryminalistycznych pozwala w wielu przypadkach na uzyskanie lepszych rezultatów niż przy pobieraniu próbek na bawełniane pałeczki wymazowe [7, 8]. W nowoczesnych pałeczkach wymazowych bawełnę zastąpiono materiałami syntetycznymi o dobrych parametrach wchłaniania i uwalniania DNA [9]. Ostatnio przedstawiono bardzo dobre wyniki odzysku DNA przy zastosowaniu pałeczek wymazowych z polimerem, który rozpuszcza się podczas ekstrakcji DNA, poprawiając wydajność następującej późniejszej reakcji PCR [10]. Znaczący postęp odnotowano również w izolacji DNA. Zastosowanie magnetycznych kuleczek wiążących DNA nie tylko poprawiło jakość ekstraktów, skutecznie eliminując inhibitory reakcji PCR, lecz także umożliwiło automatyzację procesu izolacji DNA, zwiększając przepustowość i ograniczając ryzyko błędu [11, 12]. Pomiar stężenia DNA stał się bardzo istotnym etapem analizy (zwłaszcza trudnych śladów biologicznych), gdyż dostarcza informacji niezbędnych do prawidłowego przebiegu jej dalszych etapów. Umożliwia nie tylko ocenę stężenia ludzkiego DNA, lecz także ocenę stosunku ilości DNA mężczyzny i kobiety w mieszaninach DNA, stopnia degradacji DNA i inhibicji [13]. Pozwala na wykrycie ilości DNA poniżej 10 pg, co daje możliwość oceny stężenia DNA nawet w tzw. śladach dotykowych. Przyjmuje się, że w jednej komórce diploidalnej zawarte jest ok. 6,6 pg DNA. Z drugiej jednak strony, rozwijana jest technika bezpośredniej amplifikacji PCR, która pomija etap izolacji i pomiaru stężenia DNA. Co ciekawe, me-

advantages and disadvantages of capillary electrophoresis – the method that has now become the standard, whereas the technique of plate electrophoresis, which was in common use then, has been phased out. What is more, the sensitivity of the latest ABI 3500 series capillary electrophoresis units (Applied Biosystems) is incomparably higher than the sensitivity of older systems, and the detection of PCR products is performed with 6 fluorescent dyes.

The genetic identification of people is based on systemic solutions which, beginning with the stage of securing traces and continuing throughout all subsequent stages, are aimed to ensure high sensitivity of analysis, eliminate unfavourable effects of inhibition and degradation of biological traces, and extract the maximum amount of information needed for preparing assessment. In many cases, securing certain biological traces by means of forensic adhesive films makes it possible to achieve better results than sampling with cotton swabs [7, 8]. In modern swabs cotton has been replaced with synthetic materials having good DNA absorption and release parameters [9]. A recent report has described very good DNA recovery results obtained for swabs containing a polymer which dissolves during DNA extraction, improving the yield of the subsequent PCR reaction [10]. A considerable progress has also been noted in DNA isolation. The application of magnetic DNA binding beads has not only enhanced the quality of extracts, effectively eliminating PCR inhibitors, but also created a possibility for automating the process of DNA isolation, increasing the throughput and limiting the potential for errors [11, 12]. The measurement of DNA concentration has become a very important element of analysis – especially in the case of difficult biological traces – because it supplies information which is required to ensure proper progression through each subsequent stage of analysis. It not only allows an evaluation of the concentration of human DNA, but also makes it possible to determine the ratio of male and female DNA in mixtures, and assess the degree of DNA degradation and inhibition [13]. The method enables the detection of DNA in amounts below 10 pg, and thus find out the concentration of DNA even in the so-called “contact traces”. It is assumed that a single diploid cell contains ca. 6.6 pg of DNA. On the other hand, the technique of direct PCR amplification, which leaves out the stages of DNA isolation

tody takie mogą znajdować zastosowanie nie tylko do analizy materiału porównawczego [14], lecz także do analizy śladów biologicznych [15]. Postęp obserwowany w genetyce sądowej dotyczy również badań nad mitochondrialnym DNA. Opracowywane są nowe metody oznaczania profili mtDNA, przy czym istotnym celem jest wysoka czułość analizy pełnych genomów mitochondrialnych. Prowadzone są prace nad funkcjonalnością stosowanych baz danych i interpretacją wyników [16]. Współczesne metody identyfikacji człowieka pozwalają na analizę śladów biologicznych, których badanie w przeszłości nie było możliwe. Powtórna analiza uprzednio badanych próbek wydaje się zatem w wielu przypadkach uzasadniona. Warto zastanowić się jednak nad zagrożeniami, jakie niesie za sobą zastosowanie nowoczesnej technologii w genetyce sądowej.

Większa wydajność metod może zwiększać ryzyko błędu

Duża łatwość uzyskania profilu DNA z pojedynczych komórek organizmu daje ogromne możliwości badawcze w genetyce sądowej. Interpretacja wyników takiej analizy i wiarygodności uzyskanych danych w takich okolicznościach jest jednak istotnym problemem. Środowisko genetyków sądowych zdaje sobie sprawę z ryzyka pojawiającego się przy tak wysokiej czułości badania. Zagrożeniom związanym z badaniem śladów dotykowych zawierających bardzo niewielkie ilości matrycy DNA (LT-DNA) w dużej mierze poświęcona była konferencja „The hidden side of DNA profiles. Artifacts, errors and uncertain evidence”, która odbyła się w Rzymie 27–28 kwietnia 2012 r. Innym szeroko dyskutowanym podczas spotkania zagadnieniem był problem mieszanin DNA, których analiza również sprawia poważne problemy interpretacyjne [17]. Bez wątpienia wraz ze wzrostem czułości metod analizy DNA rośnie ryzyko popełnienia błędu. Uwydatniły się bowiem problemy, które wcześniej miały dużo mniejsze znaczenie. Wzrosło ryzyko tzw. transferu wtórnego, zjawiska polegającego na wtórnym przeniesieniu istotnych dla śledztwa śladów DNA na osoby lub przedmioty niezwiązane ze zdarzeniem. Wykazano na przykład, że uścisk dłoni może doprowadzić do przeniesienia DNA. Jeśli chwilę później dotknięty zostanie przedmiot, którym popełniono przestępstwo, to może się na nim znaleźć śladowa ilość

and DNA concentration measurement, is being developed. Interestingly, such methods can have applications not only in the analysis of reference material [14] but also in the analysis of biological traces [15]. Advances in forensic genetics are also observed in the field of mitochondrial DNA studies. New methods of mtDNA profiling are being developed, with one of the main goals to achieve a high sensitivity of analysis of complete mitochondrial genomes. Works are in progress on the functionality of databases and the interpretation of findings [16]. Contemporary methods of human identification are suitable for the analysis of biological traces which were not previously amenable to investigation. Consequently, a re-analysis of already tested samples seems a justified procedure in many cases. However, it is also worthwhile to address risks which are involved in the application of modern technology in forensic genetics.

Higher yield of methods can increase the risk of errors

The ease of obtaining a DNA profile from individual body cells opens up great testing possibilities in forensic genetics. The interpretation of results yielded by such analyses, and the reliability of results obtained in such circumstances, however, are significant problems to consider. Forensic geneticists are aware of the risks that accompany such a high sensitivity of analysis. Risks involved in the investigation of touch traces containing very small amounts of the template DNA (LT-DNA) were one of the central topics discussed at the conference “The hidden side of DNA profiles. Artifacts, errors and uncertain evidence” which was held in Rome on 27–28 April 2012. Another widely discussed issue was the problem of DNA mixtures whose analysis poses serious challenges with the interpretation [17]. An increase in the sensitivity of DNA analysis methods undeniably increases the risk of errors. This is because more sensitive methods of DNA analysis have exposed problems which used to be of lesser significance. They have elevated the risk of “secondary transfer”, whereby DNA traces which are relevant for the investigation are passed on to persons or objects that are unrelated to the event. For example, it has been shown that a handshake can involve DNA transfer. If a moment later an instrument of crime is touched, it can be found to contain trace amounts of DNA be-

DNA osoby, z którą wymieniono uścisk dłoni. Jest oczywiste, że w niektórych okolicznościach może to obniżać wiarygodność dowodu z badania DNA. Wiele profili genetycznych to mieszaniny DNA, których interpretacja jest obciążona podwyższonym ryzykiem błędu. Z badań Dror i Hampikiana wynika, że analiza mieszanin DNA może być subiektywna [18]. Analiza śladów o małych stężeniach DNA często kończy się uzyskaniem niekompletnych profili DNA. Stosowane są różne metody interpretacji takich danych, przy czym za najważniejsze uznawane są modele konsensusowe [19]. Zakładają one kilkukrotną analizę śladu biologicznego i uwzględnienie w raporcie alleli występujących we wszystkich lub w większości powtórzeń. Oznaczony profil DNA będzie w takim przypadku profilem konsensusowym. Warto jednak zauważyć, że kilkukrotne powtórzenie analizy często nie jest możliwe w przypadku tak niewielkich śladów. Brak jasnej informacji o niższej wiarygodności niektórych wyników analizy DNA skierowanej do odbiorców ekspertyz może pozostawiać fałszywe przekonanie o tym, że dowód z badania DNA jest zawsze jednakowo silny i obiektywny. W głośnej sprawie zabójstwa Meredith Kercher we Włoszech dowody DNA na udział Amandy Knox i jej ówczesnego partnera Raffaele Sollecito w tym przestępstwie należą do szeroko dyskutowanych, jako kontrowersyjne. Pierwszy to mieszanina DNA zidentyfikowana na zapięciu biustonosza zamordowanej, w której słabszy komponent może rzekomo pochodzić od Sollecito. Drugi to profil DNA ofiary zidentyfikowany na ostrzu noża, w którym większość alleli ma bardzo słaby sygnał poniżej 50 RFU (*relative fluorescence units*, jednostki pomiarowe stosowane przy detekcji fluorescencji) (http://themurderofmeredithkercher.com/Main_Page).

Eksperci zaangażowani przez obrońców Knox odwołali się do możliwości transferu wtórnego przy pozyskiwaniu dowodów, gdyż śledczy podczas czynności śledczych nie zmieniali rękawic ochronnych. Wydaje się, że transfer wtórny rzeczywiście może stanowić problem w sytuacji, gdy profil genetyczny oznacza się z zaledwie kilku komórek. Potrzeba szkoleń ekspertów prowadzących do harmonizacji analizy interpretacyjnej i wdrożenia najwyższych standardów w tym względzie wydaje się nie budzić wątpliwości. Konieczne są także nieustanne szkolenia odbiorców ekspertyz, którzy powinni dobrze się

longing to the person with whom the handshake has been exchanged. There are definitely circumstances in which the phenomenon can reduce the reliability of evidence obtained by DNA testing. Many genetic profiles are DNA mixtures whose interpretation bears an elevated risk of error. A study conducted by Dror and Hampikian shows that the analysis of DNA mixtures can be subjective [18]. Analyses of traces with low DNA concentrations often yield incomplete DNA profiles. There are a number of methods of interpreting such data, with consensus models being recognized as the most appropriate ones [19]. The models involve multiple analyses of biological traces and reporting of those alleles that are found in all replicates or in the majority of them. DNA profiles determined in such cases are consensus profiles. It must be noted, though, that such minor traces are often unsuitable for several repetitions of the analysis. Since recipients of DNA assessments are not provided with clear information that certain findings brought by DNA analysis have a lower reliability, they can falsely believe that evidence obtained by DNA testing is always equally strong and objective. One of widely debated criminal cases illustrating this problem is the highly publicized murder of Meredith Kercher in Italy, which implicated Amanda Knox and her then boyfriend Raffaele Sollecito as suspected perpetrators on the basis of controversial DNA evidence. One piece of evidence is the DNA mixture identified on the victim's bra clasp. The weaker component of the mixture was determined to allegedly come from Sollecito. The other is the victim's DNA profile found on a knife blade. The majority of alleles identified in the profile, however, demonstrate a very low signal: below 50 RFU (*relative fluorescence units*) (http://themurderofmeredithkercher.com/Main_Page).

Experts called by Knox's defence team invoked the possibility of secondary transfer during the collection of evidence, pointing to the fact that forensic officers failed to change protective gloves during investigative measures. Secondary transfer can indeed be a problem in situations involving the determination of a genetic profile from just a couple of cells. In this context, there is an unquestionable need for training experts with a view to harmonizing interpretative analysis and implementing the highest standards of quality. Regular training should also be provided to recipients of expert assessments to

orientować, gdzie znajdują się pułapki mogące prowadzić do akceptacji dowodu wątpliwego, a w efekcie nawet wydania błędnego wyroku.

Znaczenie bazy danych DNA

Z raportu ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*) z 2006 r. wynika, że z 439 zakończonych masowych badań DNA, polegających na profilowaniu DNA nierzadko ogromnej grupy osób, które nie są uznawane za podejrzane, lecz np. zamieszkują region, w którym popełniono przestępstwo – 315 przyniosło sukces (www.enfsi.eu). Badania takie są odpowiedzią na brak hipotez śledczych odnośnie do tożsamości podejrzanych w sprawie. Mimo że skuteczne, są poważnym wyzwaniem ekonomicznym i logistycznym i trudno je uznać za standardowe. W 1987 r. w Wielkiej Brytanii, w pierwszej sprawie kryminalnej, w której wykorzystano analizę DNA (wówczas była to analiza markerów minisatelitarnych) i od razu na tak wielką skalę, po przebadaniu ponad 4000 mężczyzn, Colin Pitchfork został zidentyfikowany jako sprawca dwóch zabójstw. W 1998 r. w Niemczech w sprawie gwałtu i zabójstwa zbadano 11 200 mężczyzn. Podobne badania prowadzono również w Polsce, gdzie w 2001 r. w sprawie dotyczącej serii gwałtów i zabójstw na Wybrzeżu zbadano 421 mężczyzn [20]. Już w 1995 r. genetycy wprowadzili narzędzie, które w dużej mierze rozwiązało problem braku podejrzanych w sprawach, w których dysponowano śladami biologicznymi pozostawionymi przez sprawcę na miejscu przestępstwa. Pierwsza baza danych DNA powstała wtedy w Wielkiej Brytanii, zaraz potem jednak podobne rozwiązania wprowadzono w życie w innych krajach w Europie i na świecie. Schneider i Martin w 2001 r. sugerowali, że efektywność bazy danych DNA powinna zależeć od liczby profili DNA w bazie [21]. Choć taka zależność wydaje się intuicyjnie oczywista, z niedawnych badań Santosa i wsp. (2013) przeprowadzonych na podstawie danych z 2011 r. wynika, że tzw. *performance ratio* (PR), tj. współczynnik opisujący wydajność bazy danych DNA będący ilorazem liczby „trafień” i całkowitej liczby profili DNA w bazie, niekoniecznie rośnie liniowo wraz z liczbą rekordów w bazie [22]. Autorzy sugerują, że zależy to bardziej od prawidłowej selekcji osób, których profile umieszczane są w bazie danych. Wydaje się, że sprawa warta jest bardziej szczegółowych badań, ale w przypadku polskiej bazy

make them properly aware of potential traps leading to the acceptance of dubious evidence, which can even lead to the passing of an erroneous verdict.

Importance of DNA database

A report published by ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) in 2006 demonstrates that successful results were yielded by 315 out of 439 completed mass DNA screening operations which often involved DNA profiling of a very large group of people who were not named as suspects but, for example, resided in the region in which a crime had been committed (www.enfsi.eu). Screens of this type are performed when investigators do not have any hypotheses about the identity of suspects in a given case. Despite being effective, mass DNA screening is a considerable economic and logistic challenge, and cannot be recognized as a standard procedure. The first criminal case to use DNA screening (an analysis of minisatellite markers) in the UK, and already on a mass scale, took place in 1987 and involved testing over 4000 men, ultimately leading to the identification of Colin Pitchfork as a perpetrator of two murders. In 1998, a total of 11 200 men were screened in Germany in a criminal case of rape and murder. Similar screens were also conducted in Poland in 2001, when 421 men were tested as part of the investigation into a series of rapes and murders which occurred in northern Poland [20]. Already back in 1995, geneticists introduced a tool which largely resolved the problem of the lack of potential suspects in cases involving biological traces left by the perpetrator on the crime scene. The first DNA database was established in the UK at the time, and other countries in Europe and worldwide soon followed. In their 2001 study, Schneider and Martin proposed that the effectiveness of DNA databases should depend on the number of stored DNA profiles [21]. Although the correlation seems intuitively obvious, a recent study conducted by Santos et al. (2013) on the basis of 2011 data shows that the so-called “performance ratio” (PR) describing the efficiency of the DNA database in terms of the quotient of the number of “hits” by the total number of DNA profiles in the database, does not necessarily increase linearly with the growing number of records [22]. The authors suggest that a more important factor is proper selection of people whose profiles are filed in the database. It appears that the issue needs more

danych konieczne jest podjęcie kroków zmierzających do podniesienia efektywności jej działania. Ze wspomnianych powyżej badań Santosa i wsp. wynika bowiem, że odsetek populacji Polski, której profile DNA znajdują się w bazie (0,07%), jest jednym z najniższych w Europie (niższą wartość – 0,06% – wyliczono jedynie dla Rumunii). Tak samo plasuje się również wartość parametru PR, wynosząca w wypadku Polski 0,01 (0,00 dla Rumunii). Parametr ten jest wprawdzie najwyższy dla Wielkiej Brytanii (0,31), która ma najwyższy w Europie odsetek populacji w bazie danych (wynosi on 10,26%), ale w krajach o znacznie niższym odsetku populacji uwzględnionej w bazie danych DNA, jak Szwecja (1,19%) czy Dania (1,41%), parametr PR jest niewiele niższy od brytyjskiego i wynosi odpowiednio 0,3 i 0,27. Jednocześnie we Francji wartość PR wynosi zaledwie 0,03 przy odsetku populacji w bazie na poziomie 2,91%. Wspomniany raport Santosa korzysta z danych z 2011 r., kiedy w bazie polskiej było 28 376 profili DNA porównawczych i 2483 profile DNA ze śladów biologicznych [22]. Obecnie w bazie polskiej liczba wszystkich profili DNA osiągnęła wartość 40 612, w tym 4501 profili DNA ze śladów biologicznych (ustalenia z 21.08.2014 r.). Mimo tego wydaje się, że potencjał narodowej bazy danych DNA w Polsce wciąż nie jest do końca wykorzystywany i konieczna jest odpowiednia polityka informacyjna i szkoleniowa w tym względzie. Istotna jest świadomość potrzeby wprowadzania do bazy profili DNA pozyskanych z próbek porównawczych i z wszystkich śladów biologicznych zbadanych w niewyjaśnionych sprawach. Warto byłoby również wnikliwie sprawdzić, skąd wynikają tak istotne różnice pomiędzy różnymi krajami w stosunku wartości parametru PR i odsetka populacji uwzględnionego w bazie, aby wypracować model szwedzki lub duński, a nie podążać szlakiem krajów, których nakłady związane z bazą danych są wysokie, a efektywność niezadowalająca. Wprawdzie pomysł gromadzenia danych DNA od wszystkich obywateli nie spotkał się z akceptacją, ale bez wątpienia bazy danych DNA będą się rozrastać, zwłaszcza w krajach takich jak Polska, gdzie odsetek uwzględnionego społeczeństwa jest bardzo niewielki.

Nowe narzędzia badawcze w genetyce sądowej

Badania podstawowe nad zmiennością genetyczną człowieka otwierają nowe możliwości w dzie-

in-depth research, however the Polish database definitely requires measures to improve its performance because the above-mentioned study by Santos et al. demonstrates that only 0.07% of Poland's population have DNA profiles in the database. The rate ranks among Europe's lowest (only Romania has a lower value of 0.06%), similarly to the performance ratio which, in Poland's case, is 0.01 (0.00 for Romania). The parameter is the highest in the UK (0.31), which also has Europe's highest population rate in the database (10.26%). Nevertheless, there are countries with much lower population rates covered by the database, for example Sweden (1.19%) or Denmark (1.41%), whose PR levels amount to 0.3 and 0.27, respectively, and are thus only slightly lower than the UK figure. By contrast, the PR determined for France is barely 0.03 despite the country's 2.91% of the population being included in the database. The Santos report is based on 2011 data, when the Polish database contained 28 376 reference DNA profiles and 2483 DNA profiles obtained from biological traces [22]. The total number of DNA profiles in the Polish database has now reached 40 612 – including 4501 profiles determined from biological traces (data as of 21 Aug 2014). Despite that, it appears that the potential of the Polish national DNA database still has not been fully exploited, and an appropriate information and training policy is definitely required in this area. It is crucial to raise the awareness about the importance of entering in the database DNA profiles obtained from reference samples and from all biological traces investigated in unresolved cases. It would also be advisable to perform an in-depth check to determine the underlying cause of significant inter-country differences in PR values and population rates included in the database. The ultimate goal should be to copy the Swedish or Danish pattern rather than follow in the footsteps of countries that make high financial outlays on the database without achieving satisfactory performance levels. Although the idea to gather DNA data from all citizens has not met with approval, DNA databases are likely to expand – particularly in countries such as Poland, where the population rate represented in the database is very low.

New research tools in forensic genetics

Basic research into human genetic variability opens up new possibilities in the field of forensic

dzinie genetyki sądowej. Dla potrzeb identyfikacji osobniczej zoptymalizowano testy, które korzystają z polimorfizmu typu SNP [23], a także polimorfizmu typu INDEL [24]. Testy te znajdują klasyczne zastosowanie do identyfikacji sprawców przestępstw oraz ich ofiar, a także w badaniach nad pokrewieństwem i stanowią interesujące uzupełnienie standardowych testów opartych na analizie *loci* STR. Poszerzono również panel *loci* STR znajdujący zastosowanie w badaniach o charakterze sądowym, m.in. o tzw. szybko mutujące mikrosatelity zlokalizowane na chromosomie Y, które umożliwiają różnicowanie mężczyzn blisko spokrewnionych w linii ojca [25].

Opracowywane są jednocześnie nowe narzędzia badawcze, które mogą znajdować zastosowanie podczas prowadzonego dochodzenia. Ich znaczenie jest podobne do znaczenia opisywanych powyżej baz danych DNA i polega na zawężeniu kręgu osób, które mogą stać się podejrzanymi w sprawie. Zasadniczo zastosowanie takich metod ograniczone jest wyłącznie do spraw, w których ani wstępne typowanie podejrzanych, ani analiza bazy danych DNA nie przyniosły rozwiązania, i jest określane jako fenotypowanie DNA dla celów kryminalistycznych (*forensic DNA phenotyping* – FDP) [26]. Wśród nowych metod, z których mogą skorzystać śledczy, na szczególną uwagę zasługują określanie pochodzenia biogeograficznego [27–29], predykcja pigmentacji (koloru oczu, włosów i skóry) [30–32], a także przybliżanie chronologicznego wieku człowieka [33–35]. Metody te pozwalają na uzyskanie względnie wiarygodnych wyników i mogą być stosowane również do analizy starego materiału kostnego [36]. Z wyjątkiem predykcji wieku metody te nie wymagają inwestowania w dodatkową aparaturę badawczą. Najbardziej wiarygodne metody predykcji wieku człowieka polegają na analizie stopnia metylacji DNA wybranych *loci*, w przypadku których wykazano liniową korelację z wiekiem chronologicznym. Obecnie najczęściej wykorzystuje się w tym celu metodę pirosekwencjonowania. Istotnym aspektem analizy regionów genomu, które mają wpływ na fenotyp osobnika, jest wymiar etyczny, a w związku z tym również i prawny takich badań. W publikacji z 2009 r. poświęconej kwestiom predykcji cech fizycznych poprzez analizę DNA autorzy wnioskuje, że cechy fizyczne nie mogą być uznawane za informację intymną, gdyż jest ona powszechnie jawna, a ponadto analizy DNA w tym kierunku mają sens

genetics. For the purpose of personal identification, optimization has been performed for tests based on SNP polymorphism [23] and INDEL polymorphism [24]. The tests are classically applied in the identification of crime perpetrators and their victims, and in biological relationship tests. They are a valuable supplement to standard tests based on STR *loci* analysis. Also, the panel of STR *loci* which finds applications in forensic tests has been enlarged e.g. with rapidly mutating microsatellites located on the Y chromosome, which allow the differentiation of men who are closely related in the paternal line [25].

At the same time, new testing tools are being developed which may have applications at the stage of investigation. Their role is similar to the function of the DNA databases discussed above in that they make it possible to narrow down the group of people who could potentially be named suspects in the case. Essentially, the application of such methods is limited to cases in which neither preliminary typing of suspects nor a DNA database search bring any resolution, and is referred to as forensic DNA phenotyping (FDP) [26]. Among new methods available to investigators, special attention should be paid to the determination of biogeographic ancestry [27–29], prediction of pigmentation (colour of the eyes, hair and skin) [30–32], and approximation of human chronological age [33–35]. The methods make it possible to get relatively reliable results and are also suitable for the analysis of old bone material [36]. With the exception of age prediction, the methods do not require outlays on additional testing instruments. The most reliable methods of predicting human age involve the assessment of the degree of DNA methylation of selected *loci* which are known to be correlated linearly with the chronological age. The most common method currently used for this purpose is pyrosequencing. An important aspect in the analysis of genome regions which influence the phenotype of an individual is the ethical – and hence legal – dimension of such tests. In their 2009 publication discussing problems related to the prediction of appearance traits by DNA analysis, the authors conclude that appearance traits cannot be regarded as intimate information because they are commonly known. Furthermore, DNA analysis aimed at predicting physical traits only makes sense for samples of biological traces left by unknown in-

dla próbek śladów biologicznych pochodzących od nieznanych osób, a zatem nie ma mowy o pogwałceniu praw człowieka. Nie widzą również problemu ochrony danych osobowych, gdyż ani genotyp, ani informacja o fenotypie nie jest przechowywana w bazach danych [37]. Wskazana byłaby bardziej rygorystyczna regulacja tej kwestii w Polsce, a więc odpowiednie uzupełnienie do ustawy o policji, która przekreśliłaby jakiegokolwiek spekulacje na temat legalności tego typu badań. W Holandii stosowna poprawka do Holenderskiego kodeksu postępowania karnego, która umożliwia analizę FDP śladu biologicznego ujawnionego na miejscu zdarzenia kryminalnego i pochodzącego od nieznanego osoby, została wprowadzona w 2003 r.

Standardowa analiza identyfikacyjna z zastosowaniem markerów STR nie sprawia obecnie większych problemów przy stosowaniu protokołów opracowanych przez producentów zestawów do izolacji DNA, pomiaru stężenia DNA, PCR i rozdziału produktów amplifikacji. Jak już wspomniano, to interpretacja uzyskanych wyników, zwłaszcza jeśli oznaczone profile DNA są niekompletne i/lub stanowią mieszaniny DNA, może być trudna, a wnioski wyciągnięte przez różnych biegłych nie zawsze jednakowe. W takich przypadkach ekspertyza DNA może tracić obiektywizm, którym pozytywnie wyróżnia się na tle ekspertyz niektórych innych nauk sądowych. Nie ma ustalonych standardów dotyczących interpretacji i prezentacji wyników, które uzyskano, prowadząc badania nad analizą cech fenotypowych. W piśmiennictwie znaleźć można wiele modeli matematycznych i sposobów interpretacji, które korzystają z metod regresji, statystyki Bayesowskiej, a także drzew decyzyjnych [30, 38, 39]. Odbiorcy ekspertyz analizy predykcyjnej powinni być świadomi, że wartość dowodowa tych badań jest na razie nieporównywalnie niższa niż wartość analizy identyfikacyjnej za pomocą markerów STR i należy traktować je ze szczególną ostrożnością. Dynamicznie rozwijają się także metody określania typu tkanki, z której pochodzi DNA. Metody te również korzystają z postępu w biologii molekularnej i wykorzystują analizę mRNA, miRNA, a nawet wzoru metylacyjnego [40–44]. Metody te mogą pozwolić na identyfikację różnych wydzielin w śladach biologicznych stanowiących mieszaniny DNA.

dividuals, hence no violation of human rights takes place. Similarly, the authors see no problem with personal data protection because neither the genotype nor information about the phenotype is stored in any databases [37]. Nevertheless it seems that the issue should be more rigorously regulated in Poland through passing an appropriate addendum to the Act on Police. This measure would cut out all speculation about the legality of such actions. For example, in 2003 the Netherlands passed an appropriate amendment to the Dutch Criminal Procedure Code allowing FDP analysis of biological traces detected on the scene of a criminal act and left by an unknown person.

Standard identification analysis based on STR markers does not currently pose any major problems while following protocols developed by manufacturers of dedicated kits for DNA analysis, DNA concentration measurement, PCR and separation of amplification products. As mentioned above, a potential difficulty lies rather in the interpretation of results, especially when determined DNA profiles are incomplete and/or represent DNA mixtures. In such cases, conclusions drawn by different experts are not always uniform, and DNA assessment can lose its objectivity – i.e. a feature which distinguishes it favourably from assessments prepared by other forensic sciences. There are no established standards governing the interpretation and presentation of results obtained in analyses of phenotypic traits. Literature provides a variety of mathematical models and interpretation techniques which rely on regression methods, Bayesian statistics and decision trees [30, 38, 39]. Recipients of expert assessments based on predictive analysis should be aware of the fact that the probative value of such tests is, for the time being, incomparably lower than the value of identification analysis utilizing STR markers and, as such, should be approached with special caution. Rapid development is also taking place in methods of determining the type of tissue from which DNA comes. The methods also make use of the progress that has been achieved in molecular biology, utilizing mRNA and miRNA profiling, and even the methylation pattern [40–44]. The methods can be useful in the identification of various secretions in biological traces constituting DNA mixtures.

Potencjał sekwencjonowania następnej generacji

Znaczenie sekwencjonowania następnej generacji (*next-generation sequencing* – NGS) dla nauk biomedycznych trudno przecenić, a najprawdopodobniej będzie się ono nadal zwiększać. Stosowane obecnie metody NGS pozwalają na uzyskanie sekwencji DNA całego genomu człowieka za cenę ok. 1000 USD, co sprawia, że w niedalekiej przyszłości sekwencjonowanie genomów człowieka będzie można prowadzić na skalę populacyjną [45]. Dzięki NGS coraz bardziej realnego kształtu nabiera medycyna spersonalizowana, rozwija się także antropologia molekularna, która zaskakuje kolejnymi doniesieniami na temat sekwencji genomów sprzed kilkudziesięciu tysięcy lat i wnioskami o możliwych domieszkach genów pochodzących od Neandertalczyków i Denisowian u współczesnych ludzi. Wciąż nie określono jednoznacznie, jak wielkie znaczenie może mieć technika NGS dla genetyki sądowej. Coraz powszechniejszy staje się jednak pogląd, że w perspektywie czasu całkowicie wyeliminuje ona zastosowanie elektroforezy kapilarnej. Już teraz w literaturze przedmiotu dostępne są protokoły analizy całych genomów mitochondrialnych dla celów sądowych zarówno z wykorzystaniem technologii Ion Torrent PGM (Life Technologies) [46], jak i technologii Illumina MiSeq [47]. Obaj producenci pracują nad przygotowaniem rozwiązań przeznaczonych *stricto* dla genetyki sądowej. Muszą one bez wątpienia zapewniać wysoką czułość, dokładność i wiarygodność analizy. W naukach sądowych nie bez znaczenia pozostaje również prostota analizy, przepustowość aparatury i koszt badań. Trudno wyobrazić sobie panel użyteczny w laboratorium kryminalistycznym zajmującym się analizą DNA, który pozbawiony byłby podstawowych obecnie markerów identyfikacyjnych, jakimi są *loci* STR.

Profile DNA są zawarte w opisywanych wcześniej bazach danych DNA, stanowiących bardzo ważne narzędzie dla współczesnego wymiaru sprawiedliwości. Technologia 454 firmy Roche wykorzystująca metodę pirosekwencjonowania pozwala na szczególnie długie odczyty, co zostało wykorzystane do opracowania protokołów analizy *loci* STR [48–50]. Wykazano, że technologia 454 ma również wady, które nie sprowadzają się jedynie do wysokich kosztów badań. Stwierdzono, że frakcja pełnych odczytów jest

Potential of next-generation sequencing

The value of next-generation sequencing (NGS) for biomedical sciences is hard to overestimate, and it is likely to further increase in the future. Currently used NGS methods make it possible to perform human whole-genome DNA sequencing for a cost of ca. USD 1,000. This gives grounds to believe that in the foreseeable future it will be possible to carry out human genome sequencing on a population scale [45]. NGS should also be viewed as a technology paving the way for personalized medicine. Another growing field is molecular anthropology which continues to bring surprising insights about genome sequences going back to tens of thousands years ago, and conclusions about possible genetic admixtures from Neanderthals and Denisovans in contemporary humans. The potential importance of next-generation sequencing for forensic genetics still has not been unambiguously determined. However, an increasingly prevalent view is that NGS will gradually completely phase out capillary electrophoresis. There are already literature reports containing protocols of whole mitochondrial genome analyses performed for forensic purposes, both based on Ion Torrent PGM (Life Technologies) [46] and Illumina MiSeq technologies [47]. Both manufacturers are currently working on the development of solutions targeted specifically at applications in forensic genetics. Such products must unquestionably ensure high sensitivity, accuracy and reliability of analysis. Other desirable characteristics in forensic sciences include simplicity of analysis, high throughput of equipment and low cost of testing. It seems difficult to imagine a forensic laboratory performing DNA tests that would employ a panel not including STR *loci* which are now recognized as key identification markers.

DNA profiles are held in above-described DNA databases which are a very important tool for the modern justice system. Roche's 454 platform based on the method of pyrosequencing enables particularly long reads, which has been utilized for the development of protocols for STR *loci* analysis [48–50]. However, the 454 technology has also been found to suffer from certain disadvantages which go beyond high costs of testing. The fraction of full reads has been shown to be small, and the

niewielka, a błąd sekwencjonowania traktów homopolimerowych wysoki. To stawia pod znakiem zapytania zastosowanie tej technologii w rutynowych badaniach prowadzonych w laboratoriach kryminalistycznych. Wydaje się, że analiza *loci* STR musi się stać priorytetem dla firm, które chcą zaszczerpić technikę NGS na gruncie nauk sądowych. Rzeczywiście, zaproponowano wykorzystanie technologii Illuminy do analizy *loci* STR [51] i firma ta w proponowanym panelu dla kryminalistyki uwzględnia *loci* STR (<http://www.illumina.com/applications/forensics.ilmn>). Life Technologies również ma w planach analizę STR dla celów identyfikacji człowieka z wykorzystaniem technologii Ion Torrent PGM (http://www.slideshare.net/Lifetech_HID/).

Bez wątplenia przy zastosowaniu technologii NGS rośnie ilość informacji uzyskiwana dla *loci* STR, bo uzyskiwane są dane na temat przeróżnych wariantów allelicznych [48]. Większa rozdzielczość zwiększa potencjał każdego z analizowanych markerów. Trudno w tym momencie jednoznacznie powiedzieć, czy obie wiodące obecnie technologie (PGM i MiSeq) równie dobrze poradzą sobie ze specyfiką powtarzalnych sekwencji mikrosatelitarnych, ale jeśli tak, to bez wątplenia będzie to kluczowy krok do wdrożenia technologii NGS w rutynowych badaniach identyfikacyjnych w laboratoriach kryminalistycznych. Poza standardowymi aplikacjami, w których niezbędne wydaje się na obecnym etapie wykorzystanie analizy markerów STR, pojawiają się inne pomysły wykorzystania technologii NGS w badaniach sądowych. Niedawno zaproponowano analizę całych genomów w celu identyfikacji bliźniąt jednojajowych. W publikacji przedstawiono dowody na to, że tuż po podziale blastocysty prowadzącym do powstania bliźniaczych płodów dochodzi do rzadkich mutacji, które mogą być wykrywane za pomocą NGS [52]. Można to wykorzystać do różnicowania bliźniąt. Inne aplikacje korzystające z technologii NGS, które mogą znaleźć zastosowanie w kryminalistyce, to np. analiza kilkudziesięciu genów istotnych w nagłej śmierci wynikającej z arytmii [53] lub polimorficznych *loci*, których analiza może być wykorzystywana do określania pochodzenia biogeograficznego lub predykcji cech fizycznych. Nie ma wątpliwości co do tego, że jeśli uda się rozwiązać problemy natury technicznej, zwłaszcza związane z analizą *loci* STR i analizą bioinformatyczną, oraz jeśli możliwe będzie maksymalne uproszczenie procedury analizy pró-

error rate in sequencing homopolymeric tracts is high. These findings put into question the use of the technology in routine tests carried out in forensic laboratories. It seems that the analysis of STR *loci* must become a priority for companies which seek to incorporate NGS into forensic sciences. In fact, Illumina's technology has been proposed for STR *loci* analysis [51], and the company offers a forensic panel containing STR *loci* (<http://www.illumina.com/applications/forensics.ilmn>). Life Technologies is also planning to launch STR analysis for human identification on the basis of Ion Torrent PGM technology (http://www.slideshare.net/Lifetech_HID/).

There is no doubt that using NGS increases the amount of information obtained for STR *loci* because the technology brings data about various allelic variants [48]. Higher resolution improves the potential of each of the markers under study. As of now, it is difficult to state precisely whether both leading technologies (PGM and MiSeq) will handle equally well the specificity of repetitive microsatellite sequences. However, if this proves to be the case, it will undoubtedly mark a key step towards the incorporation of NGS into routine identification tests in forensic laboratories. Aside from standard applications which at the current stage seem to necessitate STR marker analysis, other ideas for the application of NGS technology in forensic investigations are also emerging. Whole genome analysis has recently been proposed as a method for the identification of identical twins. The publication provides evidence that right after the division of the blastocyst which leads to the development of identical fetuses rare mutations arise which can be detected by next-generation sequencing [52]. The finding can be used for the differentiation of twins. Other applications relying on NGS technology which have potential uses in forensic science include the analysis of several dozen genes which are significant in cardiac sudden death due to arrhythmia [53] or polymorphic *loci* that can be analyzed to determine biogeographic origin or predict physical traits. It is clear that if technical problems are overcome – especially those associated with STR *loci* analysis and bioinformatic analysis – and it is possible to maximally simplify the procedure of sample analysis and library preparation, NGS may replace capillary electrophoresis. The change

bek, przygotowania bibliotek, to NGS może zastąpić elektroforezę kapilarną. Zysk ze zmiany technologii będzie znaczny dzięki zwiększeniu ilości informacji z pojedynczej analizy i rozdzielczości analiz mtDNA i STR, większej możliwości interpretacji mieszanin DNA oraz znacznemu zwiększeniu przepustowości. Pierwsze aplikacje NGS dla genetyki sądowej są już dostępne, proces pełnego wdrożenia nowej technologii opartej na całkowicie innej filozofii może zająć zaledwie kilka lat.

Wypracowywanie standardów w genetyce sądowej – badania i szkolenia

Utrzymanie odpowiednio wysokich standardów w tak szybko rozwijającej się dyscyplinie jak genetyka sądowa wymaga stałego szkolenia ekspertów oraz właściwego informowania i szkolenia odbiorców ekspertyz. Duże znaczenie ma wypracowywanie wspólnych standardów i następnie wdrażanie ich na poziomie lokalnym. Wydaje się, że techniczna analiza w genetyce sądowej prowadzona na całym świecie przy zastosowaniu jednolitych standardów oraz protokołów i procedur opracowanych przez producentów zestawów analitycznych nie sprawia obecnie większych trudności, zapewniając przy tym wysoką automatyzację badań. Szczególnie istotne jest natomiast ujednoczenie sposobu interpretacji dowodu z badania DNA i jego prezentacji w sądzie. Istnieje porozumienie dotyczące zastosowania ilorazu wiarygodności (*likelihood ratio* – LR) jako sposobu prezentacji wyniku z badania DNA, ale ta forma wyrażania dowodu z badania genetycznego wciąż nie jest powszechnie stosowana. Nie ma też rekomendacji w kwestiach szczegółowych, zwłaszcza w przypadku wspomnianych niepełnych profili DNA oraz mieszanin DNA, a prace nad tymi zagadnieniami trwają [54]. Zaproponowano potrzebę wykorzystania nowych metod analizy mieszanin DNA i ostatnio zaproponowano zastosowanie w tym celu metod regresji [55]. Lepsza integracja środowiska z pewnością sprzyja wypracowywaniu, jak również wdrażaniu wspólnych standardów badawczych. Cele te są realizowane w ramach międzynarodowego projektu EUROFORGEN-NoE, który prowadzi działania na rzecz integracji środowiska europejskich genetyków sądowych, a także edukacji osób w zakresie interpretacji dowodu z badania DNA. Szczegółowe badania przeprowadzone

in technology will bring a significant benefit by increasing the amount of information derived from a single analysis, improving the resolution of mtDNA and STR analyses, expanding possibilities for the interpretation of DNA mixtures and markedly increasing the throughput. The first NGS applications for forensic genetics are already available, and the process towards complete implementation of the new technology based on a totally different philosophy can take up to several years.

Development of standards in forensic genetics – studies and training

Maintaining appropriate standards in forensic genetics, which is a very rapidly developing field, requires ongoing training of experts as well as providing appropriate information and training to recipients of expert assessments. It is also of high importance to work out common standards, and to implement them at a local level. It seems that technical analysis in forensic genetics worldwide is performed on the basis of uniform standards and, as long as protocols and procedures developed by manufacturers of analytical kits are followed, it does not involve major difficulty, while ensuring a high degree of test automation. However, it is vital to harmonize the methods for interpreting DNA testing evidence and presenting it in court. Although there is a consensus about using the likelihood ratio (LR) as a means of presentation of DNA test findings, this form of expressing evidence based on genetic testing is not commonly employed. Likewise, there are no recommendations regulating detailed issues, especially in the case of incomplete DNA profiles and DNA mixtures mentioned above. Works on the resolution of these problems are currently under way [54]. Since a need to apply new methods of analyzing DNA mixtures has been identified, regression methods have lately been proposed for this purpose [55]. A better integration of the community is certainly conducive both to the development and implementation of common test standards. Such goals are pursued within the framework of the international project EUROFORGEN-NoE which carries out activities aimed at a closer integration of the community of European forensic geneticists, and education of people in the area of interpretation of DNA testing evidence. In-depth studies con-

przez konsorcjum EUROFORGEN-NoE wykazały, że zdecydowana większość (ok. 83%) laboratoriów w Europie ma w swoim panelu standardowe analizy identyfikacyjne w sprawach kryminalnych. Mniej niż 74% z nich wykonuje analizy i przygotowuje opinie w sprawach, w których analizowane są próbki zawierające małe stężenia DNA, tzw. LT-DNA. Analizę pokrewieństwa wykonuje ok. 71% laboratoriów (www.euroforgen.eu). Pozytywne jest, że 88% laboratoriów standardowo dokonuje pomiaru stężenia DNA. Ciekawym aspektem uwzględnionym w ankietach zastosowanych w badaniu przeprowadzonym przez EUROFORGEN-NoE było pytanie o potrzebę szkoleń, którą widzą laboratoria biorące udział w ankiecie. Ponad 80% respondentów zgłosiło potrzebę szkoleń w zakresie statystycznej interpretacji danych, podczas gdy szkoleniami z zakresu technicznej analizy zainteresowanych było niespełna 40% ankietowanych. Wynik ten jasno pokazuje, co sprawia największe problemy, a więc gdzie należy opracowywać skuteczne rozwiązania. Większość laboratoriów zainteresowana jest interpretacją statystyczną w przypadkach, które należy uznać za najtrudniejsze – w śladach LT-DNA, w których stwierdzono mieszaninę DNA. W próbkach tego typu bardzo częste są zjawiska *drop-out* i *drop-in* polegające na braku amplifikacji allelu, który w rzeczywistości jest obecny w DNA badanej osoby (*drop-out*), i pojawieniu się w profilu DNA allelu, którego w rzeczywistości nie ma w DNA badanej osoby, a jego obecność wynika z minimalnej kontaminacji próbki lub jest artefaktem reakcji PCR. Zjawiska te dodatkowo utrudniają interpretację mieszanin DNA. Konsorcjum EUROFORGEN-NoE aktywnie uczestniczy w pracy nad zagadnieniami szczegółowej statystycznej interpretacji dowodu z badania DNA [55–62]. Z badań EUROFORGEN-NoE wynika, iż ponad 80% jednostek zgłosiło posiadanie akredytacji lub prace nad jej uzyskaniem. Przyczyn rosnącego znaczenia akredytacji laboratoriów działających w obszarze genetyki sądowej można doszukiwać się w konieczności spełnienia wymagań Decyzji Ramowej Rady Unii Europejskiej nr 2009/905/WSiSW z 30 listopada 2009 r. [63] oraz wzroście świadomości odbiorców opinii z zakresu badań sądowych. Warto podkreślić, że rosnąca komercjalizacja usług w zakresie badań genetycznych, także tych wykonywanych w sprawach kryminalnych, pociąga za sobą konieczność uregulowania prawnego

ducted by the EUROFORGEN-NoE consortium have demonstrated that a vast majority (ca. 83%) of European laboratories have in their panel standard identification analyses in criminal cases. Below 74% of them carry out analyses and prepare assessments in cases with samples containing low concentrations of DNA (so-called LT-DNA). Biological relationship tests are performed by ca. 71% of laboratories (www.euroforgen.eu). A positive fact is that 88% of laboratories conduct DNA concentration measurements as a standard part of their activity. An interesting aspect included in questionnaires used in the study carried out by the EUROFORGEN-NoE consortium was the question about the training need noted by laboratories participating in the questionnaire. Over 80% of the respondents stated that training in statistical data interpretation was needed. In contrast, less than 40% expressed an interest in training focused on technical analysis. These results clearly expose the most problematic areas, i.e. aspects most urgently needing effective solutions. Most laboratories are interested in statistical interpretation in cases that should be regarded as the most challenging: LT-DNA traces found to contain a DNA mixture. Samples of this type are very frequently affected by “drop-out” and “drop-in” processes characterized by the absence of amplification of an allele which is actually present in the DNA of the tested person (“drop-out”) and the emergence in the DNA profile of an allele which is in fact absent from the tested person’s DNA, but its presence is due to minimal sample contamination or a PCR artefact. These phenomena add complexity to the interpretation of DNA mixtures. The EUROFORGEN-NoE consortium is actively involved in endeavours investigating detailed statistical interpretation of DNA testing evidence [55–62]. It is worthwhile to note that according to EUROFORGEN-NoE studies over 80% of the facilities are either already accredited or in the process of obtaining accreditation. Reasons for the growing importance of accreditation of forensic genetic laboratories should be attributed to the required compliance with provisions set out in Council Framework Decision 2009/905/JHA of 30 November 2009 [63] and to the increased awareness among recipients of forensic assessments. Importantly, the growing commercialization of genetic testing services – including those carried out in criminal cases

związanych z tym aspektów, a także kontroli jakości oferowanych usług. Jak wskazuje praktyka opiniodawcza, na sali sądowej w większości przypadków nie kwestionuje się podstaw naukowych dobrze udokumentowanych metod badawczych stosowanych w laboratoriach genetyki sądowej, lecz kompetencje personelu przeprowadzającego badania i aspekty techniczne związane z samą jednostką wykonującą oznaczenia. Posiadanie akredytacji na określone metody badawcze dostarcza odbiorcom wyników badań niezależnego dowodu na to, że podmiot w obszarach objętych normą PN EN ISO/IES 17025:2005 spełnia opisane w niej kryteria w każdym punkcie. W normie zawarto uregulowania odnoszące się do funkcjonowania systemu zarządzania jakością (obsługa klienta, działania niezgodne z wymaganiami, doskonalenie, działania zapobiegawcze i inne) i odpowiadające za techniczną stronę prowadzonych badań (konstrukcja laboratorium, personel, wyposażenie, sterowanie jakością badań i inne). W skrócie – norma reguluje wszystkie aspekty mające wpływ na wydawany wynik badania oraz wymusza na podmiocie określenie stopnia niepewności wydawanego wyniku. Należy podkreślić, że akredytacja nie daje absolutnej gwarancji, że produkt jest wolny od błędów, nie jest też przyznana na zawsze, lecz obowiązuje tylko przez określony czas, po upływie którego powtórnie weryfikuje się spełnienie wymagań. Zakres otrzymanej akredytacji reguluje też obszar badawczy oraz obiekty do badań, dla których badania wykonywane są metodami akredytowanymi.

Najbardziej aktywną obecnie międzynarodową organizacją zrzeszającą genetyków sądowych jest *International Society for Forensic Genetics* (ISFG). Działają przy niej różne grupy językowe, co ma sens w sytuacji, gdy liczba członków z danej grupy językowej jest duża. Zarejestrowanych jest 142 członków z Niemiec, 129 z Hiszpanii i 62 z Wielkiej Brytanii. W szeregach ISFG znajduje się obecnie bardzo niewielu Polaków – zaledwie 11 (dane z 25.08.2014 r.). Wydaje się, że aktywną rolę we wdrażaniu wspólnych standardów w zakresie ekspertyzy DNA w Polsce powinna odgrywać Komisja Genetyki Sądowej Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii (PTMSiK). Być może w przyszłości warto pomyśleć o lepszej integracji samych genetyków sądowych, których w skali kraju może być na pewno kilkudziesięciu. Wydaje się, że wciąż brakuje pod-

– calls for legal regulation of all associated aspects and quality control of available services. As the forensic assessment practice shows, in the majority of cases courts do not challenge the scientific foundations of well-documented testing methods used by forensic genetic laboratories, but tend to focus on the competence of testing personnel and technical aspects connected specifically with the laboratory responsible for testing. Holding an accreditation for using specified testing methods provides recipients of test results with an independent proof that a given laboratory – within areas covered by PN EN ISO/IES 17025:2005 – meets the criteria laid down in this standard in every respect. The standard contains regulations which can be divided into those referring to the operation of the quality management system (customer service, non-conformances with requirements, improvement, preventative actions, etc.) and those concerning the technical side of tests (laboratory design, personnel, equipment, testing quality control and others). In brief, the standard regulates all aspects affecting the issued test result, and requires the laboratory to define the degree of uncertainty of the issued result. It needs to be emphasized that accreditation is not an absolute guarantee that a product is error-free. Also, accreditation is not granted indefinitely but only for a specific term after which compliance with requirements is verified again. The scope of accreditation held by an institution also regulates the scope and objects of testing performed by means of accredited methods.

At present, the most active international organization associating forensic geneticists is *International Society for Forensic Genetics* (ISFG). The organization has different language groups, however this arrangement is only workable if the number of members from a given language group is large. For comparison purposes, Germany has 142 registered members, Spain – 129 members, and the UK – 62. Poland's ISFG membership now amounts to 11, which is a very small number (data of 25 Aug 2014). It seems that an active role in implementing common standards of DNA assessment in Poland should be played by the Committee of Forensic Genetics at the Polish Society of Forensic Medicine and Criminology (PTMSiK). In the future, it would be sensible to take measures for a better integration of the community of Polish forensic geneticists whose num-

miotu odpowiedzialnego za kształcenie ekspertów z zakresu analizy DNA w Polsce i kontrolę ich wiedzy. Realna szansa na uporządkowanie tego stanu rzeczy pojawiła się niedawno wraz z nową specjalnością z zakresu laboratoryjnej genetyki sądowej, w której kształcić się mogą osoby mające prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego, a więc zrzeszone w Krajowej Izbie Diagnostów Laboratoryjnych (www.kidl.org.pl).

Na stronie EUROFORGEN-NoE znaleźć można listę laboratoriów, które oferują miejsca dla przyszłych magistrów i doktorów (<http://www.euroforgen.eu/training/exchange-options/>). Takie informacje z pewnością mogą ułatwić zadanie studentom zainteresowanym zdobywaniem stopni naukowych z genetyki sądowej za granicą. Szkolenia dla pracowników wymiaru sprawiedliwości, a więc potencjalnych odbiorców ekspertyz genetycznych, w Polsce koordynuje Krajowa Szkoła Sądownictwa i Prokuratury (KSSiP), z którą wielu genetyków sądowych w Polsce aktywnie współpracuje. Wydaje się jednak, że wskazana i pożyteczna byłaby współpraca pomiędzy PTMSiK, w tym samą Komisją Genetyki Sądowej, a KSSiP. Warto wspomnieć również o inicjatywach edukacyjnych na poziomie uniwersyteckim. Specjalizacje na studiach dziennych oferują uniwersytety w Białymstoku i Lublinie. Uniwersytety Gdański, Łódzki, Adama Mickiewicza w Poznaniu, a także Jagielloński prowadzą studia podyplomowe z biologii sądowej. Ten ostatni aktywnie współpracuje z Instytutem Ekspertyz Sądowych w Krakowie i wcześniej proponował tę specjalizację w ramach studiów dziennych. Istotna jest kwestia finansowania badań i szkoleń z zakresu genetyki sądowej. Każde przedsięwzięcie naukowo-badawcze czy szkoleniowe wymaga środków finansowych. Wydaje się, że genetyka sądowa wymaga zwiększenia nakładów na badania, gdyż w przeciwieństwie do niektórych innych dyscyplin, np. genetyki medycznej, jest skąpo finansowana w Europie. W Polsce jedynym naturalnym celem dla grup badawczych ubiegających się o środki na badania z zakresu genetyki sądowej jest Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Warto jednak zauważyć, że agencja ta nie finansuje w zasadzie badań podstawowych, bez których trudno wyobrazić sobie postęp w opracowywaniu całkowicie nowych metod badawczych. Z badań EUROFORGEN-NoE wynika, że duża liczba laboratoriów zaangażowanych w analizy DNA

ber is estimated to be in the range of several dozen. Moreover, Poland still has no institution responsible for educating experts in DNA analysis, and for verifying their knowledge. A promising opportunity for remedying this situation has arisen recently along with the establishment of a new specialization in forensic laboratory genetics. The specialization is available to everyone who is formally authorized to perform the profession of laboratory technician, i.e. members of the National Chamber of Laboratory Diagnosticians (www.kidl.org.pl).

The EUROFORGEN-NoE website has a list of laboratories offering outplacement possibilities to future MA and PhD holders (<http://www.euroforgen.eu/training/exchange-options/>). Such information is definitely useful to students who are interested in pursuing research degrees in forensic genetics abroad. Training provided to employees of the Polish justice system, i.e. potential recipients of genetic assessments, is coordinated by the National School of Judiciary and Public Prosecution (KSSiP), an institution with which many forensic geneticists in Poland actively cooperate. It seems, however, that it would be both useful and instructive to ensure cooperation between PTMSiK (and the Committee of Forensic Genetics itself), and KSSiP. Another aspect to be mentioned concerns educational initiatives launched at the university level. Full-time specializations are offered by the universities in Białystok and Lublin. Post-graduate study programmes are available at the University of Gdansk, University of Lodz, Adam Mickiewicz University in Poznan and Jagiellonian University in Cracow. The latter actively cooperates with the Institute of Forensic Research in Cracow, and previously ran a full-time specialization in the field. Another significant aspect concerns the funding of research and training in forensic genetics. Every undertaking, either research- or training-oriented, needs financial resources. Forensic genetics seems to require increased research funding because, as opposed to certain other disciplines (e.g. medical genetics), it receives only limited funds across Europe. In Poland, the only natural target for research groups engaged in forensic genetic studies is the National Centre for Research and Development. It must be noted, though, that the agency does not essentially fund basic research. Without it, however, it is difficult to expect any progress in developing novel study methods. EUROFORGEN-NoE studies demonstrate

dla celów sądowych jest zainteresowana prowadzeniem badań naukowych, toteż wyodrębnienie puli środków na badania podstawowe w tej dyscyplinie zarówno na poziomie europejskim, jak i lokalnym wydaje się niezbędne.

Podsumowanie

Szybki postęp w genetyce sądowej sprawia, że konieczna jest właściwa edukacja biegłych zajmujących się analizą DNA i odbiorców ekspertyz, którzy korzystają z opinii z zakresu analizy DNA. Konieczne jest wypracowywanie i wdrażanie wspólnych standardów nie tylko na etapie technicznej analizy danych, ale przede wszystkim na etapie interpretacji danych z badania DNA i ich prezentacji w sądzie. Nowe możliwości w genetyce sądowej związane są zarówno z udoskonalaniem metod funkcjonujących od wielu lat, jak i wprowadzaniem całkowicie nowych narzędzi badawczych. Istotne znaczenie na etapie śledztwa ma baza danych DNA, ale pojawiają się również inne metody zawężające grono osób podejrzanych polegające na opisie fenotypu sprawcy przestępstwa. Wkrótce może dojść do zmiany technologii analizy DNA w badaniach sądowych, do czego należy się odpowiednio przygotować. Wskazana jest większa integracja i aktywność genetyków sądowych działających w Polsce, ich udział w organizacjach międzynarodowych (ISFG) oraz lokalnych (PTMSiK), a w przyszłości stworzenie własnych silnych struktur krajowych. Warto zadbać o sprawnie działające czasopismo naukowe, które miałoby charakter propagatorski i opiniotwórczy.

Publikacja powstała dzięki wsparciu uzyskanemu ze środków projektu o numerze 285487 (EUROFORGEN-NoE) finansowanego w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej (FP7/2007–2013). Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

References

1. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388–396.
2. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 746–756.
3. Hagelberg E, Erika IG, Gray IC, Jeffreys AJ. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 1991; 352: 427–429.

that a large number of laboratories performing DNA tests for forensic purposes would also be interested in pursuing research programmes. Therefore, it seems necessary to allocate a pool of funds for basic research in that discipline: both at the EU and local levels.

Summary

Rapid progress in the field of forensic genetics creates a need for appropriate education of experts preparing DNA assessments and recipients of assessments based on DNA analysis. It is necessary to work out and implement common standards not only at the stage of technical data analysis but, primarily, in the area of interpretation of DNA testing evidence and its presentation in court. New possibilities in forensic genetics arise both from improvements in methods which have been in use for many years and from the introduction of completely new research tools. At the stage of investigation, a key importance is given to the DNA database, however there are also new methods – based on phenotype analysis of the crime perpetrator – which allow the investigators to narrow down the group of suspects. Since a change in forensic DNA analysis technology is expected to take place soon, appropriate preparations must be initiated. It is advisable to strive towards a better integration and activity of Polish forensic geneticists. They should become more closely involved with international organizations (ISFG) and local agencies (PTMSiK), and aim at establishing robust national structures in the future. Another recommendation is to set up an efficiently operating scientific journal which would both spread knowledge and influence opinions.

The publication was prepared with support obtained under the project 285487 (EUROFORGEN-NoE) funded under the 7th Framework Programme of the European Union (FP7/2007–2013).

The authors declare no conflict of interest.



4. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 11141-11156.
5. Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl* 1993; 3: 13-22.
6. Butler JM. Sample collection, DNA extraction, and DNA quantitation. In: Butler JM. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier, Burlington – London 2005; 313-323.
7. Gunnarsson J, Eriksson H, Ansell R. Success rate of a forensic tape-lift for DNA recovery. *Problems of Forensic Sciences* 2010; 83: 243-254.
8. Verdon TJ, Mitchell RJ, van Oorschot RA. Evaluation of tapelifting as a collection method for touch DNA. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 8: 179-186.
9. Brownlow RJ, Dagnall KE, Ames CE. A comparison of DNA collection and retrieval from two swab types (cotton and nylon flocked swab) when processed using three QIAGEN extraction methods. *J Forensic Sci* 2012; 57: 713-717.
10. Marshall PL, Stoljarova M, Larue BL, King JL, Budowle B. Evaluation of a novel material, Diomics X-Swab™, for collection of DNA. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 12: 192-198.
11. Parys-Proszek A, Branicki W, Wolańska-Nowak P, Kupiec T. Application of BioRobot M48 to forensic DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2008; 1: 58-59.
12. Liu JY, Zhong C, Holt A, Lagace R, Harrold M, Dixon AB, Brevnov MG, Shewale JG, Hennessy LK. AutoMate Express™ forensic DNA extraction system for the extraction of genomic DNA from biological samples. *J Forensic Sci* 2012; 57: 1022-1030.
13. Liu JY. Direct qPCR quantification using the Quantifiler™ Trio DNA quantification kit. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13C: 10-19.
14. Flores S, Sun J, King J, Budowle B. Internal validation of the GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput automated workflow. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 10: 33-39.
15. Gray K, Crowle D, Scott P. Direct amplification of casework bloodstains using the Promega PowerPlex™ 21 PCR Amplification System. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 12: 86-92.
16. Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, Pokorak E, Prinz M, Salas A, Schneider PM, Parsons TJ. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 134-142.
17. Pascali V, Prinz M. Highlights of the conference ‘The hidden side of DNA profiles: Artifacts, errors and uncertain evidence’. *Forensic Science International Genetics* 2012; 6: 775-777.
18. Dror IE, Hampikian G. Subjectivity and bias in forensic DNA mixture interpretation. *Sci Justice* 2011; 51: 204-208.
19. Borsting C, Mogensen HS, Morling N. Forensic genetic SNP typing of low-template DNA and highly degraded DNA from crime case samples. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 345-352.
20. Dettlaff-Kakol A, Pawlowski R. First Polish DNA “manhunt” – an application of Y-chromosome STRs. *Int J Legal Med* 2002; 116: 289-291.
21. Schneider PM, Martin PD. Criminal DNA databases: the European situation. *Forensic Sci Int* 2001; 119: 232-238.
22. Santos F, Machado H, Silva S. Forensic DNA databases in European countries: is size linked to performance? *Life Sciences. Society and Policy* 2013; 9: 12.
23. Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 2006; 27: 1713-1724.
24. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, Carracedo Á, Gusmão L. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One* 2012; 7: e29684.
25. Ballantyne, KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, Choi Y, van Duijn K, Vermeulen M, Brauer S, Decorte R, Poetsch M, von Wurmb-Schwark N, de Knijff P, Labuda D, Vézina H, Knoblauch H, Lessig R, Roewer L, Ploski R, Dobosz T, Henke L, Henke J, Furtado MR, Kayser M. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet* 2010; 87: 341-353.
26. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 179-192.
27. Zaumsegel D, Pereira R, Rothschild MA, Phillips C, Gusmao L, et al. Comparative analysis of two indel-based ancestry informative multiplex PCR typing kits. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series* 2013; 4: e21-e22.
28. Gross TE, Zaumsegel D, Rothschild MA, Schneider PM, Combined analysis of two different ancestry informative assays using SNPs and Indels in Eurasian populations. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series* 2013; 4: e25-e26.
29. Phillips C, Parson W, Lundsberg B, Santos C, Freire-Aradas A, Torres M, Eduardoff M, Børsting C, Johansen P, Fondevila M, Morling N, Schneider P; EUROFORGEN-NoE Consortium, Carracedo A, Lareu MV. Building a forensic ancestry panel from the ground up: The EUROFORGEN Global AIM-SNP set. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: 13-25.
30. Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, Branicki W, Kayser M. The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 98-115.
31. Maroñas O, Phillips C, Söchtig J, Gomez-Tato A, Cruz R, Alvarez-Dios J, de Cal MC, Ruiz Y, Fondevila M, Carracedo Á, Lareu MV. Development of a forensic skin colour predictive test. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 10: 34-44.



32. Pośpiech E, Wojas-Pelc A, Walsh S, Liu F, Maeda H, Ishikawa T, Skowron M, Kayser M, Branicki W. The common occurrence of epistasis in the determination of human pigmentation and its impact on DNA-based pigmentation phenotype prediction. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: 64-72.
33. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Epigenetic predictor of age. *PLoS One* 2011; 6: e14821.
34. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* 2013; 49: 359-367.
35. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel KH, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümendorf TH, Wagner W. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol* 2014; 15: R24.
36. Draus-Barini J, Walsh S, Pośpiech E, Kupiec T, Głąb H, Branicki W, Kayser M. Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investig Genet* 2013; 4: 3.
37. Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 3: 154-161.
38. Branicki W, Liu F, van Duijn K, Draus-Barini J, Pośpiech E, Walsh S, Kupiec T, Wojas-Pelc A, Kayser M. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Hum Genet* 2011; 129: 443-454.
39. Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares de Cal M, Cruz R, Maroñas O, Söchtig J, Fondevila M, Rodriguez-Cid MJ, Carracedo A, Lareu MV. Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 28-40.
40. van den Berge M, Carracedo A, Gomes I, Graham EA, Haas C, Hjort B, Hoff-Olsen P, Maroñas O, Mevåg B, Morling N, Niederstätter H, Parson W, Schneider PM, Court DS, Vidaki A, Sijen T. A collaborative European exercise on mRNA-based body fluid/skin typing and interpretation of DNA and RNA results. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 10: 40-48.
41. Hanson EK, Ballantyne J. Circulating microRNA for the identification of forensically relevant body fluids. *Methods Mol Biol* 2013; 1024: 221-234.
42. Sirker M, Gomes I, Rothschild MA, Schneider PM. A 1-year time course study of human RNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series* 2013; 4: e164-e165.
43. Lindenbergh A, van den Berge M, Oostra RJ, Cleypool C, Bruggink A, Kloosterman A, Sijen T. Development of a mRNA profiling multiplex for the inference of organ tissues. *Int J Legal Med* 2013; 127: 891-900.
44. Park JL, Kwon OH, Kim JH, Yoo HS, Lee HC, Woo KM, Kim SY, Lee SH, Kim YS. Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 27: 147-153.
45. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014; 30: 418-426.
46. Parson W, Strobl C, Huber G, Zimmermann B, Gomes SM, Souto L, Fendt L, Delpont R, Langit R, Wootton S, Lagacé R, Irwin J. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 543-549.
47. McElhoe JA, Holland MM, Makova KD, Su MS, Paul IM, Baker CH, Faith SA, Young B. Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13C: 20-29.
48. Fordyce SL, Ávila-Arcos MC, Rockenbauer E, Børsting C, Frank-Hansen R, Petersen FT, Willerslev E, Hansen AJ, Morling N, Gilbert MT. High-throughput sequencing of core STR loci for forensic genetic investigations using the Roche Genome Sequencer FLX platform. *Biotechniques* 2011; 51: 127-133.
49. Van Neste C, Van Nieuwerburgh F, Van Hoofstat D, Deforce D. Forensic STR analysis using massive parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 810-818.
50. Scheible M, Loreille O, Just R, Irwin J. Short tandem repeat typing on the 454 platform: Strategies and considerations for targeted sequencing of common forensic markers. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 12: 107-119.
51. Bornman DM, Hester ME, Schuetter JM, Kasoji MD, Minard-Smith A, Barden CA, Nelson SC, Godbold GD, Baker CH, Yang B, Walther JE, Tornes IE, Yan PS, Rodriguez B, Bundschuh R, Dickens ML, Young BA, Faith SA. Short-read, high-throughput sequencing technology for STR genotyping. *Biotechniques* 2012; 0: 1-6.
52. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B. Finding the needle in the haystack: differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 9: 42-46.
53. Brion M, Blanco-Verea A, Sobrino B, Santori M, Gil R, Ramos-Luis E, Martinez M, Amigo J, Carracedo A. Next generation sequencing challenges in the analysis of cardiac sudden death due to arrhythmogenic disorders. *Electrophoresis* 2014; 35: 3111-3116.
54. Prieto L, Haned H, Mosquera A, Crespillo M, Alemañ M, Aler M, Alvarez F, Baeza-Richer C, Dominguez A, Doutremepuich C, Farfán MJ, Fenger-Grøn M, García-Ganivet JM, González-Moya E, Hombreiro L, Lareu MV, Martínez-Jarreta B, Merigioli S, Milans Del Bosch P, Morling N, Muñoz-Nieto M, Ortega-González E, Pedrosa S, Pérez R, Solís C, Yurrebaso I, Gill P. EuroforGen-NoE collaborative exercise on LRmix to demonstrate standardization of the interpretation of complex DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 9: 47-54.

55. Kaur N, Fonneløp AE, Egeland T. Regression models for DNA-mixtures. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: 105-110.
56. Haned H, Slooten K, Gill P. Exploratory data analysis for the interpretation of low template DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics* 2012; 6: 762-774.
57. Gill P, Hanned H. A new methodological framework to interpret complex DNA profiles using likelihood ratios. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 251-263.
58. Slooten KJ, Egeland T. Exclusion probabilities and likelihood ratios with applications to kinship problems. *Int J Legal Med* 2014; 128: 415-425.
59. Egeland T, Pinto N, Vigeland MD. A general approach to power calculation for relationship testing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 9: 186-190.
60. Egeland T, Dørum G, Vigeland MD, Sheehan NA. Mixtures with relatives: a pedigree perspective. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 10: 49-54.
61. Bleka Ø, Dørum G, Haned H, Gill P. Database extraction strategies for low-template evidence. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 9: 134-141.
62. Dørum G, Bleka Ø, Gill P, Haned H, Snipen L. Exact computation of the distribution of likelihood ratios with forensic applications. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 9: 93-101.
63. Decyzja Ramowa Rady UE 2009/905/WSiSW z dnia 30 listopada 2009 roku w sprawie akredytacji dostawców usług kryminalistycznych wykonujących czynności laboratoryjne. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* 2009; L.322/14-16.

Adres do korespondencji

dr hab. Wojciech Branicki
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
31-033 Kraków, Polska
e-mail: wojciech.branicki@uj.edu.pl

Address for correspondence

Wojciech Branicki
Institute of Forensic Research
Westerplatte 9
31-033 Krakow, Poland
e-mail: wojciech.branicki@uj.edu.pl

