



Zalecenia

Recommendations

Agnieszka Parys-Proszek<sup>1</sup>, Magdalena Marcińska<sup>1</sup>, Wojciech Branicki<sup>2,3</sup>, Ryszard Pawłowski<sup>4</sup>,  
Tomasz Kupiec<sup>1</sup>, Tomasz Grzybowski<sup>5</sup>, Marcin Woźniak<sup>5</sup>, Magdalena Spólnicka<sup>3</sup>, Renata Jacewicz<sup>6</sup>

## Badanie śladów LT-DNA – przegląd literatury i ogólne zalecenia Polskojęzycznej Grupy Roboczej Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG-PL)

### Examination of LT-DNA traces – literature overview and general recommendations of the Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics (ISFG-PL)

<sup>1</sup>Pracownia Genetyki Sądowej, Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie, Polska

<sup>2</sup>Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

<sup>3</sup>Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Policji, Warszawa, Polska

<sup>4</sup>Zakład Medycyny Sądowej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska

<sup>5</sup>Katedra Medycyny Sądowej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska

<sup>6</sup>Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

<sup>1</sup>Forensic Genetics Section, Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>3</sup>Central Forensic Laboratory of the Police, Warsaw, Poland

<sup>4</sup>Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdansk, Poland

<sup>5</sup>Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland

<sup>6</sup>Medical University of Lodz, Poland

#### Streszczenie

Dostępna literatura na temat śladów charakteryzujących się suboptymalną ilością DNA oraz praktyka badawcza ekspertów wskazują na złożoność problematyki dotyczącej badania śladów LT-DNA (*low template DNA*), począwszy od ich ujawniania, poprzez zabezpieczenie, analizę genetyczną, po interpretację wyników końcowych. Celem publikacji jest uporządkowanie dotychczasowej wiedzy na temat postępowania ze śladami typu LT-DNA oraz opracowanie wytycznych dotyczących ich badania rekomendowanych przez Polskojęzyczną Grupę Roboczą Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (PL-ISFG), które powinny być stosowane we wszystkich polskich laboratoriach wykonujących ekspertyzy z zakresu genetyki dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości.

**Słowa kluczowe:** LT-DNA, metody LCN, efekty stochastyczne, wirtualny i rzeczywisty profil DNA, wytyczne ISFG-PL.

#### Abstract

The available literature on traces characterised by a suboptimal amount of DNA, as well as expert research practice, show the complex nature of LT-DNA traces: from their detection and collection, through genetic analysis, up to the interpreta-

tion of final results. The aims of this paper are to systematise the current state of knowledge on handling LT-DNA traces and develop examination guidelines, as recommended by the Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics (ISFG-PL). The proposed guidelines should be followed by all Polish laboratories conducting forensic genetic analyses for the purpose of judicial proceedings.

**Key words:** LT-DNA, LCN methods, stochastic effects, virtual and real DNA pool profile, ISFG-PL guidelines.

## Wstęp

Po wprowadzeniu do badań identyfikacyjnych multipleksowych systemów nowej generacji, pozwalających na jednoczesną amplifikację wielu markerów mikrosatelitarnych STR (*short tandem repeat*), charakteryzujących się znaczną czułością i odpornością na inhibicję, wyzwaniem dla genetyków sądowych nie jest już możliwość wygenerowania profili DNA ze śladów biologicznych, ale właściwa, zgodna z obowiązującymi wytycznymi interpretacja wyników profilowania genetycznego. Konsekwencją ulepszenia zestawów przeznaczonych do analizy markerów mikrosatelitarnych jest otrzymywanie w wielu przypadkach profili genetycznych, których jakość sprawia trudności interpretacyjne [1]. Problem ten dotyczy szczególnie śladów typu LT-DNA (*low template DNA*). Charakteryzują się one niską ilością/jakością matrycy DNA, co powoduje, że narażone są w dużym stopniu na wystąpienie podczas reakcji PCR efektów stochastycznych, które negatywnie wpływają na jakość otrzymywanych wyników badań genetycznych [1–4]. Duża liczba publikacji poświęconych tematyce badania śladów LT-DNA wskazuje na złożoność tego zagadnienia. *International Society for Forensic Genetics* zaleca szczególnie ostrożne raportowanie wyników analizy śladów zawierających niską ilość/jakość matrycowego DNA, przy zachowaniu odpowiednich procedur postępowania [5, 6]. W polemicznych artykułach dotyczących kwestii analizy śladów typu LT-DNA omawiane są liczne problemy związane z badaniem tego typu próbek i sugerowane są rozwiązania pozwalające na zminimalizowanie ewentualnych nieprawidłowości w interpretacji otrzymywanych wyników badań [7, 8].

Celem publikacji jest szczegółowy przegląd fachowej literatury, uporządkowanie dotychczasowej wiedzy i opracowanie ogólnych zaleceń Polskoję-

## Introduction

Following the introduction of new-generation multiplex systems into genetic identification tests, enabling simultaneous amplification of multiple short tandem repeat (STR) microsatellite markers characterised by high sensitivity and resistance to inhibition, it is no longer a challenge for forensic geneticists to generate DNA profiles from biological traces. What remains problematic, though, is the correct interpretation of results of genetic profiling in compliance with the applicable guidelines. In view of improvements in kits dedicated to the analysis of microsatellite markers, in a number of cases the resulting genetic profiles are of a quality that leads to problems with interpretation [1]. The issue is particularly relevant in the analysis of LT-DNA (low template DNA) traces which are characterised by low quantity/quality of template DNA. As a consequence, they are highly exposed to stochastic effects during PCR, which adversely affects the quality of genetic test results [1–4]. The complexity of the issue is evidenced by the extensive number of publications addressing the topic of examination of LT-DNA traces. The International Society for Forensic Genetics recommends particular caution in the reporting of results obtained by analysing traces with template DNA of low quantity/quality, subject to compliance with appropriate procedures [5, 6]. Polemical papers on the topic of LT-DNA trace analysis highlight numerous problems associated with the examination of samples of this type, proposing solutions to minimise the risk of misinterpretation of analysis results [7, 8].

The aims of this paper are to present a detailed review of professional literature, systematise existing knowledge, and develop a set of general recommendations of the Polish Speaking Working

zycznej Grupy Roboczej Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG-PL) dla polskich laboratoriów genetyczno-sądowych w kwestii analizy próbek biologicznych o suboptymalnej ilości matrycy DNA, tj. śladów typu LT-DNA.

## Terminologia LT-DNA

Optymalna ilość matrycy DNA, która jest zalecana przez producentów zestawów używanych do identyfikacji genetycznej, mieści się w zakresie od 0,5 do 2 ng [8, 9]. Jednak w praktyce stosunkowo często w ekstraktach DNA uzyskiwanych ze śladów biologicznych odnotowuje się niskie wartości stężeń DNA, zjawiska degradacji, inhibicji, co wpływa na brak możliwości uzyskania optymalnych ilości matrycowego DNA. W konsekwencji może to prowadzić do uzyskiwania niekompletnych profili DNA, a w skrajnych przypadkach do braku możliwości ich oznaczenia. Problem ten został rozpoznany przez genetyków sądowych wiele lat temu i był szeroko dyskutowany zarówno w środowisku ekspertów wykonujących badania identyfikacyjne, jak i statystyków zajmujących się interpretacją danych genetycznych. Prawie 20 lat temu do określenia śladów zawierających poniżej 100 pg DNA użyto pojęcia LCN (*low copy number*) [10]. Termin ten został w późniejszym czasie zdefiniowany w kontekście analizy wyników uzyskiwanych poniżej progu stochastycznego wyznaczonego dla próbek o optymalnej ilości matrycy. Koncepcja analizy śladów LCN opierała się na wykorzystaniu niestandardowych technik analizy DNA, których celem było zwiększenie czułości detekcji próbek o suboptymalnej ilości matrycowego DNA. Pierwotnie metoda profilowania śladów LCN polegała na zwiększeniu liczby cykli reakcji PCR, później wprowadzono szereg innych modyfikacji poprawiających czułość analizy markerów genetycznych typu STR.

Obecnie na określenie śladów zawierających niską ilość matrycowego DNA używa się terminu LT-DNA (*low template DNA*). W tego rodzaju próbkach zwiększone jest ryzyko wystąpienia efektów stochastycznych i uzyskanie niekompletnych profili genetycznych w porównaniu ze standardowymi śladami [11, 12]. Niektórzy badacze uważają, że ślady zawierające poniżej 200 pg DNA należy traktować jako LT-DNA [7, 13, 14]. Inni, omawiając zagadnienia dotyczące tej problematyki, wskazują wartość stężenia poniżej 100 pg [12, 15, 16]. Przeciwnicy takiego podejścia twierdzą jednak, że niecelowe i sztuczne jest

Group of the International Society for Forensic Genetics (ISFG-PL) for Polish forensic genetics laboratories regarding the analysis of biological samples with a suboptimal amount of template DNA, i.e. LT-DNA traces.

## LT-DNA terminology

The optimal amount of template DNA recommended by the manufacturers of genetic identification kits is between 0.5 and 2 ng [8, 9]. In practice, however, DNA extracts obtained from biological traces fairly often have low DNA concentrations, and are affected by degradation and inhibition processes, which prevents obtaining optimal amounts of template DNA. This carries the risk of generating incomplete profiles or, in extreme cases, entirely eliminates the possibility of determining them. The problem was identified by forensic geneticists many years ago, and was widely discussed in the community of experts conducting identification tests and statisticians responsible for the interpretation of genetic data. Approximately twenty years ago, the term LCN (*low copy number*) was used to refer to traces containing less than 100 pg of DNA [10]. The term was later defined in the context of the analysis of results which are below the stochastic threshold determined for samples containing suboptimal template quantities. The concept of LCN trace analysis was based on the application of non-standard DNA analysis techniques aimed at enhancing the sensitivity of detection of samples with suboptimal amounts of template DNA. Originally, the method of LCN trace profiling involved increasing the number of PCR cycles. Later, a number of other modifications were introduced to enhance the sensitivity of STR genetic marker analysis.

Currently, the term LT-DNA (*low template DNA*) is used to refer to traces containing low amounts of template DNA. In such samples, the risk of stochastic effects and generation of incomplete genetic profiles is higher compared to standard traces [11, 12]. Some researchers claim that traces with less than 200 pg of DNA should be treated as LT-DNA [7, 13, 14]. Other scientists working within this area of study define the concentration below 100 pg [12, 15, 16]. However, opponents of this approach claim that distinguishing between LT-DNA and traces with optimal amounts of genetic material is pointless

rozgraniczanie LT-DNA i śladów o optymalnej ilości materiału genetycznego, gdyż nie istnieje konkretna wartość punktu odcięcia, którą można by zdefiniować na poziomie ilościowym. Zwracają uwagę, że w niektórych przypadkach możliwe jest otrzymanie pełnych profili genetycznych z próbek LT-DNA przy zastosowaniu metod konwencjonalnych [4, 11, 17]. W toku prowadzonych dyskusji naukowych uznano, że najlepszym źródłem informacji o ilości matrycy DNA w badanej próbce jest wynik rozdziału elektroforetycznego, czyli analiza otrzymanego profilu genetycznego. Zatem zaklasyfikowanie próbek do kategorii LT-DNA powinno uwzględniać zarówno dane ilościowe (wynik pomiaru stężenia DNA), jak i jakościowe, czyli szczegółową analizę elektroforegramów [11].

Należy wyraźnie rozróżnić pojęcia LT-DNA i LCN-DNA. Termin LT-DNA powinien być zachowany dla określenia próbek o niskiej ilości matrycowego DNA, które są w większym stopniu narażone na niekorzystne efekty stochastyczne niż próbki zawierające optymalną ilość materiału genetycznego. Natomiast pojęcia LCN należy obecnie używać w celu określenia modyfikacji warunków metod stosowanych zarówno na poziomie reakcji PCR, jak i post-PCR, które powodują zwiększenie czułości analizy, a tym samym dają szansę uzyskania pozytywnych wyników analizy genetycznej w próbkach typu LT-DNA [11, 12, 15, 16, 18].

## Rodzaje śladów LT-DNA

Suboptymalna ilość matrycy DNA w śladach biologicznych może wynikać z wpływu różnych czynników negatywnie oddziałujących na prawidłowy przebieg reakcji PCR, powodując uzyskanie niepełnych profili genetycznych, wyników niekwalifikujących się do dalszej analizy, a w skrajnych przypadkach brak oznaczenia profili genetycznych. Powszechnym typem śladów LT-DNA są próbki zabezpieczane ze śladów biologicznych zawierających niskie stężenia materiału genetycznego, co nie zapewnia optymalnej ilości matrycowego DNA podczas reakcji PCR. Innym czynnikiem utrudniającym analizę markerów STR jest zjawisko degradacji materiału genetycznego. Długotrwała ekspozycja śladów biologicznych w niekorzystnych warunkach środowiskowych (silne nasłonecznienie, wilgotność) może prowadzić do niepożądanych efektów w postaci uszkodzenia struktury DNA i zmniejszenia ilości nadającego się do amplifikacji matrycowego DNA. W wyniku degradacji materiału genetycznego w otrzymywanych profilach genetycznych w pierwszej kolejności obserwuje się

and serves no purpose, as there is no specific cut-off value that can be defined quantitatively. They argue that in some cases it is possible to generate complete genetic profiles from LT-DNA samples using conventional methods [4, 11, 17]. In the course of scientific discussions, it has been proposed that the best source of information on the amount of template DNA in the test sample is the result of electrophoretic separation (i.e. analysis of generated genetic profile). Consequently, sample classification in the LT-DNA category should be based on both quantitative data (result of DNA concentration measurement) and qualitative information, i.e. detailed analysis of electropherograms [11].

A clear distinction between the terms LT-DNA and LCN-DNA should be made. LT-DNA should be reserved for referring to samples containing a low amount of template DNA which are more prone to adverse stochastic effects than samples with optimal quantities of genetic material. In contrast, the term LCN should now be used to describe modifications in method conditions implemented both at the PCR and post-PCR levels to increase the sensitivity of analysis and hence offer a chance to obtain positive results of genetic analysis in LT-DNA samples [11, 12, 15, 16, 18].

## Types of LT-DNA traces

Suboptimal amounts of template DNA in biological traces may arise from multiple factors that have an adverse effect on the course of PCR, giving rise to incomplete genetic profiles or results which are not fit for further analysis or, in extreme cases, yielding no genetic profiles. A common type of LT-DNA traces are samples collected from biological traces which contain low concentrations of genetic material and thus fail to provide an optimal amount of template DNA during PCR. Another factor hindering the analysis of STR markers is the degradation of the genetic material. Prolonged exposure of biological traces in unfavourable environmental conditions (strong sunlight, humidity) may lead to undesirable effects such as damage to the DNA structure and reduction in the amount of amplifiable template DNA. Analysis of degraded genetic material results in genetic profiles which reveal immediate problems with the determination of genetic markers with greater lengths of DNA fragments [19].

problemy podczas oznaczania markerów genetycznych o większych długościach fragmentów DNA [19]. Zjawisko inhibicji może też być przyczyną ograniczenia efektywności reakcji PCR i niekorzystnie wpływać na jej przebieg, prowadząc do powstania niekompletnych profili DNA mimo optymalnego stężenia DNA w próbce. Inhibitory reakcji amplifikacji mogą występować we krwi, tkankach, próbkach ziemi, tekstyliach. Wchodzą one w interakcje bezpośrednio z DNA lub polimerazą DNA, blokując jej aktywność [20]. Wystąpienie zjawisk degradacji i inhibicji w próbkach biologicznych można stwierdzić już na etapie pomiaru stężenia materiału genetycznego, stosując w tych badaniach zestawy odczynników wykorzystujące metodę qRT-PCR (*quantitative real time PCR*). Wskaźniki degradacji i inhibicji są także stosowane w zestawach nowej generacji służących do oznaczeń markerów typu STR [21].

Obecnie, dzięki powszechnemu wykorzystywaniu w laboratoriach genetyczno-sądowych zestawów STR, cechujących się zwiększoną czułością badania i znaczną odpornością na inhibitory, obserwuje się istotny wzrost efektywności profilowania próbek typu LT-DNA. Dotyczy to szczególnie śladów kontaktowych (dotykowych). Są one pozostawiane na powierzchniach dowodów na skutek kontaktu osoby z danym przedmiotem. W przypadku tego typu śladów bardzo trudno jest określić rodzaj tkanki czy komórek stanowiących ich źródło, jak również mechanizm ich naniesienia. Dlatego przy raportowaniu wyników badań śladów kontaktowych należy zamieszczać w opiniach informacje na temat ich specyfiki i związanych z tym ograniczeń w interpretacji wyników [7, 11, 14]. Biegły wykonujący badania genetyczne powinien na zlecenie sądu przedstawić informacje o możliwych, najbardziej prawdopodobnych sposobach transferu śladów dotykowych w celu ułatwienia oceny przypadku podczas procesu sądowego [5, 11].

Najbardziej powszechnym mechanizmem naniesienia na dowody rzeczowe materiału genetycznego jest transfer pierwotny (*primary transfer*), czyli kontakt obiektu z bezpośrednim źródłem śladu. Badając próbki LT-DNA, należy jednak brać pod uwagę możliwość wystąpienia zjawiska transferu wtórnego (*secondary transfer*). Polega ono na przeniesieniu na obiekt za pośrednictwem wektora (osoby, przedmiotu) materiału genetycznego osób, które bezpośrednio nie miały kontaktu z tym obiektem. W literaturze wspomina się również o transferze trzeciorzędowym (*tertiary transfer*), w przypadku którego obserwuje się obecność dwóch wektorów pośredniczących w prze-

The phenomenon of inhibition may also reduce PCR efficiency and adversely affect the course of the reaction, leading to the formation of incomplete DNA profiles despite optimal DNA concentrations in test samples. Inhibitors of the amplification reaction can be found in blood, tissues, soil samples or textiles. They interact directly with DNA or with DNA polymerase, blocking its activity [20]. Degradation and inhibition phenomena can be detected in biological samples already at the stage of determining the concentration of genetic material by using reagent kits based on qRT-PCR (quantitative real time PCR). Degradation and inhibition indicators are also used in new generation kits dedicated to the analysis of STR markers [21].

At present, owing to the widespread use of STR kits characterised by enhanced sensitivity and marked resistance to inhibitors, a significant increase in the efficiency of LT-DNA sample profiling is observed in forensic genetic laboratories. This applies in particular to contact (tactile) traces which are left on the surface of evidence material following a person's contact with a given object. When analysing such traces, it is very difficult to determine the type of tissues/cells from which they are derived, or the mechanism of their deposition. Consequently, reports on the results of examination of contact traces should address their specific nature and point out limitations in the interpretation of results [7, 11, 14]. At the request of a court of law, a forensic expert conducting genetic testing should provide information on the possible (most likely) routes of transfer of tactile traces in order to facilitate case evaluation during court proceedings [5, 11].

The most common mechanism by which genetic material is left on physical evidence is primary transfer, i.e. contact of a particular object with the direct source of the trace. When evaluating LT-DNA samples, the possibility of secondary transfer should be taken into account. Secondary transfer involves the deposition of genetic material belonging to individuals that never had any direct contact with an object through a vector (a person or object). There have also been reports on tertiary transfer, which involves two vectors mediating the transfer of genetic material to objects [11, 16, 22]. Some scientists have observed that a certain proportion of people (termed "good DNA shedders") have a greater predisposition to leave their genetic material on surfaces [23]. However,

noszeniu materiału genetycznego na obiekty [11, 16, 22]. Część naukowców zauważyła, że niektórzy ludzie mają większe predyspozycje do pozostawiania swojego materiału genetycznego na podłożach (*good DNA shedder*) [23]. Sprawa ta nie jest jednak jednoznaczna, gdyż jak wykazano, istnieje szereg czynników zarówno biologicznych, jak i związanych z przyzwyczajeniami poszczególnych osób, które mogą wpływać na transfer pierwotny DNA, co sprawia, że nie jest możliwa prosta kategoryzacja osób jako lepiej lub gorzej rozsiewających swój DNA [24, 25].

## Artefakty reakcji PCR związane z analizą śladów typu LT-DNA

Analiza śladów LT-DNA jest zazwyczaj problematyczna, ponieważ wiąże się z otrzymaniem profili DNA o niskiej jakości i brakiem powtarzalności badań [7, 12, 26]. Próbkę o niewystarczającej ilości matrycowego DNA są narażone na zwiększone ryzyko efektów stochastycznych reakcji PCR w porównaniu z próbkami o optymalnej ilości matrycy. Zazwyczaj prowadzi to do powstawania szeregu artefaktów reakcji amplifikacji, które utrudniają interpretację wyników analizy próbek LT-DNA [4, 7–9].

### Nierównowaga ilościowa alleli w układzie heterozygotycznym (imbalance heterozygotyczny)

Nierównowaga ilościowa alleli heterozygoty (*heterozygote imbalance* lub *reduced heterozygote balance*) to częste i niepożądane zjawisko towarzyszące śladom LT-DNA. Wywołane jest preferencyjną amplifikacją jednego z pary alleli heterozygoty, prowadzącą do otrzymania dysproporcji sygnałów pochodzących od alleli heterozygoty, które w wyniku tego różnią się między sobą polem powierzchni/wysokością. Przyjmuje się, że wartość powierzchni/wysokości sygnału pochodzącego od niższego allela w próbce o optymalnej ilości/jakości DNA powinna przekraczać 60% powierzchni/wysokości allela wyższego w danym *locus* [27]. Dla śladów LT-DNA, narażonych na silne efekty stochastyczne, proporcje wysokości alleli heterozygoty są znacznie zaburzone i sygnał pochodzący od niższego allela często stanowi poniżej 60% sygnału wyższego allela. Ekstremalnym przypadkiem nierównowagi jest zjawisko typu *drop-out*, czyli brak detekcji allela siostrzanego w układzie heterozygotycznym

the issue is not entirely unambiguous, as a range of factors, both biological and related to individual habits, have been shown to affect primary DNA transfer. Consequently, the straightforward classification of people into “better” or “worse” DNA shedders is impossible [24, 25].

## PCR artefacts associated with the analysis of LT-DNA traces

The analysis of LT-DNA traces is usually problematic because it yields low-quality DNA profiles, and examinations lack repeatability [7, 12, 26]. Samples containing insufficient amounts of template DNA are more prone to the risk of stochastic effects of PCR compared to samples containing optimal amounts of template DNA. This usually results in a number of amplification artefacts hindering the interpretation of results of LT-DNA sample analysis [4, 7–9].

### Quantitative allelic imbalance in a heterozygous system (heterozygote imbalance)

Heterozygote imbalance (also referred to as reduced heterozygote balance) is a commonly occurring undesirable phenomenon associated with LT-DNA traces. Heterozygote imbalance is caused by the preferential amplification of one allele of a heterozygote pair, leading to an imbalance of signals from the heterozygous alleles which, as a result, differ in their surface area/height. It is recognised that the value of the surface area/height of the signal from the lower allele in a sample characterised by optimal DNA quantity/quality should exceed 60% of the surface area/height of the higher allele at a given *locus* [27]. In LT-DNA traces which are exposed to strong stochastic effects, the height ratios of heterozygous alleles are markedly affected, and the signal from the lower allele is often less than 60% of the signal from the higher allele. An extreme case of imbalance is the phenomenon of allelic *drop-out* in which a sister allele fails to be detected in a heterozygous system, resulting in the erroneous identification of a heterozygote as a homozygote [5, 28, 29]. Estimation of the signal ratio for heterozygous alleles is extremely important for the interpretation of DNA mixtures [27].

i w związku z tym błędna identyfikacja heterozygoty jako homozygoty [5, 28, 29]. Oszacowanie proporcji sygnału dla alleli heterozygoty jest niezwykle istotne przy interpretacji mieszanin DNA [27].

### Wypadanie alleli (zjawisko *drop-out*)

Brak oznaczenia zarówno jednego z alleli heterozygoty (allele *drop-out*) w wyniku preferencyjnej amplifikacji, jak i brak amplifikacji całego *locus* (*locus drop-out*) jest powszechnym zjawiskiem obserwowanym w badaniach śladów typu LT-DNA [7, 12, 14]. Prawidłowe rozpoznanie prawdopodobieństwa wystąpienia tego efektu ma istotne znaczenie w interpretacji wyników analizy genetycznej. Przeoczenie przez eksperta możliwości wystąpienia tego zjawiska może prowadzić do fałszywego wykluczenia poprzez uwzględnienie w raporcie badań pseudohomozygotycznych genotypów. Z drugiej strony może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem generowania fałszywych heterozygot w mieszaninach z pseudohomozygotycznymi *loci* [29]. Parametrem pomocnym w interpretacji zjawiska wypadania alleli jest próg stochastyczny – ST (*stochastic threshold*), zwany inaczej progiem detekcji homozygot (*homozygote threshold*) lub progiem utraty alleli (*drop-out threshold*). Wyznacza on granicę wysokości sygnału wyrażonego poprzez RFU (*relative fluorescence units*), poniżej której istnieje możliwość utraty allela [5, 7, 29, 30]. Wartość progu stochastycznego ustala się empirycznie w trakcie wewnętrznych badań walidacyjnych i jest ona związana z indywidualnymi parametrami danego systemu detekcji. Próg stochastyczny musi być wyznaczony niezależnie dla każdego zestawu STR stosowanego w laboratorium do badań identyfikacyjnych [30]. Zakłada się, że powyżej tego progu zjawisko *drop-out* jest bardzo mało prawdopodobne. W związku z tym uznaje się, że pojedynczy sygnał allela o wysokości przekraczającej wartość ST wskazuje na wystąpienie w badanym *locus* homozygoty [29]. Użyteczność progu stochastycznego jest ograniczona w przypadku ujawnienia w śladach obecności mieszanin, zwłaszcza z udziałem więcej niż dwóch osób [1]. Zjawisko *drop-out* występuje z większą częstością w obrębie dłuższych sekwencji mikrosatelitarnych, co może wynikać z preferencyjnej amplifikacji krótszych fragmentów DNA, większego prawdopodobieństwa degradacji materiału genetycznego w obrębie dłuższych amplikonów, jak również ze zróżnicowania wy-

### Allelic drop-out

The lack of identification of one allele in a heterozygote (allele *drop-out*) due to preferential amplification, or the lack of amplification of the entire *locus* (*locus drop-out*), are among phenomena that are commonly observed during LT-DNA trace analysis [7, 12, 14]. Correct recognition of the likelihood of this effect is significant for the interpretation of genetic analysis results. Failure by an expert to consider the possibility of *drop-out* may lead to erroneous exclusion by including pseudohomozygous genotypes in the examination report. On the other hand, it may be associated with an increased risk of generating false heterozygotes in mixtures with pseudohomozygous *loci* [29]. A useful parameter in the interpretation of allelic *drop-out* is the stochastic threshold (ST), also known as the homozygote threshold or allelic *drop-out* threshold. It delineates the limit value of signal height expressed in RFU (relative fluorescence units), below which allelic loss is possible [5, 7, 29, 30]. The value of the stochastic threshold is determined empirically by internal validation studies, and it is linked to the specific parameters of a particular detection system. The stochastic threshold must be determined independently for each STR kit used in the laboratory for identification testing [30]. It is assumed that above this threshold *drop-out* is very unlikely. Consequently, it is considered that a single allele signal with a height exceeding the ST value indicates the presence of a homozygote at the studied *locus* [29]. The utility of the stochastic threshold is limited when traces are found to contain mixtures, especially involving more than two individuals [1]. *Drop-out* occurs at a greater frequency within longer microsatellite sequences, which may be due to the preferential amplification of shorter DNA fragments, higher probability of genetic material degradation in longer amplicons, and varied efficiency of the amplification reaction for different STR markers [12, 31]. The likelihood of allelic loss also depends on the amount of template DNA. The lower the signal height of the identified allele, the higher the probability of the *drop-out* effect [5]. If the evaluated genetic profile is marked by a prominent *locus drop-out* effect, the probability of loss of a sister allele of a heterozygote in the remaining *loci* increases [26].

dajności reakcji amplifikacji poszczególnych markerów STR [12, 31]. Prawdopodobieństwo utraty alleli zależy również od ilości matrycowego DNA. Im niższa wysokość sygnału oznaczonego allela, tym wyższe prawdopodobieństwo efektu *drop-out* [5]. Zaobserwowano, że w przypadku wystąpienia w oznaczonym profilu genetycznym nasilonego efektu *locus drop-out*, zwiększa się prawdopodobieństwo utraty allela siostrzanego heterozygoty w pozostałych *loci* [26].

### **Pozorna kontaminacja (piki typu *drop-in*)**

Wzrost czułości stosowanych obecnie zestawów multipleksowych pozwala na skuteczniejsze profilowanie śladów LT-DNA, ale może wiązać się również ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia tzw. pozornej kontaminacji (*spurious contamination*) na etapie przedlaboratoryjnym lub laboratoryjnym [6, 10, 12]. W takich sytuacjach obserwuje się zjawisko amplifikacji przypadkowego allela (*allelic drop-in*). Polega ono na ujawnieniu w profilu DNA pojedynczych, dodatkowych alleli, które nie pochodzą z badanej próbki [5, 6, 11, 12]. Nawet nieznaczna domieszka materiału genetycznego (np. obecność pojedynczych komórek, fragmentów chromosomów, produktów PCR) może doprowadzić do pojawienia się dodatkowych alleli w oznaczanych markerach genetycznych, szczególnie w sytuacji zastosowania metody z panelu technik LCN (np. wprowadzenie zwiększonej liczby cykli reakcji amplifikacji, zwiększenie czasu iniekcji podczas rozdzielania elektroforetycznego). Sugeruje się, że w pewnych sytuacjach sygnały pochodzące od niektórych pików typu *drop-in*, które pokrywają się z sygnałami pików *stutter*, nie są efektem pozornej kontaminacji, lecz artefaktami powstałymi na skutek błędnego działania polimerazy podczas reakcji amplifikacji. Takie zjawisko jest charakterystyczne dla śladów typu LT-DNA [32]. Zjawisko *drop-in* może być także wywołane zanieczyszczeniem odczynników chemicznych lub drobnego sprzętu laboratoryjnego [5]. Należy odróżnić zjawisko *drop-in* od typowej kontaminacji, określanej w literaturze angielskiej jako *gross contamination* [11, 18]. Efekt *drop-in* dotyczy pojawiania się pojedynczych alleli z różnych, niezależnych źródeł, natomiast typowa kontaminacja występuje w sytuacji, kiedy w profilu genetycznym próbki obserwuje się większą liczbę dodatkowych alleli pochodzących z pojedynczego, nieznanego źródła,

### **Spurious contamination (drop-in peaks)**

An increased sensitivity of the currently used multiplex kits translates into more effective profiling of LT-DNA traces. However, it may also be associated with an elevated risk of the so-called spurious contamination, which may occur either at the pre-laboratory or laboratory stages [6, 10, 12]. In such cases, the amplification of a random allele (*allelic drop-in*) may occur. It consists in the detection in the DNA profile of individual extra alleles which do not come from the test sample [5, 6, 11, 12]. Even a minor addition of genetic material (e.g. individual cells, chromosome fragments, PCR products) may result in the appearance of additional alleles in the evaluated genetic markers, especially when using a method from the panel of LCN techniques (e.g. increased number of amplification reaction cycles, longer injection time during electrophoretic separation). It has been suggested that in certain situations signals coming from some *drop-in* peaks which overlap with the signals of stutter peaks are not effects of spurious contamination, but rather artefacts caused by polymerase malfunction during the amplification reaction. The phenomenon is characteristic of LT-DNA traces [32]. *Drop-in* can also be caused by the contamination of chemical reagents or small laboratory equipment [5]. *Drop-in* should be distinguished from typical contamination which is usually referred to as “gross contamination” [11, 18]. The *drop-in* effect is characterised by the appearance of individual alleles from different, independent sources, while typical contamination occurs when the genetic profile of a sample reveals a greater number of extra alleles coming from a single, unknown source, which are usually repeated in subsequent amplifications of the contaminated sample [5, 11]. Currently used multiplex kits of the new generation are characterised by an increased incidence of allelic identifications resulting from the *drop-in* phenomenon [33]. There is no reliable method to unequivocally confirm the presence of *drop-in* in traces. To monitor for the occurrence of *drop-in*, negative controls should be tested at various stages of analysis at the same detection levels as the test samples [5, 9]. It should be highlighted, though, that because of its stochastic nature the phenomenon of *drop-in* may also appear when the negative control analysis



zazwyczaj powtarzalnych w kolejnych amplifikacjach zanieczyszczonej próbki [5, 11]. W obecnie stosowanych systemach multipleksowych nowej generacji obserwuje się zwiększenie ilości oznaczeń alleli wynikających ze zjawiska *drop-in* [33]. Nie istnieje wiarygodna metoda pozwalająca na jednoznaczne potwierdzenie obecności w śladzie zjawiska *drop-in*. W celu monitorowania jego występowania zaleca się obligatoryjne analizowanie na różnych etapach badań kontroli negatywnych na tych samych poziomach detekcji co badane próbki [5, 9]. Należy jednak zaznaczyć, że zjawisko *drop-in*, z uwagi na jego stochastyczny charakter, może się pojawiać również wtedy, kiedy wyniki analizy kontroli negatywnej nie wskazują na obecność dodatkowych alleli [5, 10]. W celu potwierdzenia bądź wykluczenia możliwości wystąpienia pozornej kontaminacji zaleca się przeprowadzenie powtórnej amplifikacji analizowanych śladów [33]. Ze względu na losowy charakter zjawiska *drop-in* dodatkowe allele nie są z reguły oznaczane w kolejnych reakcjach amplifikacji tej samej próbki [12].

### Podwyższony poziom pików typu *stutter*

Piki typu *stutter* stanowią artefakty reakcji PCR, które powstają na jej wczesnym etapie w wyniku tzw. poślizgu enzymu – polimerazy [34]. Są one z reguły krótsze lub rzadziej dłuższe o jedną jednostkę repetytywną w stosunku do sygnałów rzeczywistych alleli, sprawiając wrażenie występowania dodatkowych alleli (pseudoalleli) o słabszym sygnale w oznaczonym profilu DNA [6, 10, 35]. Na powstawanie tego rodzaju artefaktów ma wpływ wiele czynników. Wykazano, że siła sygnału w określonych pozycjach *stutter* jest zróżnicowana dla poszczególnych markerów [12, 34]. Obserwuje się również, że wysokość pików *stutter* zależy od liczby jednostek powtarzalnych w obrębie markera (długości allele), sekwencji oraz struktury jednostki powtarzalnej. Zjawisko „poślizgu” polimerazy zachodzi preferencyjnie w obrębie dłuższych alleli danego *locus*, natomiast w markerach genetycznych, w których jednostka repetytywna charakteryzuje się niejednorodną budową, większą liczbą nukleotydów, a także zmniejszoną zawartością zasad AT, odnotowuje się tendencję do obniżenia sygnału pików w pozycji *stutter* [34, 36, 37]. Zauważono, że zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia błędu polimerazy i w konsekwencji obniżenie wysokości artefaktów typu *stutter* można

results do not point towards the presence of additional alleles [5, 10]. To confirm/exclude the possibility of spurious contamination, repeat amplification of the analysed traces is the recommended course of action [33]. On account of the random nature of *drop-in*, additional alleles are not, as a rule, identified in subsequent amplification reactions of the same sample [12].

### Elevated level of stutter peaks

*Stutter* peaks are PCR artefacts which arise at an early reaction stage as a result of the so-called “slipping” of the enzyme polymerase [34]. They are usually shorter or (less commonly) longer by one repeat unit compared to signals obtained for true alleles, creating the impression that there are additional alleles (pseudo-alleles) with a weaker signal in the analysed DNA profile [6, 10, 35]. The formation of artefacts of this kind is influenced by a number of factors. The strength of signal in specific *stutter* positions has been shown to vary for different markers [12, 34]. It has also been noted that the height of *stutter* peaks depends on the number of repeat units within the marker (allele length), and the sequence and structure of the repeat unit. The phenomenon of polymerase “slipping” occurs preferentially within longer alleles of a given *locus*, while in genetic markers where the repeat unit is characterised by a heterogeneous structure, a greater number of nucleotides, and a reduced content of AT bases, there is a tendency for lower peak signals in *stutter* positions [34, 36, 37]. It has been observed that decreasing the probability of polymerase error and, consequently, reducing the height of *stutter* artefacts can be achieved by lowering the temperature of primer attachment to the DNA template strand, and by lowering the temperature at which DNA strand elongation occurs in the amplification process [34].

Before introducing multiplex kits for routine testing, genetic and forensic laboratories are expected to perform validation tests to establish *stutter* height thresholds for identified genetic markers. It is recognised that if the signal strength in the *stutter* position exceeds the thresholds estimated in internal validation tests, it should be identified as a true allele. However, the relationship applies to samples of good quality, containing an appropriate quantity of genetic material. In LT-DNA traces, and in traces

wywołać, obniżając temperaturę przyłączania starterów do nici matrycy DNA, a także obniżając temperaturę, podczas której zachodzi wydłużanie nici DNA w procesie amplifikacji [34].

Laboratoria genetyczno-sądowe przed wprowadzeniem do rutynowych badań zestawów multipleksowych są zobowiązane do wykonywania badań walidacyjnych w celu ustalenia progów wysokości pików typu *stutter* dla identyfikowanych markerów genetycznych. Przyjmuje się, że jeśli siła sygnału w pozycji *stutter* przekroczy progi oszacowane w wewnętrznych badaniach walidacyjnych, wówczas należy go uznać za prawdziwy allel. Ta zależność dotyczy jednak próbek o dobrej jakości i ilości materiału genetycznego. W śladach typu LT-DNA oraz w śladach będących mieszaninami materiału genetycznego wyznaczone progi pików typu *stutter* nie zawsze pozwalają na ich poprawne odróżnienie od rzeczywistych alleli [2, 4, 6, 22, 35]. W próbkach o suboptymalnej ilości materiału genetycznego obserwuje się często wzrost siły sygnałów w pozycji *stutter* [18, 34, 38]. Z tego powodu, aby potwierdzić występowanie prawidłowego allela w pozycji *stutter* podczas badań śladów LT-DNA, zaleca się wykonanie powtórnej reakcji amplifikacji próbki. Wynik można uznać za wiarygodny w przypadku oznaczenia allela o zwiększonej sile sygnału w pozycji *stutter* w co najmniej dwóch niezależnych amplifikacjach [12].

## Strategie stosowane podczas analizy próbek typu LT-DNA

Po stwierdzeniu, że badana próbka jest śladem typu LT-DNA, możliwe jest zastosowanie jednej z dwóch strategii postępowania. Pierwsza z nich polega na odstąpieniu od dalszych badań ze względu na uzyskanie niewystarczających danych ilościowych (skrajnie niskie wartości stężeń DNA) albo jakościowych, stwierdzonych po analizie otrzymanych wyników rozdzielów elektroforetycznych [37, 39]. Alternatywnym rozwiązaniem jest kontynuacja badań poprzez zastosowanie metod dających szansę uzyskania lepszych parametrów detekcji [2, 3, 12, 21, 26, 40].

### Odstąpienie od raportowania wyników

W niektórych sytuacjach decyzja o odstąpieniu od raportowania wyników analizy śladów LT-DNA może być słusznym rozwiązaniem. Eliminuje ona możliwość generowania błędów, które mogą pojawić

representing mixtures of genetic material, the thresholds determined for *stutter* peaks do not always allow correct differentiation from true alleles [2, 4, 6, 22, 35]. Samples containing suboptimal amounts of genetic material are often characterised by an increased strength of signals in the *stutter* position [18, 34, 38]. Therefore, when examining LT-DNA traces, a repeat amplification reaction is recommended for the sample to confirm the presence of the correct allele in the *stutter* position. The result may be considered reliable when an allele with an increased signal strength is identified in the *stutter* position in at least two independent amplifications [12].

## Strategies for the analysis of LT-DNA samples

After determining that a test sample is an LT-DNA-type trace, there are two possible strategies to follow. One involves refraining from further analysis after acquiring insufficient quantitative (extremely low DNA concentrations) or qualitative data, as determined by analysing the results of electrophoretic separations [37, 39]. An alternative solution is to continue analysis by applying methods which offer an opportunity to enhance the detection parameters [2, 3, 12, 21, 26, 40].

### Decision not to report results

In certain situations, it might be an appropriate strategy not to report the results of LT-DNA trace analysis. In this way, the risk of generating errors that may accompany the misinterpretation of problematic data is eliminated. It is important to note that LT-DNA traces, because of their small quantities of template DNA, are in the so-called “danger zone”, which results in significant exposure to the risk of undesirable stochastic effects [3, 39].

The decision not to conduct further testing of LT-DNA traces can be motivated by a number of factors, such as failure to detect genetic material at the stage of DNA concentration measurement or the acquisition of extremely low DNA values likely to result in negative or highly residual genetic profiling outcomes that are not eligible for inclusion in the final test report. The decision not to report the results should be based on the outcome of internal validation performed by correlating the measured

się przy niewłaściwej interpretacji problematycznych danych. Należy pamiętać, że ślady typu LT-DNA, ze względu na nieznaczną ilość matrycy DNA, znajdują się w tzw. strefie zagrożenia i w związku z tym są znacznie narażone na możliwość wystąpienia niepożądanego efektów stochastycznych [3, 39].

Powodem odstąpienia od przeprowadzenia dalszych badań śladów LT-DNA może być brak detekcji materiału genetycznego na etapie pomiaru stężenia DNA lub uzyskanie skrajnie niskich wartości prognozujących otrzymanie negatywnych lub bardzo szczątkowych wyników profilowania genetycznego, niekwalifikujących się do zamieszczenia w końcowym raporcie z badań. Taka decyzja o odstąpieniu powinna wynikać z rezultatów wewnętrznej walidacji, polegającej na skorelowaniu wartości pomiaru qRT-PCR z uzyskiwanymi oznaczeniami markerów STR. Dodatkowo, ze względu na możliwość wystąpienia ewentualnego błędu podczas pomiaru stężenia DNA metodą qRT-PCR, decyzję o rezygnacji z wykonania dalszych etapów badań należy podjąć po wykonaniu dwukrotnych pomiarów stężenia tej samej próbki, w celu uwiarygodnienia uzyskanych wyników [41].

W przypadku kontynuacji badań profilowania śladów LT-DNA polegających na wprowadzeniu metod dających szansę na poprawę jakości wyników powinno się niezwykle wnikliwie przeprowadzić ocenę jakości uzyskiwanych z takich próbek profili genetycznych. Podczas interpretacji wyników rozdziałów elektroforetycznych należy zwrócić uwagę na wysokość sygnałów oznaczonych alleli, wysokość sygnałów pików typu *stutter* czy możliwość wystąpienia innych efektów stochastycznych. W przypadku zaobserwowania nadmiernej ilości niekorzystnych zjawisk utrudniających poprawną interpretację danych właściwym podejściem może być odstąpienie od raportowania wyników badań genetycznych.

### Metody umożliwiające poprawę jakości wyników badań śladów LT-DNA

Opracowano różne techniki pozwalające na poprawę detekcji profili genetycznych w śladach LT-DNA. Zalicza się do nich metody z panelu LCN, replikacje reakcji amplifikacji (kilkukrotne powtórzenie reakcji amplifikacji tego samego izolatu DNA przy zachowaniu takich samych parametrów analizy) oraz niezależne amplifikacje izolatu DNA przy zastosowaniu różnych zestawów multipleksowych obejmujących

qRT-PCR values with the obtained STR marker identifications. Furthermore, on account of the possibility of an error during the measurement of concentration using the qRT-PCR method, the decision not to perform subsequent examination stages should be made after a double measurement of the concentration of the same sample in order to validate the results [41].

However, if LT-DNA trace profiling is continued with the use of methods aimed to enhance the quality of results, careful consideration must be given to the assessment of quality of genetic profiles obtained from such samples. When interpreting the results of electrophoretic separations, attention should be paid to the heights of identified allelic signals and *stutter* peaks, or the possibility of other stochastic effects. In cases with an excessive presence of unfavourable phenomena preventing correct data interpretation the appropriate approach may be to refrain from reporting genetic test results.

### Methods to enhance the quality of results of LT-DNA trace analysis

Various techniques have been developed with a view to improving the detection of genetic profiles in LT-DNA traces. These include methods from the LCN panel, replications of the amplification reaction (i.e. repeating the amplification reaction of the same DNA isolate several times while maintaining the same analysis parameters) and independent amplifications of the DNA isolate using different multiplex kits containing the same STR markers [3, 21]. The results of genetic testing of LT-DNA traces performed with non-standard methods always require very cautious interpretation, with strict adherence to the parameters determined on the basis of validation tests [26].

#### LCN methods

The concept of LCN is used today to refer to the application of various techniques enhancing the sensitivity of DNA analysis and thus offering a possibility to obtain genetic analysis results in samples containing low amounts of template DNA. An improvement in the quality of results of LT-DNA trace analysis can be achieved at various examination stages. Positive effects can be obtained through

mujących te same markery STR [3, 21]. Otrzymane wyniki badań genetycznych śladów typu LT-DNA przy użyciu niestandardowych metod powinno się poddać bardzo ostrożnej interpretacji przy ścisłym przestrzeganiu parametrów określonych na podstawie badań walidacyjnych [26].

## Metody LCN

Pojęcie LCN rozumiane jest dziś jako zastosowanie różnych technik zwiększających czułość analizy DNA i dzięki temu dających możliwość uzyskania wyników analizy genetycznej w próbkach zawierających niskie ilości matrycowego DNA. Poprawę jakości wyników badań śladów LT-DNA można uzyskać na różnych etapach ich analizy. Pozytywne efekty może dać zastosowanie po izolacji DNA dodatkowego zagęszczania i oczyszczania ekstraktu na kolumnkach z filtrem celulozowym lub krzemionkowym [7, 10, 41]. Wśród najczęściej stosowanych na etapie amplifikacji i po reakcji PCR metod LCN wyróżnia się: zwiększenie liczby cykli reakcji PCR, zmniejszanie objętości mieszaniny reakcyjnej, odsalanie produktów reakcji PCR, stosowanie tzw. wewnętrznego PCR (*nested PCR*), zagęszczanie próbek przed rozdzielaniem elektroforetycznym, zwiększanie czasu lub napięcia prądu podczas iniekcji przed elektroforezą [7, 10, 15, 38]. Wybór konkretnej techniki LCN zależy od uzyskanych wyników profilowania DNA. W sytuacji, gdy obserwuje się ponad 50% alleli w standardowym profilu DNA, zaleca się wydłużenie czasu iniekcji podczas elektroforezy. Natomiast kiedy występuje większa utrata alleli (powyżej 90%), preferowaną metodą jest zwiększenie ilości cykli PCR [26]. Należy zwrócić uwagę, że metody LCN bardzo często powodują nasilenie niekorzystnych zjawisk, takich jak: *drop-out*, *drop-in*, podwyższony poziom pików typu *stutter*, znaczna nierównowaga sygnału alleli heterozygoty, które utrudniają interpretację wyników badań [2, 9, 10, 12].

Najnowsze dane literaturowe wskazują, że efektywną techniką pomocną przy badaniu śladów o niskim stężeniu materiału genetycznego może być metoda bezpośredniego PCR (*direct PCR*) [16, 42, 43]. Polega ona na wykonaniu bezpośredniej amplifikacji zabezpieczonego śladu z pominięciem etapów ekstrakcji i pomiaru stężenia DNA. Dzięki temu możliwe jest wykorzystanie do reakcji amplifikacji całości materiału genetycznego znajdującego się w zabezpieczonej próbce. Z drugiej jednak strony

additional extract concentration and purification on columns with cellulose or silica membranes performed after DNA isolation [7, 10, 41]. The most common LCN methods used at the stage of amplification and after PCR include an increased number of PCR cycles, reduced volume of the reaction mixture, desalination of PCR products, application of the so-called nested PCR, concentration of samples before electrophoretic separation, and an increase in injection time or voltage before electrophoresis [7, 10, 15, 38]. The choice of a particular LCN technique depends on the results of DNA profiling. If more than 50% of alleles are observed in a standard DNA profile, the recommendation is to increase the electrophoresis injection time. In contrast, the preferred method in cases involving greater allelic loss (over 90%) is increasing the number of PCR cycles [26]. It needs to be stressed, though, that LCN methods tend to intensify unfavourable phenomena such as *drop-out* and *drop-in*, lead to a higher number of *stutter* peaks, and cause a significant imbalance in the signal of heterozygous alleles, causing difficulties with the interpretation of results [2, 9, 10, 12].

The latest published data show that an effective technique for the examination of traces with low concentrations of genetic material can be direct PCR [16, 42, 43]. The method involves direct amplification of collected trace material, eliminating the steps of extraction and measurement of DNA concentration. As a result, it is possible to use the entire genetic material contained in the collected sample in the amplification reaction. On the other hand, this approach eliminates the possibility of re-examining the trace, if it should be necessary [43].

If the laboratory practice is modified resulting in deviations from the standard methods based on the manufacturer's guidance and the laboratory's own validation tests, extended in-house laboratory tests need to be conducted [9, 43]. To this end, the basic analysis parameters should be determined, including the limit of quantification (LOQ) threshold, the limit of detection (LOD) threshold, and the stochastic threshold (ST, homozygote threshold = *drop-out* threshold), heterozygote balance, and the height of *stutter* peaks. The resulting parameters should be compared against those determined in the standard analysis of traces containing genetic material of optimum quantity and quality. Typically, parameter values estimated for LCN methods are more conse-

skutkuje to brakiem możliwości wykonania (w razie konieczności) ponownego badania śladu [43].

W przypadku wprowadzenia do praktyki laboratoryjnej jakiegokolwiek modyfikacji odbiegającej od standardowych metod opierających się na wytycznych producenta i własnych badaniach walidacyjnych konieczne jest przeprowadzenie rozszerzonych badań wewnątrzlaboratoryjnych [9, 43]. W tym celu należy wyznaczyć podstawowe parametry analizy, tj. próg oznaczalności LOQ (*limit of quantification threshold*), próg wykrywalności LOD (*limit of detection threshold*), próg stochastyczny ST (*stochastic threshold = homozygote threshold = drop-out threshold*), balans heterozygotyczny, poziom wysokości pików typu *stutter*. Oznaczone parametry należy porównać z tymi, które wyznaczono dla standardowej analizy śladów zawierających optymalną jakość i ilość materiału genetycznego. Wartości parametrów oszacowanych dla metod LCN są zazwyczaj bardziej konserwatywne niż dla standardowych metod analizy DNA [9].

### Replikacje reakcji amplifikacji i metody interpretacji wyników

W celu wykluczenia lub przynajmniej zminimalizowania efektów stochastycznych pojawiających się podczas badania próbek LT-DNA zaleca się przynajmniej trzykrotne przeprowadzanie reakcji amplifikacji tego samego izolatu DNA [26, 32, 44]. Wprowadzenie do badań genetycznych tej modyfikacji jest czasochłonne i kosztowne, jednak zwolennicy tego podejścia zwracają uwagę, że wykonanie powtórzeń reakcji amplifikacji ekstraktu śladu LT-DNA stwarza szansę otrzymania dokładniejszego oznaczenia jego profilu genetycznego [1, 2, 16, 26, 32, 38].

Wyniki otrzymane z kilku reakcji amplifikacji tej samej próbki wykorzystuje się do utworzenia profilu sumarycznego za pomocą metody określanej przez środowisko naukowe metodą łączenia/złożenia (*comoposite method*) lub metodą konsensusu (*consensus method*) [2, 26, 31]. Wymienione metody są klasyfikowane przez niektórych badaczy jako strategie pozwalające na utworzenie sumarycznych profili wirtualnych (*virtual pool profile*) [1, 31]. W przypadku wykonania powtórzeń reakcji amplifikacji śladu LT-DNA, w zależności od przyjętej procedury postępowania, można zamieścić w końcowym raporcie:

- profil łączny DNA (*composite profile*), będący sumarycznym profilem wirtualnym otrzymanym w wy-

rywne niż te wyznaczone przy użyciu standardowych metod analizy DNA [9].

### Replikacje reakcji amplifikacji i metody interpretacji wyników

In order to exclude, or at least minimise, the stochastic effects emerging during LT-DNA sample testing, the amplification reaction of the same DNA isolate should preferably be conducted at least three times [26, 32, 44]. However, introducing this modification to genetic testing is both time-consuming and costly. On the other hand, the supporters of this approach point out that repeating the amplification reaction of the LT-DNA trace extract offers an opportunity to determine its genetic profile with a greater precision [1, 2, 16, 26, 32, 38].

The results obtained from several amplification reactions of the same sample are used for generating a pool profile based on methods defined by the scientific community as the composite method or the consensus method [2, 26, 31]. The above-mentioned methods are recognised by some researchers as strategies supporting the development of virtual pool profiles [1, 31]. If the amplification reaction is repeated for an LT-DNA trace, depending on the adopted procedure, the following conclusions can be presented in the final report:

- DNA composite profile which is a virtual pool profile obtained with the composite method by combining all alleles detected in the replications of the amplification. This method, however, increases the phenomenon of *drop-in*, which is why some scientists advise against data analysis based on this approach [26],
- DNA consensus profile which is a virtual pool profile containing repeat alleles identified at least twice in successive PCR reactions. The approach used to develop a consensus profile makes it possible to eliminate the effects of accidental phenomena (such as *drop-in*) on the one hand, but fails to protect against *allele/locus drop-out* on the other. The consensus method is recommended by the scientific community as a more conservative technique than the composite method [2, 8, 25, 32].

Another example of a method using the results obtained by replicating the amplification reaction is a strategy aiming to create a real pool profile. It

niku metody łączenia/złożenia wszystkich alleli, które ujawniono w replikacjach amplifikacji; metoda ta prowadzi jednak do nasilenia zjawiska *drop-in* i z tego powodu niektórzy naukowcy odradzają analizę danych z użyciem takiego podejścia [26],

- profil konsensusowy DNA (*consensus profile*), będący sumarycznym profilem wirtualnym zawierającym powtarzalne allele, które ujawniono przynajmniej dwukrotnie w przeprowadzonych kolejno reakcjach PCR; podejście stosowane przy tworzeniu profilu konsensusowego pozwala z jednej strony na eliminację efektów przypadkowych zjawisk typu *drop-in*, z drugiej jednak nie zabezpiecza przed zjawiskami typu *allele/loci drop-out*; metoda ta jest zalecana przez środowisko naukowe jako bardziej konserwatywna w porównaniu z metodą łączenia [2, 18, 25, 32].

Innym przykładem metody wykorzystującej wyniki uzyskane z replikacji reakcji amplifikacji jest strategia zmierzająca do utworzenia rzeczywistego profilu sumarycznego (*real pool profile*). Otrzymuje się go w wyniku rozdziału elektroforetycznego próbki będącej połączeniem w równych proporcjach jej produktów uzyskanych z kilku reakcji amplifikacji. W odróżnieniu od podejścia *virtual pool profile*, metoda ta dostarcza informacji nie tylko jakościowych, lecz także ilościowych (znana jest rzeczywista wysokość/pole powierzchni sygnałów alleli), co może być wykorzystywane w niektórych programach służących do przeprowadzania analiz statystycznych [2, 38].

Różne strategie postępowania z ekstraktem materiału genetycznego typu LT-DNA w celu poprawy jakości wyników przedstawiono na rycinie 1, opracowanej na podstawie Benschop i wsp. [2].

Należy pamiętać o tym, że profile DNA uzyskane z użyciem metody replikacji amplifikacji powinny być pozyskane wyłącznie z tego samego ekstraktu DNA i przy tych samych parametrach analizy. Jeżeli podczas powtórzeń reakcji amplifikacji wprowadzi się różne metody LCN, to otrzymane profile nie mogą być użyte do tworzenia sumarycznych profili wirtualnych lub rzeczywistych, gdyż zostały uzyskane przy różnych zmiennych [31, 45]. Profile genetyczne z poszczególnych replikacji tej samej próbki LT-DNA mogą się różnić siłą sygnałów pochodzących od alleli, siłą sygnału pików typu *stutter*, nierównowagą ilościową alleli heterozygot oraz nasileniem innych efektów stochastycznych [26]. Ilość zmiennych wzrasta wraz ze spadkiem wysokości

is obtained through electrophoretic separation of a sample combining in equal proportions its products obtained from several amplification reactions. Unlike the “virtual pool profile” approach, this method provides not only qualitative but also quantitative data (the actual height/surface area of allelic signals is known), which can be used in some software applications designed for statistical analysis [2, 38].

Various strategies for handling extracts of LT-DNA genetic material to enhance the quality of analysis results are shown in Figure 1 (based on Benschop *et al.*) [2].

It needs to be emphasised that DNA profiles generated by replicating the amplification should be obtained exclusively from the same DNA extract and with the same analysis parameters. If different LCN methods are employed for replicating the amplification reaction, the resulting profiles cannot be used to generate virtual or real pool profiles because they were obtained at different variables [31, 45]. Genetic profiles resulting from individual replications of the same LT-DNA sample may differ in the strength of allele signals, signal strength of *stutter* peaks, heterozygote imbalance, and the intensity of other stochastic effects [26]. The number of variables increases as the allelic signal height in the DNA profile decreases. If more than 25% of the alleles in the analysed genetic profile are identified, three replications of the amplification reaction may be sufficient. However, if less than 25% of alleles are identified, it is recommended to perform up to four PCR replications. It has been observed that further increases in the number of replications fail to improve the quality of LT-DNA traces [26].

The approach based on replicating the amplification reaction is also useful when analysing mixtures with a low amount of template DNA, or in cases when in addition to the dominant component of the DNA mixture there is also a weaker component at the LT-DNA level [2].

### Amplification reactions using complementary PCR kits

In certain cases, the quality of genetic profiles determined from LT-DNA traces can be enhanced by applying the dual amplification strategy for the same sample, using a different (complementary) STR kit

sygnału alleli w profilu DNA. W przypadku oznaczenia ponad 25% alleli analizowanego profilu genetycznego trzy powtórzenia reakcji amplifikacji mogą być wystarczające. Natomiast w sytuacji identyfikacji poniżej 25% alleli zalecane jest wykonanie nawet czterech replikacji reakcji PCR. Zaobserwowano, że dalsze zwiększanie liczby replikacji nie poprawia jakości wyników śladów LT-DNA [26].

Podejście polegające na powtarzaniu reakcji amplifikacji jest również przydatne w przypadku analizy mieszanin o niskiej ilości matrycowego DNA lub w sytuacji, gdy oprócz dominującego komponentu mieszaniny DNA występuje słabszy komponent na poziomie LT-DNA [2].

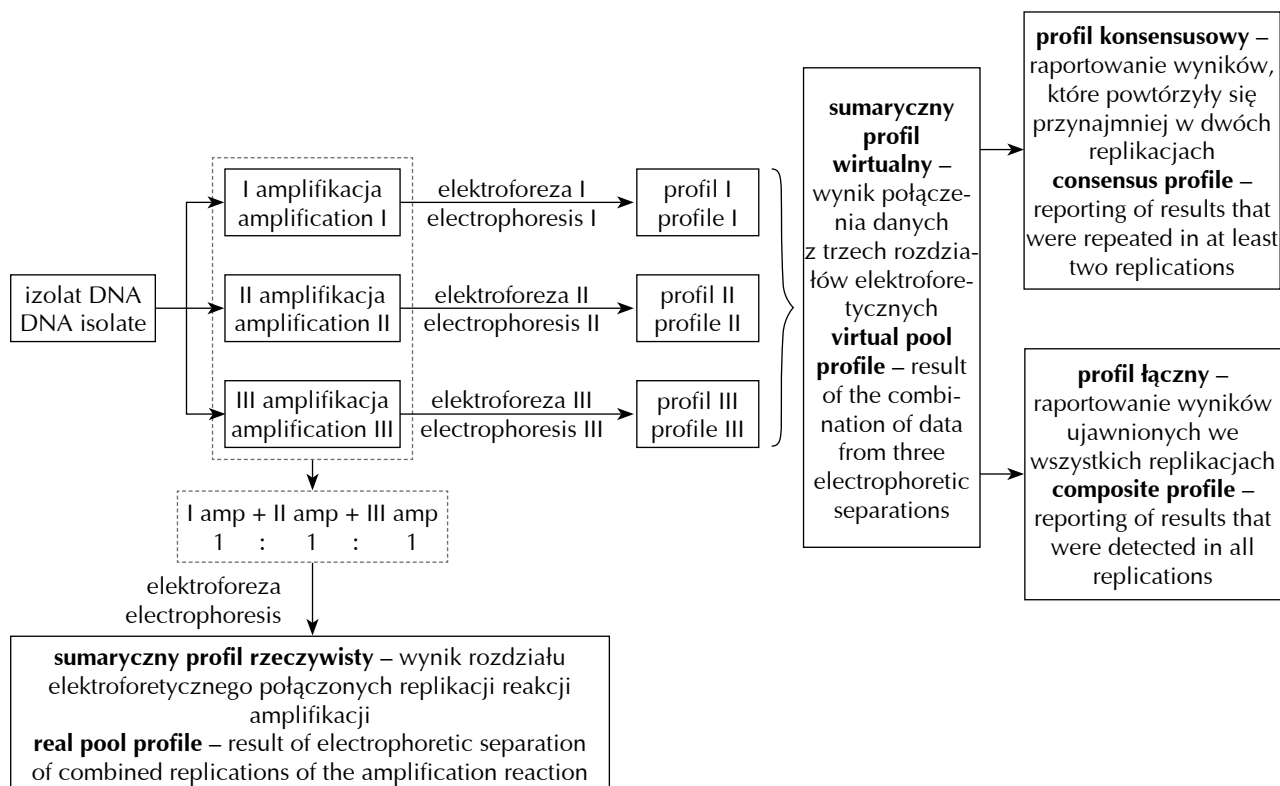
### Reakcje amplifikacji z zastosowaniem komplementarnych zestawów PCR

W pewnych przypadkach jakość otrzymanych profili genetycznych w śladach LT-DNA można poprawić, stosując strategię podwójnej reakcji amplifikacji (*dual amplification strategy*) tej samej próbki przy użyciu in-

approved by the community of forensic geneticists [3, 21, 40]. A change in the primer sequence leading to the shortening of amplicons in the multiplex kits of the latest generation has brought about an improvement in PCR efficiency. It is also relevant that in some cases the application of various primer sequences in different kits for the amplification of specific loci allows the identification of mutations in the sites of primer attachment, and thus may contribute to eliminating the phenomenon of apparent *locus/allele drop-out* [46, 47]. The strategy based on complementary kits is applicable for examining heavily degraded traces [3].

### Interpretation of results of LT-DNA trace analysis

Correct interpretation of results obtained by DNA profiling of LT-DNA traces represents a great challenge for genetic data experts. In line with the existing ISFG guidelines, it is recommended that the interpretation of results of LT-DNA trace ana-



**Ryc. 1.** Schemat postępowania podczas stosowania replikacji reakcji amplifikacji próbki typu LT-DNA (na podstawie Benschop i wsp. [2])

**Fig. 1.** Subsequent steps in the replication of amplification reaction of LT-DNA sample (based on Benschop *et al.*) [2]

nego (komplementarnego) zestawu STR akceptowanego przez środowisko genetyków sądowych [3, 21, 40]. Zmiana sekwencji starterów prowadząca do skrócenia długości amplikonów w zestawach multipleks najnowszej generacji spowodowała poprawę wydajności reakcji PCR. Nie bez znaczenia jest też to, że zastosowanie zróżnicowanych sekwencji starterów w różnych zestawach do amplifikacji określonych loci pozwala w niektórych przypadkach na identyfikację mutacji w miejscach przyłączania tych starterów, a tym samym może przyczyniać się do eliminacji pozornego zjawiska typu locus/allele *drop-out* [46, 47]. Strategia zastosowania komplementarnych zestawów znajduje zastosowanie w przypadku badania silnie zdegradowanych śladów [3].

## Interpretacja wyników analizy śladów LT-DNA

Właściwa interpretacja wyników profilowania DNA śladów LT-DNA stanowi bardzo duże wyzwanie dla eksperta zajmującego się opracowaniem danych genetycznych. Zgodnie z rekomendacjami ISFG zaleca się, by przy interpretacji wyników badań śladów LT-DNA stosować podejście probabilistyczne, oparte na obliczaniu ilorazu wiarygodności (*likelihood ratio* – LR) z uwzględnieniem najbardziej prawdopodobnych scenariuszy zdarzenia [5, 11]. W raportach z badań powinny być zawarte jedynie takie wyniki i konkluzje, które można w sposób bezsporny udokumentować, gdyż wynikają one ze statystycznych obliczeń przeprowadzonych na podstawie bezstronnych założeń. Obecnie dostępne są narzędzia statystyczne umożliwiające kalkulację LR przy uwzględnieniu prawdopodobieństwa wystąpienia zjawiska *drop-in* i *drop-out*. Jest także możliwe przeprowadzenie analiz statystycznych dla niezależnych replikacji tego samego śladu. Na swojej stronie internetowej grupa ISFG zamieściła listę ogólnodostępnych programów komputerowych do analizy statystycznej, zaznaczając, że nie wyróżnia żadnego z nich i nie udziela żadnych gwarancji dotyczących wydajności oprogramowania. Konieczne jest zatem, aby użytkownik zweryfikował, czy stosowany przez niego program spełnia obowiązujące standardy. Oprócz wymienionych przez ISFG programów statystycznych istnieją jeszcze inne pozwalające na statystyczne oszacowanie wyników otrzymanych podczas badania śladów LT-DNA [19, 48, 49].

Według rekomendacji ISFG z 2012 r. dopuszczalna liczba alleli typu *drop-in* w pojedynczym profilu

lysis should rely on the probabilistic approach, based on the calculated likelihood ratio (LR), taking into account the most probable event scenarios [5, 11]. Examination reports should contain only the results and conclusions that can be unequivocally documented as arising from statistical calculations based on unbiased assumptions. Currently available statistical tools enable the calculation of LR taking into account the probability of *drop-in* and *drop-out* phenomena. It is also possible to perform statistical analyses for independent replications of the same trace. The ISFG has posted on its website a list of generally available statistical software with a waiver stating that no preference is given to any of the computer programmes listed, and no guarantees are provided as to their performance. Therefore, the task of verifying whether the software used meets the applicable standards rests with the user. In addition to the statistical software listed by the ISFG, there are also other computer programmes for the statistical estimation of results obtained in LT-DNA trace analysis [19, 48, 49].

According to the ISFG recommendations of 2012, the acceptable number of *drop-in* alleles in a single genetic profile ranges from one to two. If more alleles are present, the recommended procedure is to include an additional person(s) when calculating the likelihood ratio [5]. Also, extreme caution is advised when interpreting results obtained for LT-DNA mixtures. It should be noted that pronounced stochastic effects impair the usefulness of some parameters of analysis (e.g. heterozygote imbalance, estimation of proportions of different components in the mixture) and increase the probability of *drop-out* and *drop-in* phenomena [6].

When reviewing the results of LT-DNA trace analysis in which incomplete genetic profiles are generated and the presence of adverse stochastic effects is noted, care should be taken to avoid the overinterpretation of results. In such cases, extreme caution should be exercised when drawing conclusions confirming or excluding the presence of genetic material belonging to a given individual. Failure to detect alleles characteristic of the genetic profile of the identified person in the LT-DNA trace where a poor-quality genetic profile was determined does not necessarily mean that the person's material is absent in the sample and its presence should be definitely ruled out [38, 50]. The profile of that person



genetycznym wynosi od jednego do dwóch alleli. W przypadku obecności większej liczby alleli, postuluje się przy wyznaczaniu wartości ilorazu wiarygodności włączenie dodatkowej osoby/osób [5]. Zaleca się także bardzo ostrożne interpretowanie wyników analizy mieszanin typu LT-DNA. Należy zwrócić uwagę, że nasilone efekty stochastyczne wpływają na ograniczenie użyteczności niektórych parametrów analizy (np. równowagi ilościowej alleli heterozygoty, szacowanie proporcji poszczególnych składników mieszaniny) i zwiększenie prawdopodobieństwa wystąpienia zjawisk typu *drop-out* i *drop-in* [6].

Podczas analizy wyników śladów LT-DNA, dla których uzyskano niekompletne profile genetyczne i zaobserwowano występowanie niekorzystnych efektów stochastycznych, należy unikać nadinterpretacji wyników. W takim przypadku zachodzi bezwzględna konieczność przeprowadzenia niezwykle ostrożnego wnioskowania w kierunku potwierdzenia lub wykluczenia obecności materiału genetycznego danej osoby. Nieujawienie alleli charakterystycznych dla profilu genetycznego wytypowanej osoby w śladzie LT-DNA, w którym oznaczono słabej jakości profil genetyczny, nie musi świadczyć o braku występowania jej materiału w badanej próbce i wskazywać na jej definitywne wykluczenie [38, 50]. Profil tej osoby może być nieoznaczalny na poziomie wykrywalności ze względu na niską jakość/iłość materiału genetycznego w otrzymanym ekstrakcie DNA. W związku z powyższym zaleca się w przypadku jakichkolwiek wątpliwości podczas interpretacji wyników śladów LT-DNA unikanie kategoriycznych sformułowań odnoszących się do pochodzenia danej próbki i poprzestanie jedynie na zamieszczeniu sformułowania o nierozstrzygającym wyniku badania genetycznego [51].

## Ogólne zalecenia analizy śladów LT-DNA

Zagadnienia związane z badaniem i analizą śladów typu LT-DNA, ze względu na ich złożoność, są szeroko omawiane w literaturze fachowej. Na obecnym etapie duża liczba problematycznych aspektów tej analizy nie stwarza możliwości wydania ścisłych rekomendacji w tym zakresie. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury, zaleceń międzynarodowych towarzystw genetycznych i aktualnego stanu wiedzy dotyczącej analizy śladów LT-DNA zalecamy polskim laboratoriom sądowym stosowanie ogólnych zasad podczas badania śladów zawierających suboptymalną ilość matrycowego DNA.

may be unquantifiable at the level of detection because of the low quality/quantity of genetic material in the obtained DNA extract. Therefore, whenever doubts arise as to the interpretation of results obtained for LT-DNA traces, categorical statements on the origin of a particular sample should be avoided, and the final report should be limited to stating that the genetic test result is inconclusive [51].

## General recommendations for the analysis of LT-DNA traces

On account of their complexity, issues related to the examination and analysis of LT-DNA traces are widely discussed in the professional literature. Nevertheless, at the current stage, multiple problematic aspects associated with the analysis prevent the development of strict recommendations in this field. Based on the literature review, recommendations issued by international genetic societies and the current state of knowledge on the analysis of LT-DNA traces, we recommend that Polish forensic laboratories apply general principles for the examination of traces containing suboptimal amounts of template DNA.

The principles of Good Laboratory Practice (GLP) should be employed both in the analysis of standard and LT-DNA traces. Furthermore, it should be noted that LT-DNA traces are extremely prone to contamination both at the pre-laboratory stage and during laboratory testing. Due to the fact that they are characterised by a low amount/quality of template DNA, in the event of contamination, contaminated DNA can be preferentially amplified in PCR. For this reason, when analysing LT-DNA traces, strict procedures should be followed, so that the possibility of contamination at successive stages of analysis is eliminated.

There are many types of modifications aimed at enhancing the quality of LT-DNA trace results which can be introduced after the stage of extraction of genetic material, during PCR, and after amplification.

If LCN methods are used, extended validation tests are required to duly consider all variables modifying the standard methods, and compare them with analogous validation parameters obtained in routine DNA analysis. Conducting validation experiments is a prerequisite for developing a strategy for the analysis of LT-DNA traces in any given laboratory.

Zasady dobrej praktyki laboratoryjnej (*good laboratory practice* – GLP) powinny być przestrzegane zarówno podczas badania standardowych śladów, jak i śladów typu LT-DNA. Należy zwrócić uwagę, że ślady LT-DNA są niezwykle silnie narażone na kontaminację na etapie przedlaboratoryjnym oraz w trakcie badań w laboratorium. Ze względu na to, że charakteryzują się one niską ilością/jakością matrycy DNA, w przypadku kontaminacji preferencyjnie w reakcji PCR może być powielane DNA pochodzące z zanieczyszczenia. Z tego powodu podczas badań śladów LT-DNA należy postępować według ściśle określonych procedur, co ograniczy możliwość kontaminacji na poszczególnych etapach badań.

Istnieje wiele rodzajów modyfikacji zmierzających do poprawy jakości wyników śladów LT-DNA, które można wprowadzić po etapie ekstrakcji materiału genetycznego, podczas reakcji PCR i po amplifikacji.

W przypadku stosowania metod LCN konieczne jest przeprowadzenie poszerzonych badań walidacyjnych, uwzględniających każdą ze zmiennych modyfikujących standardowe metody, jak również ich zestawienie z analogicznymi parametrami walidacyjnymi uzyskanymi dla rutynowej analizy DNA. Przeprowadzone eksperymenty walidacyjne są koniecznym elementem do opracowania strategii postępowania podczas analizy śladów LT-DNA w danym laboratorium.

Klasyfikacja śladów LT-DNA jest możliwa zarówno na podstawie danych pochodzących z pomiarów stężeń DNA izolatu, jak i danych jakościowych (ocena profili genetycznych w obrazie elektroforetycznym). Ze względu na zwiększone ryzyko narażenia na efekty stochastyczne analiza próbek LT-DNA powinna być przeprowadzana z dużą ostrożnością.

Specyficzną grupę śladów LT-DNA stanowią ślady, które powstają w wyniku kontaktu osoby z powierzchnią podłoża, tzw. ślady dotykowe/kontaktowe. Na ogół podczas analizy wyników powyższego typu śladów nie jest możliwe ustalenie źródła pochodzenia zabezpieczonej tkanki, mechanizmu i czasu jej naniesienia na dowód. Dlatego też przy raportowaniu uzyskanych danych dla śladów LT-DNA zaleca się zamieszczenie informacji na temat ograniczeń w interpretacji ich wyników.

W śladach LT-DNA występuje wysokie prawdopodobieństwo pojawienia się efektów stochastycznych. W celu zmniejszenia poziomu niepewności analizy śladów LT-DNA wskazane jest w niektórych

The classification of LT-DNA traces is possible both on the basis of data obtained by determining DNA isolate concentrations and qualitative data (evaluation of genetic profiles by electrophoresis). In view of an increase in the risk of exposure to stochastic effects, the analysis of LT-DNA samples should be performed with great care and caution.

A specific group of LT-DNA traces consists of traces arising from contact between a person and the surface of a substrate, which are referred to as “tactile/contact traces”. In principle, when analysing the results obtained for traces of this type, it is not possible to determine the source of collected tissue, and the mechanism and time of its deposition on the evidence material. As a result, when reporting data obtained for LT-DNA traces, it is recommended that suitable information be provided to clarify the limitations involved in the interpretation of their results.

LT-DNA traces carry a high probability of stochastic effects. In order to reduce the level of uncertainty in the analysis of LT-DNA traces, in some situations it is advisable to perform additional (at least three) amplification reactions, and report the results based on the laboratory’s strategy for data interpretation. Another potential way to improve the quality of genetic profiles generated for LT-DNA traces is to perform a repeat amplification reaction of the same DNA isolate using a different (complementary) genetic identification kit.

A cautious approach should be taken, and overinterpretation during the analysis of LT-DNA traces should be avoided, if insufficient data are obtained from analysis, preventing clear conclusions as to the possible presence or definite absence of the genetic material of the selected person in the collected trace. If any doubts exist, categorical statements should be avoided. Instead, examination reports should state that the results “do not allow conclusions as to whether the DNA of the examined person may be present in or absent from the evaluated LT-DNA trace”. Where insufficient quantitative/qualitative data are obtained for LT-DNA traces, the reporting of the results should be waived.

The results of LT-DNA trace analysis should be interpreted on the basis of probabilistic models comprising the estimation of the likelihood ratio taking into account the most probable event scenarios. The final opinion should contain only the

sytuacjach przeprowadzanie dodatkowych (przynajmniej trzykrotnych) reakcji amplifikacji i raportowanie wyników na podstawie przyjętej przez laboratorium strategii postępowania podczas interpretacji danych. Innym sposobem poprawy jakości otrzymanych profili genetycznych śladów LT-DNA może być wykonanie powtórnej reakcji amplifikacji tego samego izolatu DNA przy użyciu innego (komplementarnego) zestawu do identyfikacji genetycznej.

Należy zachować ostrożność i unikać nadinterpretacji podczas analizy śladów typu LT-DNA, jeśli uzyskano niewystarczające dane, które uniemożliwiają jednoznaczne wypowiedzenie się na temat możliwości występowania lub wykluczenia materiału genetycznego wytypowanej osoby w pozyskanym śladzie. W przypadku wystąpienia jakichkolwiek wątpliwości konieczne jest unikanie kategoriycznych sformułowań i zaleca się stosowanie stwierdzenia, iż wyniki „nie pozwalają na rozstrzygnięcie, czy DNA badanej osoby może występować/nie występuje w badanym śladzie typu LT-DNA”. W przypadku otrzymania niewystarczających danych ilościowych/jakościowych śladów LT-DNA należy odstąpić od raportowania wyników.

Interpretacja wyników badań śladów LT-DNA powinna być przeprowadzana za pomocą modeli probabilistycznych opartych na szacowaniu wartości ilorazu wiarygodności z uwzględnieniem najbardziej prawdopodobnych scenariuszy zdarzenia. W opinii powinny być zawarte jedynie takie wyniki i konkluzje, które można w sposób bezsporny udokumentować, gdyż wynikają ze statystycznych obliczeń przeprowadzonych na podstawie bezstronnych założeń.

Z uwagi na niezwykle gwałtowny postęp technologiczny, dynamiczny rozwój zaawansowanych metod biostatystycznych zaleca się ciągłe szkolenia i poszerzanie aktualnego stanu wiedzy biegłych, zwłaszcza w kontekście zasad właściwego interpretowania wyników, a ponadto również ujawniania i zabezpieczania śladów LT-DNA.

## Podziękowanie

Praca poświęcona pamięci dr Pauliny Wolańskiej-Nowak, wspaniałemu człowiekowi oraz wybitnemu prekursorowi i biegłemu w dziedzinie genetyki sądowej w Polsce.

*Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.*

results and conclusions that can be unequivocally documented as arising from statistical calculations based on unbiased assumptions.

In view of extremely rapid advances in technology and the dynamic development of modern biostatistical methods, forensic genetic experts are advised to pursue continuous training and expand their pool of knowledge, particularly in the context of the principles of correct interpretation of results, as well as the detection and collection of LT-DNA traces.

## Acknowledgement

Dedicated to the memory of Dr Paulina Wolańska-Nowak, an outstanding personality and a distinguished pioneer and expert in the field of forensic genetics in Poland.

*The authors declare no conflict of interest.*

## Piśmiennictwo

### References

1. Butler J. The future of forensic DNA analysis. *Phil Trans R Soc* 2015; 370: pii: 20140252. doi: 10.1098/rstb.2014.0252.
2. Benschop C, Haned H, Sijen T. Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures. *Int J Legal Med* 2013; 127: 11-23.
3. Pfeifer C, Klein-Unseld R, Klintschar M, Wiegand P. Comparison of different interpretation strategies for low template DNA mixtures. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 716-722.
4. Gill P, Haned H, Bleka O, Hansson O, Dorum G, Egeland T. Genotyping and interpretation of STR-DNA: low-template, mixtures and database matches—twenty years of research and development. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18: 100-117.
5. Gill P, Gusmao L, Haned H, et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 679-688.
6. Gill P, Brenner Ch, Buckleton JS, et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int* 2006; 160: 90-101.
7. Budowle B, Eisenberg A, van Daal A. Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croat Med J* 2009; 50: 207-217.
8. Budowle B. 2010. Available at: <https://pl.promega.com/resources/profiles-in-dna/low-copy-number-typing-still-lacks-robustness-and-reliability/>
9. SWGDAM. 2014. Guidelines for STR Enhanced Detection Methods.
10. Gill P, Whitaker J, Flaxman Ch, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int* 2000; 112: 17-40.
11. Gill P, Buckleton J. A universal strategy to interpret DNA profiles that does not require a definition of low-copy-number. *Forensic Sci Int Genet* 2010; 4: 221-227.
12. Petricevic S, Whitaker J, Buckleton J, et al. Validation and development of interpretation guidelines for low copy number (LCN) DNA profiling in New Zealand using the AmpFI STR SGM Plus™ multiplex. *Forensic Sci Int Genetics* 2010; 4: 305-310.
13. Linacre A. Review of low template DNA typing. *Forensic Sci Int Genet Suppl Series* 2009; 2: 549-550.
14. Caddy B, Taylor G, Linacre A. A review of the science of low template DNA analysis. 2008. Available at: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/117556/Review\\_of\\_Low\\_Template\\_DNA\\_1.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/117556/Review_of_Low_Template_DNA_1.pdf).
15. Grisedale K, van Daal A. Comparison of STR profiling from low template DNA extracts with and without the consensus profiling method. *Investig Genet* 2012; 3: 14.
16. Evans J, Hadi S. Low template DNA: tad, touch and traces. *J Foren Path* 2018; 3: 11.
17. Gill P, Hicks T, Butler J, et al. DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence – guidelines highlighting the importance of propositions Part I: evaluation of DNA profiling comparisons given (sub-) source propositions. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 36: 189-202.
18. Gill P, Guinness J, Iveson S. The interpretation of DNA evidence (including low-template DNA). *Forensic Science Regulator – FSR – G – 202*. 2012
19. Balding D. Evaluation of mixed-source, low-template DNA profiles in forensic science. *PNAS* 2013; 110: 12241-12246.
20. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors -occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2016; 113: 1014-1026.
21. Parys-Proszek A, Wróbel M, Marcińska M, Kupiec T. Dual amplification strategy for improved efficiency of forensic DNA analysis using NGM Detect™, NGM™ or Globalfiler™ kits. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 35: 46-49.
22. Gill P. Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK – past, present and future perspectives. *Biotechniques* 2002; 32: 366-385.
23. Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P. The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int* 2002; 129: 25-34.
24. Quinones I, Daniel B. Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 26-30.
25. Petricevic P. The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Sci Int* 2007; 168: 162-168.
26. Benschop C, Van der Beek C, Meiland H, Van Gorp A, Western A, Sijen T. Low template STR typing: effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 5: 316-328.
27. Clayton T, Whitaker J, Sparkers R, Gill P. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci Int* 1998; 91: 55-70.
28. Puch-Solis R, Kirkham A, Gill P, Read J, Watson S, Drew D. Practical determination of the low template DNA threshold. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 5: 422-427.
29. Gill P, Puch-Solis R, Curran J. The low-template-DNA (stochastic) threshold – its determination relative to risk analysis for national DNA database. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 3: 104-111.
30. SWGDAM. Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. 2017.



31. Bright J, Gill P, Buckleton J. Composite profiles in DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 317-321.
32. Cowen S, Debenham P, Dixon A, Kutranov S, Thomson J, Way K. An investigation of the robustness of the consensus method of interpreting low-template DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 5: 400-406.
33. Hansson O, Gill P. Characterization of artefacts and drop-in events using STR-validator and single-cell analysis. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 30: 57-65.
34. Seo SB, Ge J, King JL, Budowle B. Reduction of stutter ratios in short tandem repeat loci typing of low copy number DNA samples. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 8: 213-218.
35. Balding D, Buckleton J. Interpreting low template DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 4: 1-10.
36. Brookes C, Bright JA, Harbison S, Buckleton J. Characterising stutter in forensic STR multiplex. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 58-63.
37. Butler J. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. Elsevier Inc., 2015.
38. Caragine T, Mikulasovich R, Tamariz J, et al. Validation of testing and interpretation protocols for low template DNA samples Using AmpFISTR Identifier. *Croat Med J* 2009; 50: 250-67.
39. Butler J, Hill C. 2010. Available at: <https://pl.promega.com/resources/profiles-in-dna/2010/scientific-issues-with-analysis-of-low-amounts-of-dna/>
40. Prinz M, Carracedo A, Mayr W, et al. Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1: 3-12.
41. Butler K. *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Elsevier Inc., 2011.
42. Templeton J, Taylor D, Handt O, Skuza P, Linacre A. Direct PCR improves the recovery of DNA from various substrates. *J Forensic Sci* 2015; 60: 1558-1562.
43. Cavanaugh S, Bathrick A. Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: a review. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 32: 40-49.
44. Bekaert B, van Geystelen A, Vanderheyden N, Larmuseau M, Decorte R. Automating a combined composite-consensus method to generate DNA profiles from low and high template mixture samples. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 588-593.
45. ENFSI DNA Working Group. 2016. DNA database management: review and recommendations. Available at: [http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/final\\_version\\_enfsi\\_2016\\_document\\_on\\_dna-database\\_management\\_0.pdf](http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/final_version_enfsi_2016_document_on_dna-database_management_0.pdf)
46. Hering S, Edelmann J, Dreßler J. Sequence variations in the primer binding regions of the highly polymorphic STR system SE33. *Int J Legal Med* 2002; 116: 365-367.
47. Westen A, Kraaijenbrink T, Robles de Medina E, et al. Comparing six commercial autosomal STR kits in a large Dutch population sample. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 10: 55-63.
48. Inman K, Rudin N, Cheng K, et al. Lab Retriever: a software tool for calculating likelihood ratios incorporating a probability of drop-out for forensic DNA profiles. *BMC Bioinformatics* 2015; 16: 298.
49. Steele Ch, Greenhalgh M, Balding D. Verifying likelihoods for low template DNA profiles using multiple replicates. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 82-89.
50. Lohmueller K, Rudin N, Inman K. Analysis of allelic drop-out using the Identifier and PowerPlex 16 forensic STR typing systems. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 12: 1-11.
51. Word Ch. What is LCN? Definitions and challenges. 2010. Available at: <https://pl.promega.com/resources/profiles-in-dna/2010/what-is-lcn-definitions-and-challenges/>

**Adres do korespondencji**

Agnieszka Parys-Proszek  
 Pracownia Genetyki Sądowej  
 Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie  
 ul. Westerplatte 9  
 31-033 Kraków, Polska  
 e-mail: aproszek@ies.krakow.pl  
 Renata Jacewicz  
 Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
 e-mail: r.jacewicz@post.pl

Nadesłano: 15.12.2019

Zaakceptowano: 21.02.2020

**Address for correspondence**

Agnieszka Parys-Proszek  
 Forensic Genetics Section  
 Institute of Forensic Research,  
 Krakow, Poland  
 Westerplatte 9 St.  
 31-033 Krakow, Poland  
 e-mail: aproszek@ies.krakow.pl  
 Renata Jacewicz  
 Medical University of Lodz, Poland  
 e-mail: r.jacewicz@post.pl

Submitted: 15.12.2019

Accepted: 21.02.2020

