

Wewnętrzna walidacja RapidHIT™ 200 – systemu zautomatyzowanej identyfikacji człowieka na podstawie analizy DNA

mgr Anna Brągoszewska^{1*}, dr Ewa Kartasińska¹, mgr Paweł Wierzychowski²,
mgr Jakub Mondzelewski¹

¹ Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Policji

² Laboratorium Kryminalistyczne Komendy Głównej Policji w Katowicach

* autor korespondencyjny: anna.bragoszewska@policja.gov.pl

Streszczenie

RapidHIT™ 200 firmy IntegenX® (Thermo Fisher Scientific) to zintegrowany system służący do szybkiej identyfikacji osobniczej na podstawie analizy STR, zapewniający szereg korzyści w porównaniu z klasycznymi metodami profilowania DNA pod względem automatyzacji, szybkości analizy i mobilności. Niemniej przed wdrożeniem technologii *rapid DNA* do rutynowych aplikacji kryminalistycznych, zarówno proces badawczy, jak i wyniki muszą zostać rygorystycznie sprawdzone pod względem niezawodności, wydajności i kompatybilności z danymi uzyskanymi w oparciu o analizy wykonywane z wykorzystaniem technologii elektroforezy kapilarnej, poprzez przeprowadzenie wewnętrznej procedury walidacji. Ponieważ w obrębie naszych zainteresowań była przede wszystkim zdolność urządzenia RapidHIT™ 200 do efektywnego oznaczania profili DNA z próbek zabezpieczanych na miejscach zdarzeń kryminalnych i pozyskiwanie tych danych do bazy CODIS (ang. *Combined DNA Index System*), przeprowadzone badania ewaluacyjne skupiły się głównie na tego typu próbkach. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, iż RapidHIT™ 200 może być użytecznym narzędziem uzupełniającym konwencjonalne metody identyfikacyjne stosowane w genetyce sądowej.

Słowa kluczowe: *rapid DNA*, genetyka sądowa, RapidHIT™ 200, analiza STR

Wstęp

Identyfikacyjne badania genetyczne na podstawie markerów STR (ang. *short tandem repeat*) obejmują ciąg następujących po sobie kilku etapów badawczych, w postaci: izolacji DNA z próbki biologicznej, oceny ilościowej wyizolowanego DNA, amplifikacji określonych markerów STR poprzez reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *polymerase chain reaction – PCR*), rozdziału elektroforetycznego produktów PCR oraz analizy uzyskanych profili DNA (Butler i in., 2004). Z uwagi na wieloetapowość tego badania, pomiędzy pobraniem próbki biologicznej a interpretacją wyników, występuje istotny odstęp czasowy. Ponadto tradycyjne genotypowanie odbywa się w kontrolowanym środowisku laboratoryjnym, gdzie aparatura oraz poszczególne etapy badawcze powinny być rozdzielone. Te niedogodności procesu profilowania DNA limitują szybkie przetwarzanie wyników oraz nie pozwalają na przeprowadzanie badań bezpośrednio na miejscu przestępstwa.

Aktywny rozwój technologii w celu połączenia powyższych etapów badawczych zaowocował w ostatnich latach opracowaniem aparatury i zestawów odczynników w tzw. technologii *rapid DNA*. *Rapid DNA*

jest terminem zaczerpniętym z języka angielskiego, używanym do opisanego w pełni zautomatyzowanego, szybkiego procesu badania DNA (Gangano i in., 2013; Tan i in., 2013; Morgan i in., 2019; Kartasińska i in., 2020). Jednym spośród pionierskich urządzeń pracujących w technologii *rapid DNA* jest RapidHIT™ 200 Human Identification System (IntegenX® przez Thermo Fisher Scientific). Jest to zautomatyzowana platforma mobilna, w której zintegrowane są wszystkie etapy analizy STR, a profile DNA generowane są z próbek biologicznych w około 90 minut (Hennessy i in., 2013; Verheij i in., 2013; Holland, Wendt, 2015; Jovanovich i in., 2015). Do pracy z urządzeniem wykorzystywane są dwa kartridże z łącznie ośmioma studzienkami przeznaczonymi do genotypowania. Kartridże są uruchamiane jednocześnie i pozwalają na analizę od jednej do siedmiu próbek, przy czym pozostała jedna studzienka jest zarezerwowana na drabinę alleli STR. Każde podłoże ze śladem lub próbkę pobraną ze śladu umieszcza się bezpośrednio w niezależnej studzienke kartridża, gdzie przechodzi przez jego poszczególne kanały w celu amplifikacji z użyciem odczynników GlobalFiler® Express lub AmpFLSTR™ NGM SElect™ Express. Oddzielny moduł w aparacie zawierający

elementy systemu do elektroforezy kapilarnej i detekcji rozdziela fragmenty i zbiera surowe dane. Proces ten jest w pełni zautomatyzowany, a użytkownik jest zobowiązany tylko do umieszczenia w urządzeniu kartridży z próbkami oraz gotowych wkładów z odczynnikami.

Uzyskane dane są wstępnie przetwarzane przez integralne z RapidHIT™ 200 oprogramowanie analityczne, które umożliwia interpretację profili DNA bez ingerencji użytkownika. Jednak to „oprogramowanie pokładowe” dostarcza minimum informacji na ekranie urządzenia. Pliki zawierające dane można następnie eksportować z urządzenia w celu dalszej analizy i interpretacji profili DNA przez wykwalifikowany personel z wykorzystaniem oprogramowania GeneMarker® HID (Alshehhi, Roy, 2015).

Profile z urządzenia mogą być również przeglądać w aplikacji RapidLINK™ spełniającej funkcję bazy danych w zakresie gromadzenia oznaczonych przez urządzenie profili DNA, ich wzajemnego przeszukiwania oraz raportowania wyników zgodności danych. Istnieje także możliwość zaimportowania do RapidLINK™ profili DNA w postaci plików CMF generowanych przez system CODIS. Dodatkowo z wykorzystaniem współpracującej z RapidLINK™ aplikacji GeneMarker® HID możliwe jest tworzenie plików importu profili DNA do systemu CODIS. Zaimportowane do systemu CODIS profile DNA mogą być poddawane przeszukaniu w krajowych i zagranicznych zbiorach danych DNA.

Niniejsze opracowanie prezentuje wyniki wewnętrznej walidacji urządzenia RapidHIT™ 200. Testy walidacyjne obejmowały między innymi badanie dokładności metody oraz czułości wobec różnych ilości materiału biologicznego, a także badanie ewentualnego zanieczyszczenia krzyżowego. Ocenie poddano również efektywność urządzenia w oznaczaniu profili DNA z próbek często zabezpieczanych w sprawach kryminalnych. Ponadto w badaniach walidacyjnych uwzględniono ocenę zgodności wyników oraz porównanie jakości profili DNA oznaczonych na urządzeniu RapidHIT™ 200 z profilami oznaczonymi tradycyjną metodą genotypowania STR.

MATERIAŁY

Wymazy ze śluzówki jamy ustnej pobierano w dwóch kompletach na bawełniane wymazówki (Hagmed). Próbkę krwi nierozcieńczonej oraz krwi rozcieńczonej nanoszono na wymazówki 4N6 FLOQSwabs® Crime Scene (Copan Diagnostics). Wszystkie wymazówki pozostawiano do całkowitego wyschnięcia przed badaniem w temperaturze pokojowej. Próbkę krwi obwodowej pobierane były do próbek Vacutest® zawierających EDTA (Kima SAS Di Chiarin Renzo & C).

METODY

Metoda genotypowania systemem RapidHIT™ 200 i analiza danych

Próbki profilowano genetycznie z wykorzystaniem urządzenia RapidHIT™ 200 DNA Human Identification

System, o numerze seryjnym RH200-0044, współpracującym z oprogramowaniem GeneMarker® HID Auto v. 2.7.3 (SoftGenetics® dla IntegenX) wraz z zestawem 7-próbkowych kartridży GlobalFiler® Express (Thermo Fisher Scientific) amplifikującym 24 markery STR. Proces genotypowania próbek z wykorzystaniem RapidHIT™ 200 przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta z wykorzystaniem protokołu „Run Other Samples”, z wyjątkiem wymazów ze śluzówki policzka, dla których wybierano protokół „Run Buccal”. Protokół „Run Other Samples” posiada o dwa cykle PCR więcej niż protokół „Run Buccal” w celu zwiększenia wydajności genotypowania śladów biologicznych zawierających często mniejszą ilość matrycowego DNA niż w przypadku próbek pobranych ze śluzówki policzka (Thong i in., 2015). Analizę danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GeneMarker® HID v. 2.9.5 (SoftGenetics® dla IntegenX). Do analizy statystycznej otrzymanych wyników, w tym predykcji prawdopodobieństwa wystąpienia zjawiska typu „dropout”, wykorzystano program STR-validator ver. 2.2.0 (RStudio package ver. 3.6.0). Wyznaczając próg analityczny (ang. *analytical threshold* – AT), obserwacji poddano linię bazową w próbkach kontroli negatywnych, indywidualnie dla poszczególnych barwników fluorescencyjnych. We wszystkich analizowanych kolorach dało się zauważyć piki typu pull-up, które można było przypisać wysokiemu sygnałowi wewnętrznego standardu wielkości przy braku obecności konkurujących amplikonów STR. Po manualnej analizie, piki te zostały usunięte i nie były uwzględniane przy obliczeniach. Na podstawie granicy wykrywalności (ang. *limit of quantitation* – LOQ) wyrażonej jako średnia wielkość szumu tła powiększona o wartość dziesięciu odchyłeń standardowych, określono minimalny próg analityczny pozwalający na odróżnienie piku allela od szumu linii bazowej (Gilder i in., 2007). W ten sposób określono progi: 23 RFU dla 6-FAM™, 28 RFU dla VIC™, 33 RFU dla NED™, 28 RFU dla TAZ™ i 44 RFU dla SID™. Próg analityczny został konserwatywnie przyjęty na wspólnym dla wszystkich barwników poziomie 50 RFU i wykorzystany przy analizie wyników w kolejnych doświadczeniach walidacyjnych.

Klasyczne metody genotypowania i analiza danych

W celu porównania wyników wygenerowanych z wykorzystaniem systemu RapidHIT™ 200, próbki badano przy użyciu klasycznych metod profilowania STR, obejmujących izolację systemem AutoMate Express™ i zestawem odczynników PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems), uzyskując 50 µl ekstraktu. Zawartość DNA w każdej próbce oznaczono ilościowo w dwóch powtórzeniach przy użyciu zestawu Plexor® HY System (Promega). Amplifikację przeprowadzono przy użyciu zestawu GlobalFiler® PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific), a rozdział elektroforetyczny przeprowadzono na analizatorze genetycznym ABI PRISM® 3130xl

(Applied Biosystems). Analizę profili DNA przeprowadzono przy użyciu GeneMapper® ID-X v1.4 (Applied Biosystems), stosując próg analityczny na poziomie 50 RFU.

Badanie czułości i efektu stochastycznego

Czułość metody oceniono poprzez genotypowanie próbek krwi obwodowej w rozcieńczeniach odpowiadających ilościom: 0,5 µl, 0,25 µl, 0,125 µl krwi w próbce oraz próbek krwi nierozcieńczonej w ilości: 6 µl, 5 µl, 4 µl, 2 µl i 1 µl. Badanie przeprowadzono w kilku powtórzeniach, według schematu zawartego w tabeli 1.

Tab. 1. Schemat przeprowadzonych rozcieńczeń próbek krwi w badaniu czułości metody

Ilość krwi w próbce [µl]	Liczba powtórzeń dla próbki A	Liczba powtórzeń dla próbki B
6	2	-
5	3	2
4	3	3
2	3	2
1	3	2
0,5	3	2
0,25	2	2
0,125	2	2

Próbki krwi zostały pobrane od dwóch osób (próbki A i B), a odpowiednie ich ilości naniesione na waciki wymazówek i pozostawione przez noc do całkowitego wyschnięcia. Aby określić średnią ilość wejściowego DNA w każdej z badanych objętości krwi, podobny zestaw próbek ekstrahowano tradycyjną metodą z wykorzystaniem zestawu PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit, a ilość DNA oznaczono w trzech powtórzeniach za pomocą zestawu Plexor® HY (Promega) w aparacie Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR zgodnie z protokołami producenta. Powyższe

rozcieńczenia posłużyły do określenia najmniejszej ilości krwi wystarczającej do oznaczenia pełnego profilu DNA na urządzeniu RapidHIT™ 200, a także oceny efektu stochastycznego wynikającego z niskiej ilości matrycowego DNA w reakcji PCR. Obserwacji poddano liczbę zjawisk typu „dropout” w oznaczonych profilach oraz określono średnią wysokość pików dla każdego *locus*. Stosunek wysokości pików alleli siostrzanych w układach heterozygotycznych, tzw. balans heterozygotyczny (ang. *peak height ratio* – *PHR*), obliczono, dzieląc wysokość niższego pików przez wysokość pików wyższego.

Oznaczenie składników mieszanin DNA

Badanie mieszanin materiału biologicznego przeprowadzono w celu sprawdzenia, czy oprogramowanie analityczne GeneMarker® integralne z urządzeniem RapidHIT™ 200 prawidłowo oznaczy próbkę, która jest mieszaniną materiału genetycznego. Mieszaninę dwóch próbek krwi od mężczyzny i kobiety badano w stosunkach: 1:1, 1:2, 1:4 i 1:8, utrzymując dla wszystkich mieszanin całkowitą ilość krwi na stałym poziomie 5 µl. Każda z mieszanin była badana w trzech powtórzeniach.

Badanie precyzji metody oraz test krzyżowej kontaminacji

Badanie precyzji metody przeprowadzono poprzez 11-krotne profilowanie genetyczne próbki krwi (po 50 µl) od jednej osoby w trzech odrębnych cyklach badawczych oraz analizę 10 drabin allelicznych oznaczonych w odrębnych cyklach pracy urządzenia. Jako kryterium akceptacji precyzji przyjęto wartość odchylenia standardowego długości każdego z alleli, która nie powinna przekroczyć 0,5 bp (ENFSI, 2010; SWGDAM, 2016). Aby dodatkowo ocenić możliwość potencjalnego zanieczyszczenia krzyżowego pomiędzy kanałami kardridża oraz kolejnymi cyklami pracy urządzenia, próbki krwi ustawiano naprzemiennie, rozdzielając próbami kontroli negatywnej, według schematu przedstawionego w tabeli 2.

Tab. 2. Sposób ustawienia próbek dla testu krzyżowej kontaminacji przeprowadzonego na RapidHIT™ 200

RUN	dołek 1	dołek 2	dołek 3	dołek 4	dołek 5	dołek 6	dołek 7	dołek 8
1	50 µl krwi	ślepa próba	50 µl krwi	ślepa próba	50 µl krwi	drabina alleli	50 µl krwi	ślepa próba
2	ślepa próba	50 µl krwi	ślepa próba	50 µl krwi	ślepa próba	drabina alleli	ślepa próba	50 µl krwi
3	50 µl krwi	ślepa próba	50 µl krwi	ślepa próba	50 µl krwi	drabina alleli	50 µl krwi	ślepa próba

Test efektywności i badanie zgodności profili DNA

Do oceny efektywności oznaczania profili DNA z różnego rodzaju próbek biologicznych wykorzystano krew, spermę, ślinę, włosy, gumy do żucia, niedopałki papierosów, wymazy z szyjek butelek po wodzie, znaczki pocztowe, wymazy z telefonów komórkowych, wymazy z broni palnej będącej własnością funkcjonariuszy Policji (stanowiących personel laboratoryjny) i wymazy z wnętrza używanych rękawiczek. Przygotowano po 5 próbek z każdego typu materiału w taki sposób, aby każdy rodzaj śladu pochodził od jednej osoby. Trzy próbki z każdego zestawu zostały zbadane z wykorzystaniem RapidHIT™ 200, a dwie próbki, dla porównania, badano równolegle według klasycznego protokołu, określając procent oznaczonych alleli dla każdego typu materiału. Żute i wysuszone gumy umieszczano w studzienkach kartridży w całości. Bibułki z niedopałków papierosów i znaczki pocztowe o wymiarach 3 cm x 2 cm (uprzednio poślinione i wysuszone) pocięto na fragmenty o wielkości 0,5 cm x 0,5 cm, nakłuto na sterylne igły i umieszczono w komarach kartridży. Do badań według klasycznego protokołu pobierano fragmenty niedopałków papierosów i znaczków pocztowych o wymiarach 1 cm x 1 cm. Gumę do żucia podzielono na pół, badając oddzielnie obie połowy. Wymazy z całej powierzchni telefonów komórkowych, broni palnej, wnętrza rękawiczek oraz z szyjek butelek po wodzie pobrano na zwilżone wymazówki, pozostawiając je do całkowitego wyschnięcia przed badaniem w temperaturze pokojowej. Aby dodatkowo ocenić zgodność oznaczonych genotypów, 34 wymazy ze służówki policzka profilowano równolegle z wykorzystaniem urządzenia RapidHIT™ 200 oraz według klasycznego protokołu.

Poziom pików typu „stutter”

Kompletne, dobrej jakości profile DNA, oznaczone z materiału biologicznego w ramach badania zgodności i efektywności metody, wykorzystano do obliczenia stosunku wysokości pików typu „stutter” do wysokości pików macierzystych alleli w każdym układzie walidowanego systemu. W celu wykrycia siły sygnału w pozycjach „stutter”, w programie GeneMarker® próg AT ustawiono na poziomie 50 RFU, a filtry pików typu „stutter” obniżono do poziomu 1%. Proporcje pików typu „stutter” w stosunku do pików macierzystych alleli wyznaczano w każdym *locus* badanego systemu, dzieląc wysokość pików w pozycji „stutter” przez wysokość pików właściwego allela, a wynik wyrażono w procentach.

WYNIKI

Czułość metody

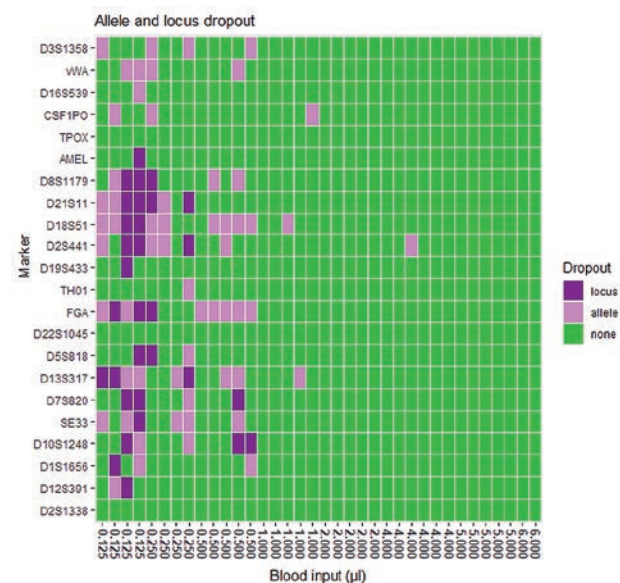
Badanie czułości polegało na określeniu najmniejszej ilości krwi wystarczającej do tego, aby uzyskać pełen profil DNA, z wartościami RFU alleli powyżej wyznaczonego progu analizy. W tabeli 3. przedstawiono

średnie stężenie DNA w każdej z badanych objętości krwi.

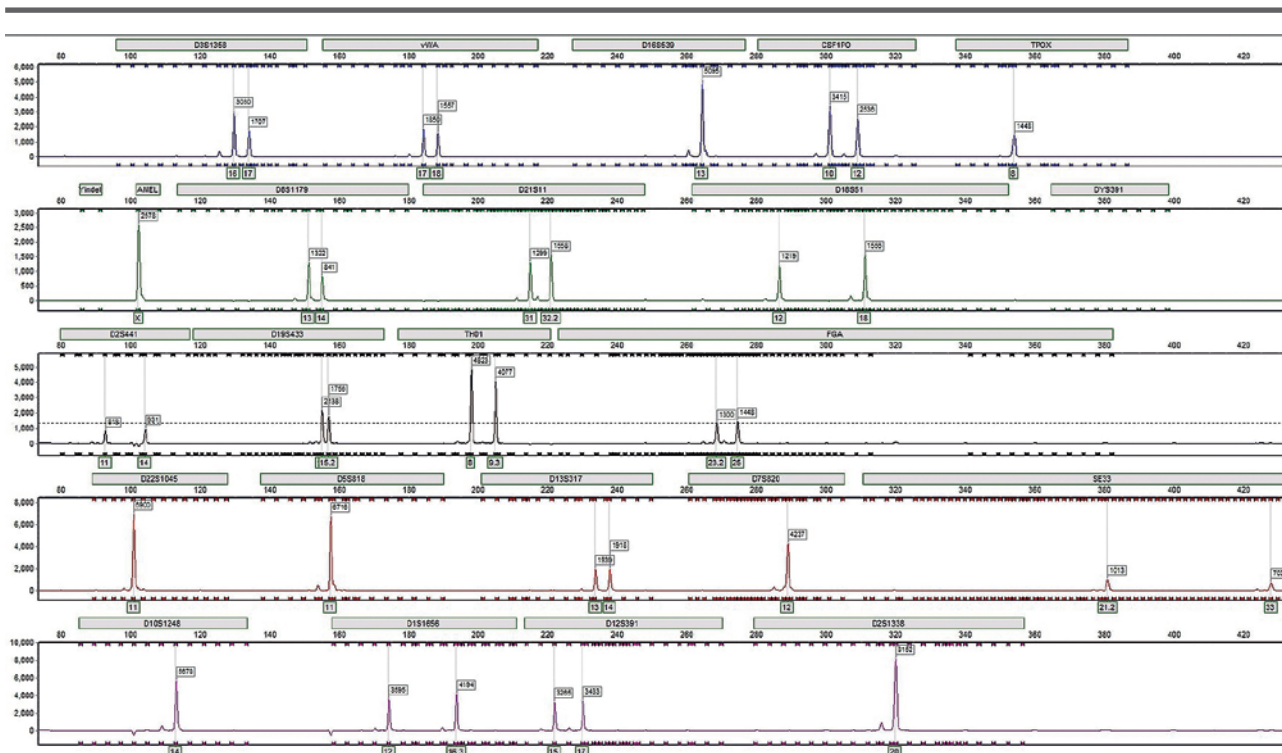
Tab. 3. Wyniki oceny ilościowej DNA w każdej z objętości krwi badanych w teście czułości metody

Ilość krwi (µl)	Średnie stężenie DNA ng/µl
6	7,6
5	7
4	5,5
2	3
1	1,5
0,5	1,2
0,25	0,5
0,125	0,3

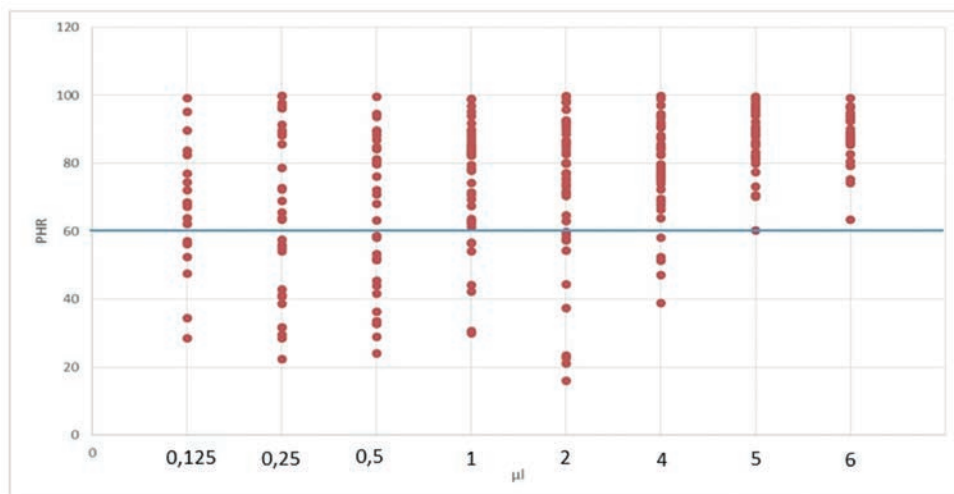
Jak przedstawiono na rycinie 1, kompletne profile STR autosomalnego DNA uzyskano przy ilości 2 µl, 5 µl oraz 6 µl krwi w próbce, co odpowiada średnio 3 ng, 7 ng oraz 7,6 ng DNA w próbce. Wśród sześciu wyników profilowania próbek o objętości 4 µl krwi zaobserwowano jedno zjawisko typu „dropout”. Należy zaznaczyć, że kompletne profile można było jednak zaobserwować już przy 1 µl krwi w próbce (1,5 ng DNA)



Ryc. 1. Mapa cieplna przedstawiająca liczbę zjawisk typu "allele dropout" oraz "locus dropout" w profilach oznaczonych z próbek krwi badanej w objętościach od 6 µl do 0,125 µl. Próbkę genotypowano z wykorzystaniem RapidHIT™ 200 w systemie GlobalFiler™ Express. Każda kolumna reprezentuje wynik dla jednej próbki. Wiersze reprezentują wyniki dla danego *locus*



Ryc. 2. Kompletny profil STR oznaczony w systemie GlobalFiler™ Express z 1 µl krwi w próbce z wykorzystaniem RapidHIT™ 200



Ryc. 3. Wykres przedstawiający stosunek wysokości pików alleli siostrzanych w każdym *locus* heterozygotycznym względem ilości (µl) krwi w próbce, obliczony na podstawie profili DNA oznaczonych z krwi badanej w zakresie od 6 µl do 0,125 µl w systemie GlobalFiler™ Express na urządzeniu RapidHIT™ 200. PHR jest przedstawiany w procentach. Dane pochodzą z 279 układów heterozygotycznych. Poziomą niebieską linią oznaczono minimalną akceptowalną wartość PHR

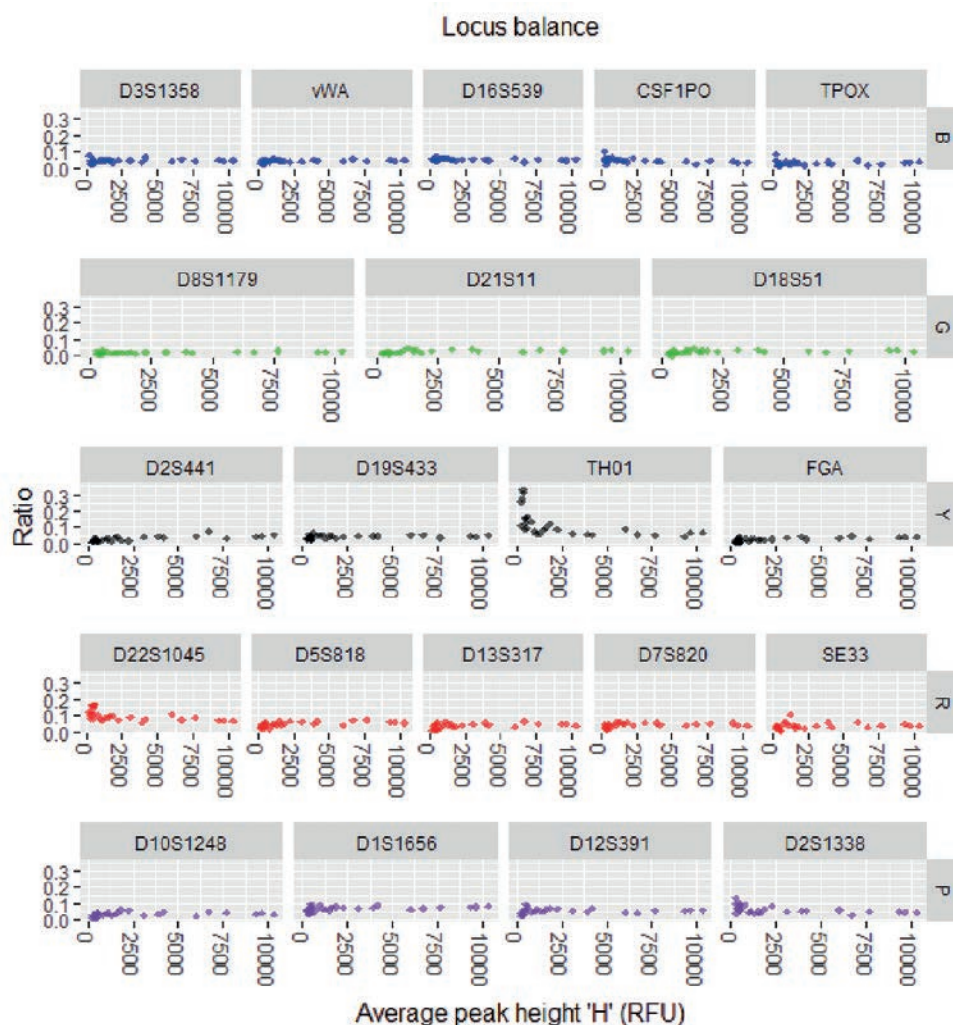
(rycina 2). Dla zakresu 0,5-0,125 µl krwi w próbce obserwowano wzrost liczby nieoznaczonych alleli, tj. amplifikowanych poniżej przyjętego progu analizy.

Balans heterozygotyczny

Stosunek wysokości pików alleli siostrzanych w każdym *locus* heterozygotycznym określono na podstawie kompletnych układów heterozygotycznych oznaczonych z krwi obwodowej badanej w zakresie od 6 µl

do 0,125 µl i wyznaczono na wykresie względem ilości (µl) krwi w próbce (rycina 3).

Obliczony stosunek wysokości pików alleli siostrzanych w każdym *locus* heterozygotycznym, którego wartość wyniosła poniżej 60%, został uznany za istotny wzrost dysproporcji (ENFSI, 2010). Tę graniczną wartość oznaczono na wykresie niebieską linią, oddzielając w ten sposób obserwowane *loci* o allelach zbalansowanych (powyżej linii) od *loci* o allelach

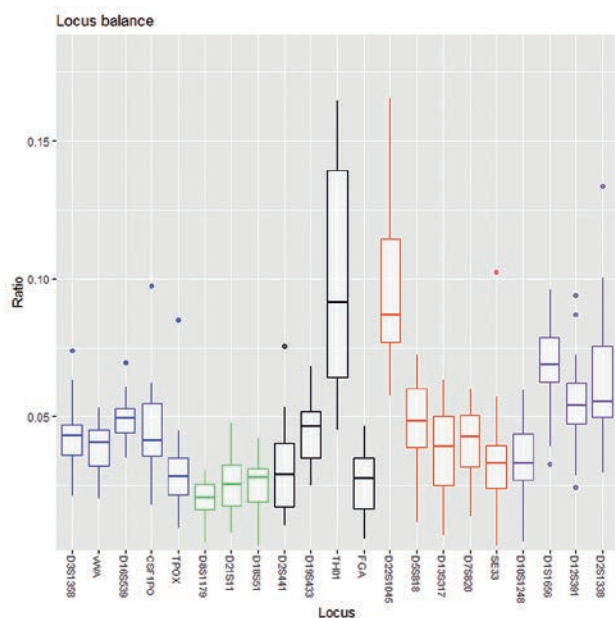


Ryc. 4. Balans *locus* w profilu (Lb) obliczony jako stosunek całkowitej wysokości pików alleli w *locus* do całkowitej wysokości pików alleli w profilu, wyznaczony wobec średniej wysokości pików alleli w danym *locus*. Dane pochodzą z kompletnych profili oznaczonych z krwi badanej w zakresie od 6 μ l do 1 μ l w systemie GlobalFiler® Express na urządzeniu RapidHIT™ 200. Układy DYS391 oraz AMEL zostały wykluczone z badania

niezbalansowanych (poniżej linii). Uzyskane wyniki wskazują, że dla zakresu objętości krwi w próbce od 5 do 6 μ l wszystkie oznaczone *loci* wykazywały zbalansowanie na rekomendowanym poziomie. Przy zawartości 4 μ l krwi w próbce około 12% *loci* wykazywało stopień niezbalansowania, 24% *loci* było niezbalansowanych – przy zawartości 2 μ l krwi w próbce. Natomiast przy zawartości 0,5 μ l krwi w próbce zaobserwowano 39% *loci* niezbalansowanych. Powyższe obserwacje dają podstawę do stwierdzenia, że wraz ze spadkiem ilości matrycowego DNA w próbce wzrasta niepewność co do możliwości wiarygodnego oznaczenia genotypu, ponieważ allele z pary mogą być reprezentowane w nierównoważony sposób, co wynika ze zjawiska preferencyjnej amplifikacji alleli o mniejszej masie cząsteczkowej.

Poziom zbalansowania między markerami, określane również jako balans *locus* w profilu (ang. *Locus balance* – *Lb*), jest ważną cechą zestawu służącego do profilowania DNA i jest definiowany dla wszystkich *loci* w zestawie. W doskonale zbalansowanym

zestawie całkowita wysokość pików w każdym *locus* w pojedynczym profilu DNA powinna być równa. Dzięki temu łatwiej jest ujawnić i zinterpretować między innymi rzadkie allele, które wykraczają poza zakresy markerów, zjawiska typu „dropout” czy też zdegradowany DNA (Hansson i in. 2014). Balans poszczególnych układów obliczono, dzieląc sumę wysokości pików w *locus* przez sumę wszystkich wysokości pików w danym profilu. Średni *Lb* na marker wahał się od 0,02 do 0,12 (D8S1179 i TH01). Natomiast optymalny *Lb* dla układów systemu GlobalFiler® Express powinien oscylować wokół wartości 0,047 (1/21). Na rycinie 4 przedstawiono *Lb* wobec średniej wysokości pików w danym układzie, natomiast na rycinie 5 przedstawiono *Lb* za pomocą wykresów pudełkowych reprezentujących poszczególne układy. Na wykresach tych można zaobserwować, iż allele markerów TH01 i D22S1045 amplifikują się z większą wydajnością w stosunku do alleli pozostałych *loci* w profilu, szczególnie w przypadku próbek z niską zawartością DNA.



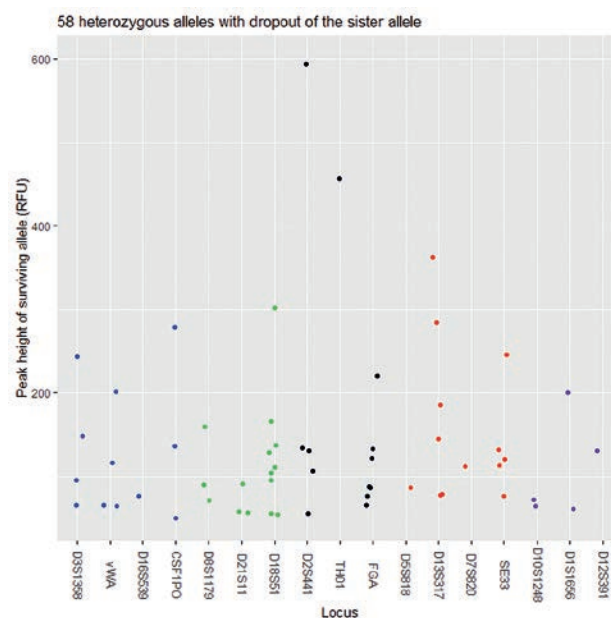
Ryc. 5. Wykresy pudełkowe przedstawiające rozkłady międzykwartyłowe balansu poszczególnych *loci* w profilu (*Lb*), obliczonego na podstawie kompletnych profili DNA oznaczonych z krwi badanej w zakresie od 6 μ l do 1 μ l w systemie GlobalFiler™ Express na urządzeniu RapidHIT™ 200

Ocena efektu stochastycznego i prawdopodobieństwa wystąpienia zjawiska typu „dropout”

Stochastyczna natura PCR nieuchronnie wprowadza nierównowagę między dwoma amplifikowanymi allelami *loci* heterozygotycznych. Skrajnym skutkiem nierównowagi heterozygotycznej (powstałym w wyniku tzw. efektu stochastycznego) jest zjawisko typu „dropout” (Gill i in., 2012). Zjawisko to oznacza brak jednego (wypadnięcie allela) lub obu alleli (wypadnięcie *locus*) w jednym lub większej liczbie markerów w profilu DNA. Zjawisko typu „dropout” może nastąpić z powodu całkowitego braku lub obecności zbyt małej liczby cząsteczek matrycy DNA w PCR, aby wywołać sygnał w urządzeniu elektroforezy kapilarnej lub przekroczyć ustalony laboratoryjnie próg oznaczalności (LOQ) alleli.

Na rycinie 6 zaznaczono kropkami allele ze zjawiskiem typu „dropout” ich alleli siostrzanego w układach heterozygotycznych. Wysokości najwyższych pików z zaobserwowanym zjawiskiem typu „dropout” allela siostrzanego wynosiły: 279 RFU dla barwnika niebieskiego (CSF1PO), 302 RFU dla barwnika zielonego (D18S51), 593 RFU dla barwnika żółtego (D2S441), 363 RFU dla barwnika czerwonego (D13S317) oraz 200 RFU dla barwnika fioletowego (D1S1656).

Korzystając z wyników obserwacji zjawiska typu „dropout” oraz informacji o wysokości pików allela w układzie heterozygotycznym pozostałego z pary

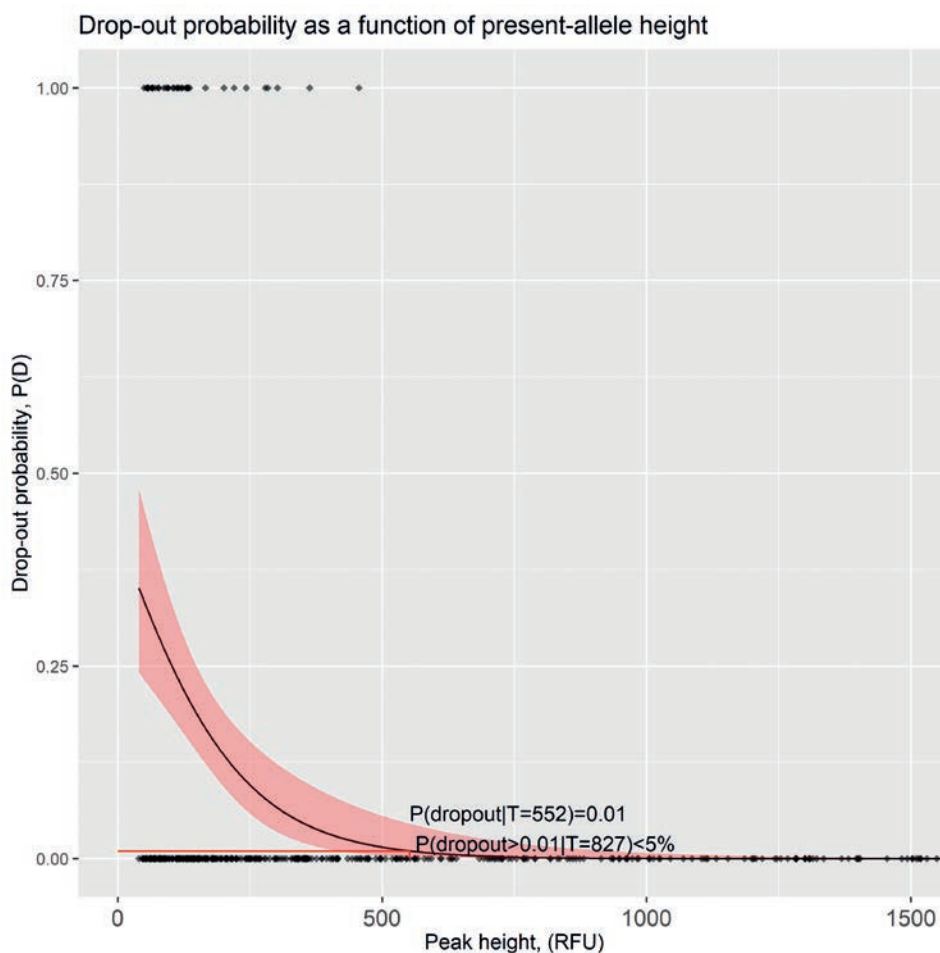


Ryc. 6. Wykres kropkowy obrazujący ilość zjawisk typu „dropout” dla każdego *locus* heterozygotycznego, w którym to zjawisko wystąpiło. Kropką oznaczono wysokości pików alleli heterozygotycznych, dla których zaobserwowano zjawisko typu „dropout” allela siostrzanego. Dane pochodzą z profili oznaczonych z krwi badanej w zakresie od 6 μ l do 0,125 μ l w systemie GlobalFiler™ Express na urządzeniu RapidHIT™ 200

allelów siostrzanych, modelowano prawdopodobieństwo zjawiska „dropout” za pomocą regresji logistycznej (rycina 7). W ten sposób wyznaczono próg stochastyczny (ang. *stochastic threshold* – *ST*), który minimalizuje możliwość błędnego uznania heterozygotycznego *locus* jako *locus* homozygotyczne. Przy 1% prawdopodobieństwie zjawiska „dropout” próg ten wynosi 552 RFU. Konserwatywny próg stochastyczny wyznaczono na poziomie 827 RFU. Powyżej tego progu uzasadnione jest założenie, że w danym *locus* nie nastąpiło wypadnięcie allela siostrzanego. Różnica pomiędzy wyznaczonym progiem analitycznym a stochastycznym polega na tym, iż pik z sygnałem powyżej przyjętego *AT* jest przypisywany allelowi *locus* STR, zamiast pikowi pochodzącemu z szumu linii bazowej, podczas gdy pik z sygnałem powyżej *ST* w *locus* STR jest identyfikowany jako genotyp homozygoty dla tego *locus*.

Wyniki badania mieszanin DNA

Analiza próbek będących mieszaninami krwi od mężczyzny i kobiety wykazała, że próbki zostały poprawnie oznaczone jako mieszaniny materiału genetycznego i jako takie wymagające dalszej oceny specjalisty. Oba składniki mieszanin DNA zmieszane w stosunku 1:1 zostały oznaczone w 100% w każdym *locus*. Mniejszościowy składnik o genotypie męskim został wykryty we wszystkich pozostałych mieszaninach z 96,7% oznaczeniem alleli. Rycina 8 ilustruje wyniki badania



Ryc. 7. Predykcja prawdopodobieństwa wystąpienia zjawiska typu „dropout” jako funkcji wysokości pozostałego w układzie heterozygotycznym allele z pary alleli siostrzanych za pomocą modelu regresji logistycznej. Zacieniowana część wykresu na kolor czerwony oznacza 95% przedział ufności dla prawdopodobieństwa zjawiska „dropout”. Obserwacje układów heterozygotycznych bez zjawiska „dropout” przedstawiono jako punkty przy $P = 0$, natomiast obserwacje układów heterozygotycznych ze zjawiskiem „dropout” alleli siostrzanych przedstawiono jako punkty przy $P = 1$

mieszanin dwóch próbek krwi w stosunku mieszania 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, z allelami składnika mniejszościowego oznaczonymi gwiazdką.

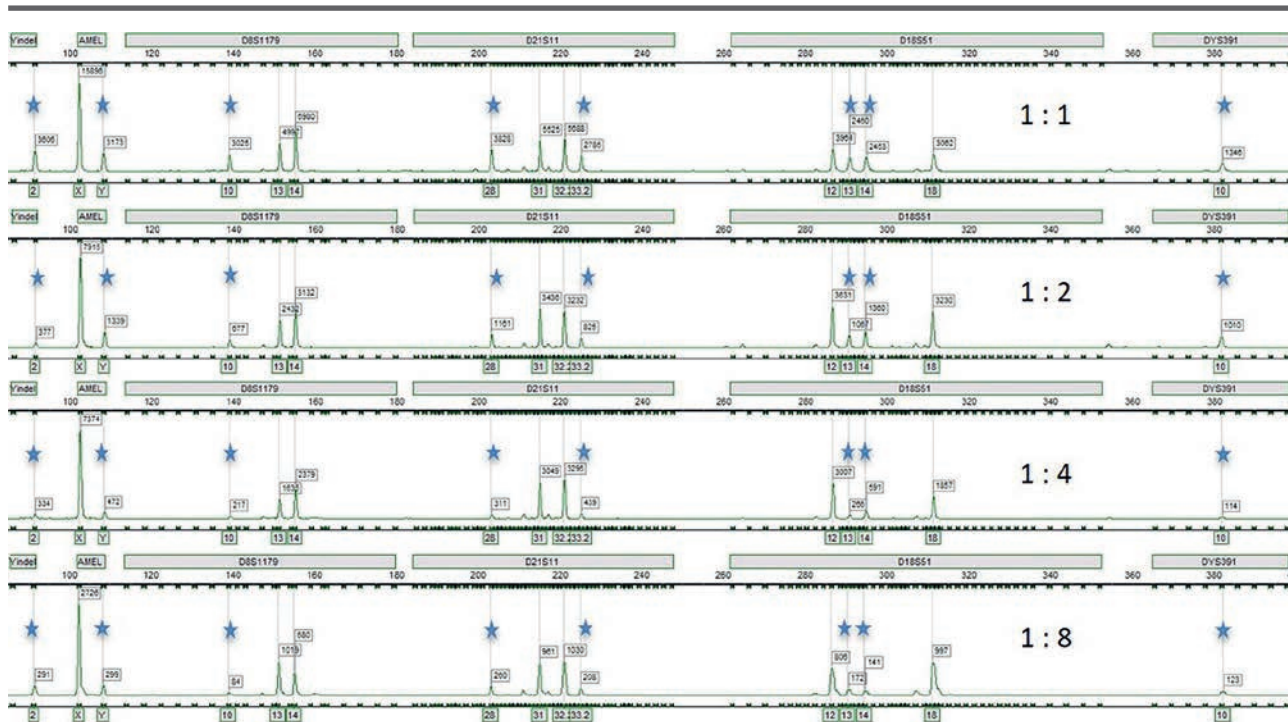
Precyzja

Badanie precyzji metody polegało na ocenie zróżnicowania wyników przy wielokrotnym oznaczaniu tej samej próbki oraz drabiny allelicznej i objęło ocenę dokładności i niezawodności genotypowania. Badanie przeprowadzono dla 11 powtórzeń genotypowania próbki krwi od jednej osoby o znanym profilu DNA. W powyższym doświadczeniu dla każdego z alleli odchylenie standardowe jego długości oznaczonej na urządzeniu RapidHIT™ 200 nie przekroczyło rekomendowanej wartości 0,5 bp i mieściło się w zakresie 0,03 do 0,11 bp. Analiza 10 drabin allelicznych potwierdziła, iż wszystkie oznaczone allele osiągały powtarzalnie podobną długość oznaczoną w parach zasad, z rekomendowaną dokładnością do 0,5 bp (rycina 9) oraz mieściły się w przedziale $\pm 0,5$ bz

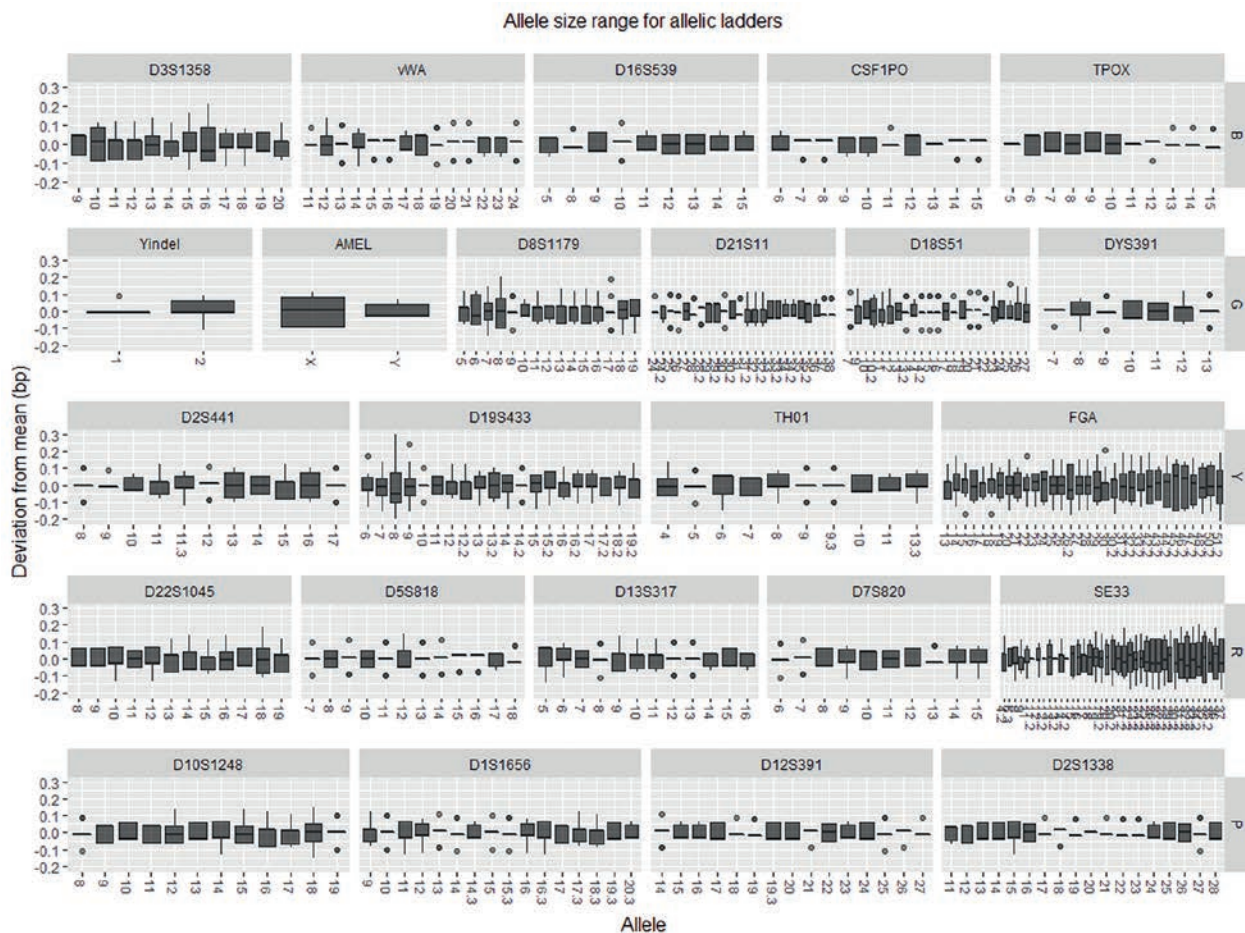
w stosunku do długości odpowiedniego allele w drabinie. Mikrowarianty różniące się o jedną parę zasad przy mniejszych fragmentach (np. D2S441 – 95.6, 96.5 bp) oraz mikrowarianty różniące się o dwie pary zasad przy większych fragmentach (np. SE33 – 372.6, 374.6 bp) zostały wyraźnie rozdzielone. Zestaw alleli w drabinie allelicznej dla większych markerów, np. SE33 i FGA nie uwzględnia mikrowariantów różniących się o jedną parę zasad, co pozostaje standardem przy projektowaniu drabiny allelicznej w multipleksowych systemach STR.

Test krzyżowej kontaminacji

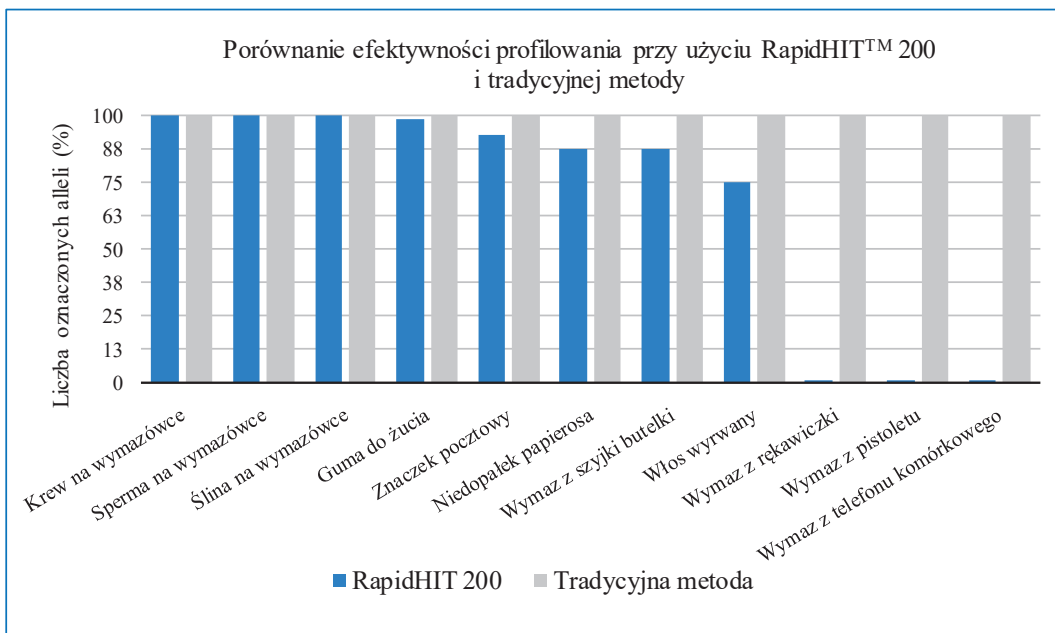
Oddzielenie obszarów przed amplifikacją i po amplifikacji w laboratorium genetycznym jest powszechną i skuteczną metodą zapobiegania kontaminacji. Fakt, że urządzenie RapidHIT™ 200 zawiera wszystkie etapy procesu badawczego w jednym instrumencie, oznacza, iż obszary przed i po amplifikacji istnieją w tej samej przestrzeni fizycznej. Dlatego przeprowadzono



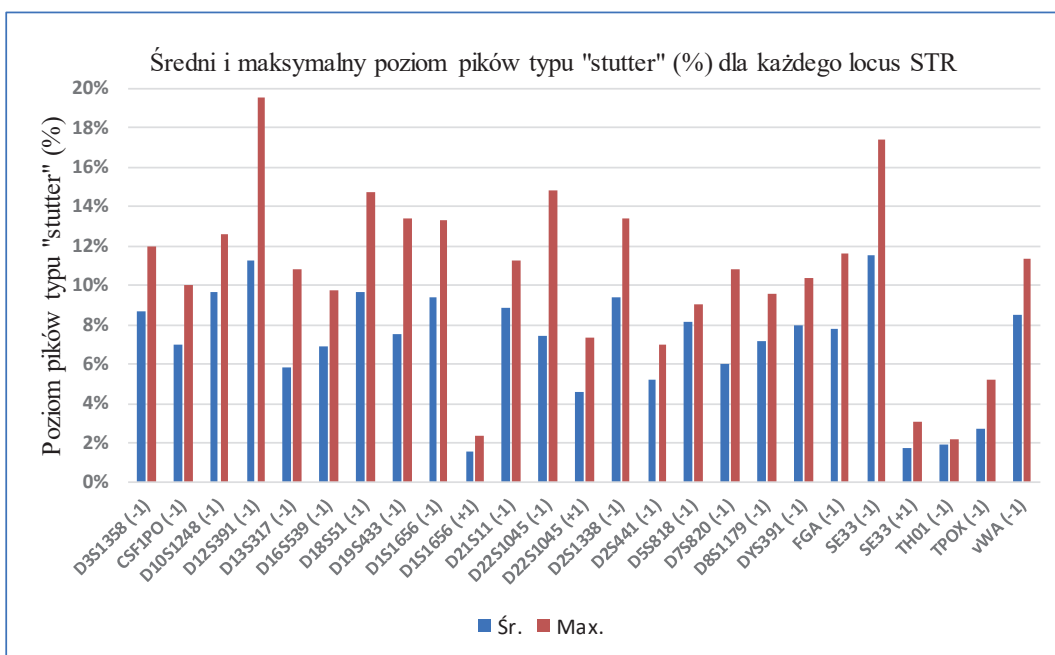
Ryc. 8. Zestawienie wyników badania mieszanin dwóch próbek krwi w stosunku zmieszania 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 dla loci wyznakowanych barwnikiem zielonym. Allele mniejszościowego składnika oznaczono gwiazdką



Ryc. 9. Wykresy pudełkowe przedstawiające rozkłady międzykwartylowe średnich odchyleń długości alleli 10 drabin allelicznych systemu GlobalFiler™ Express analizowanych na urządzeniu RapidHIT™ 200



Ryc. 10. Badanie efektywności oznaczania profili DNA z wykorzystaniem różnych próbek biologicznych analizowanych z wykorzystaniem urządzenia RapidHIT™ 200 oraz klasycznego protokołu. Dane przedstawiono jako procent oznaczonych alleli



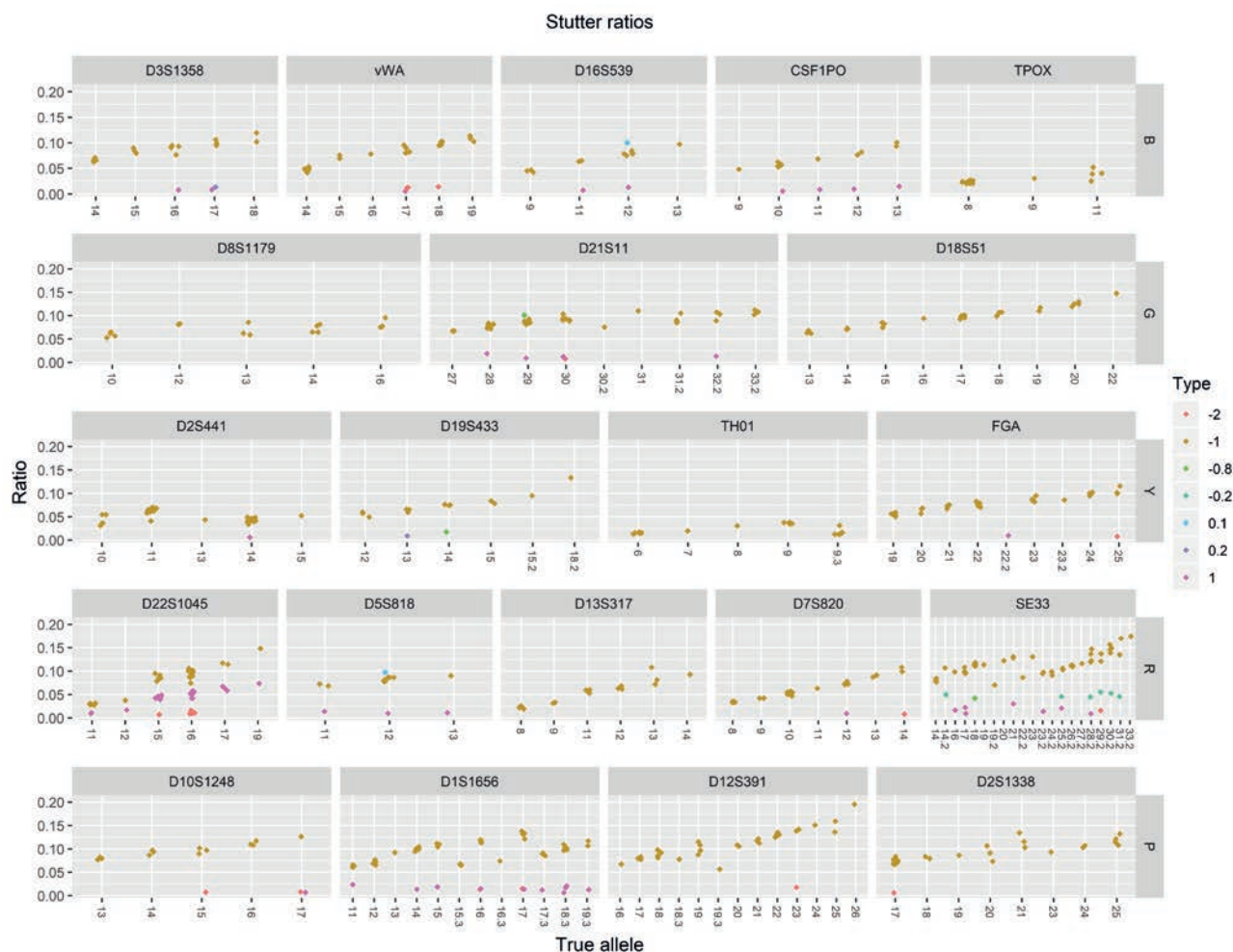
Ryc. 11. Średni i maksymalny poziom pików typu „stutter“ (%) w pozycji „-1“ oraz w pozycji „+1“ dla loci STR systemu GlobalFiler® Express oznaczonych na urządzeniu RapidHIT™ 200

testy mające na celu sprawdzenie, potencjalnych zanieczyszczeń w wyniku przeniesienia materiału pomiędzy poszczególnymi kanałami kartridży w trakcie transferu próbek, jak również pomiędzy poszczególnymi cyklami pracy urządzenia. Wyniki wskazują, iż w żadnym z pustych kanałów nie oznaczono alleli, a zatem nie stwierdzono występowania kontaminacji. Ponadto w żadnej innej części badania

walidacyjnego dla kontroli ujemnych lub próbki zawierającej materiał biologiczny nie wystąpiły oznaki zanieczyszczenia.

Ocena efektywności i zgodności oznaczanych profili DNA

Aby ocenić efektywność oznaczania profili DNA z różnego rodzaju materiału biologicznego, przetestowano



Ryc. 12. Zakresy frakcji pików typu „stutter” w każdym *locus* w stosunku do wysokości właściwego allele dla 46 kompletnych profili oznaczonych na urządzeniu RapidHIT™ 200 w systemie GlobalFiler® Express

zestaw próbek kryminalistycznych rutynowo zabezpieczanych na miejscach przestępstw. Jak pokazano na rycinie 10, dzięki urządzeniu RapidHIT™ 200 można analizować próbki kryminalistyczne, które zawierają co do zasady większe ilości DNA, w postaci wymazów z krwi, spermy oraz śliny z 100% skutecznością. W profilach wygenerowanych z takiego typu materiału, jak: gumy do żucia, niedopałki papierosów, pojedyncze wyrwane włosy, znaczki pocztowe oraz wymazy z szyjki butelki, liczba oznaczonych alleli wynosiła odpowiednio: 98%, 87%, 75%, 92% i 87%. Nie uzyskano profili genetycznych ze śladów kontaktowych w postaci wymazów z telefonów komórkowych, wymazów z broni palnej oraz wymazów z wnętrza rękawiczek lateksowych, w porównaniu do badań wykonanych według klasycznego protokołu, gdzie w każdym przypadku oznaczono pełne profile genetyczne.

Profile DNA z próbek kryminalistycznych oraz profile referencyjne oznaczone z wykorzystaniem urządzenia RapidHIT™ 200 były zgodne z profilami oznaczonymi zestawem GlobalFiler® według klasycznego protokołu.

Ocena pików typu „stutter”

Piki typu „stutter” oceniano na podstawie 46 kompletnych profili DNA (markery pici były wykluczone z badania). Na rycinie 11 przedstawiono średni i maksymalny procent wysokości pików typu „stutter” zarówno w pozycji „-1” jak i w pozycji „+1” w stosunku do macierzystego allele dla poszczególnych układów. Progi pików typu „stutter” we wszystkich *loci* badanych z wykorzystaniem RapidHIT™ 200 mieszczą się w zakresie wskazanym przez producenta zestawu GlobalFiler® Express. Najwyższe wysokości sygnału typu „stutter” zaobserwowano w pozycji „-1” w *locus* D12S391 oraz SE33. Na rycinie 12 można zaobserwować ogólny wzrost wysokości pików typu „stutter” wraz ze wzrostem długości allele w poszczególnych układach STR. Zbalansowanie wysokości allele w *loci* heterozygotycznych wynosiło około 88% i mieściło się w zakresie od 82% do 93%.

WNIOSKI

RapidHIT™ 200 to mobilne urządzenie, które oferuje szybkie oznaczanie profili DNA w ciągu dwóch godzin, przy minimalnej interwencji człowieka i w miejscu,

gdzie nie jest dostępne kontrolowane środowisko laboratoryjne. Jak wykazały doświadczenia walidacyjne, urządzenie to może oznaczać wysokiej jakości profile STR z wymazów ze śluzówki policzka oraz z różnego typu śladów biologicznych zawierających, co do zasady, większe ilości DNA, takich jak: krew, nasienie czy ślina. Wyniki badań serii rozcieńczeń wykazały, że do wygenerowania pełnych autosomalnych profili STR potrzeba 5 µl krwi (około 7 ng DNA). Niezrównoważony stosunek wysokości alleli siostrzanych w heterozygotycznych *loci*, skutkujący ostatecznie wypadaniem alleli, obserwowano tylko w przypadkach, gdy badano mniejsze objętości krwi niż podano powyżej. Oznaczone profile DNA przy użyciu tradycyjnej metody ekstrakcji, kwantyfikacji i amplifikacji w systemie GlobalFiler® były w pełni zgodne z profilami wygenerowanymi z wykorzystaniem urządzenia RapidHIT™ 200 i protokołów „Run Buccal” i „Run Other Samples”. Ocena oznaczonych profili DNA w badaniu precyzji metody oraz poziomu pików typu „stutter” potwierdziła możliwość uzyskania na urządzeniu w sposób odtwarzalny wiarygodnych wyników genotypowania. Oprogramowanie analityczne urządzenia RapidHIT™ 200 poprawnie oznaczyło mieszaninę DNA w stosunku 1:8, co jest wystarczające do tego, aby wskazać, że badana próbka może mieć mieszany profil DNA.

Urządzenie RapidHIT™ 200 nie wykazuje jednak równoważnej czułości w porównaniu z klasycznym protokołem w profilowaniu śladów z mniejszą zawartością materiału genetycznego, takich jak niedopałki papierosów, znaczki pocztowe, wyrwane pojedyncze włosy. Niższa czułość urządzenia wyklucza możliwość analizy śladów kontaktowych/dotykowych. Nie uzyskano profili genetycznych z wymazów pobranych z całej powierzchni telefonów komórkowych, broni palnej oraz z wnętrza rękawiczek lateksowych, podczas gdy za pomocą klasycznego protokołu w każdym powyższym przypadku oznaczono profile genetyczne ze 100% skutecznością.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione ograniczenia, należy stwierdzić, że RapidHIT™ 200 może być użytecznym narzędziem uzupełniającym konwencjonalne metody identyfikacyjne stosowane w akredytowanych laboratoriach genetycznych, niemniej nie może ich zastąpić. Jednak w sytuacjach, kiedy niezwykle istotne jest szybkie oznaczenie profili DNA, i np. przeszukanie bazy danych DNA celem zidentyfikowania sprawcy przestępstwa, to urządzenie ma przewagę nad konwencjonalnymi metodami. Urządzenie może być obsługiwane przez niewykwalifikowany personel, po uprzednim właściwym przeszkoleniu w zakresie umieszczania próbek w kanałach kartridży i działania urządzenia. Każdorazowo biegły z zakresu genetyki sądowej lub wykwalifikowany analityk powinien określić, czy oznaczony z wykorzystaniem urządzenia RapidHIT™ 200 profil DNA może zostać poddany przeszukaniu w krajowych oraz międzynarodowych bazach danych DNA.

Oceniając możliwości akredytowania tego urządzenia jako mobilnego laboratorium do analizy śladów biologicznych bezpośrednio na miejscu zdarzenia, należy wziąć pod uwagę następujący zapis Normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018 (pkt 6.3.5): „Jeżeli laboratorium prowadzi działalność laboratoryjną w miejscach lub pomieszczeniach pozostających poza jego stałą kontrolą, powinno zapewnić, aby wymagania niniejszego dokumentu dotyczące pomieszczeń i warunków środowiskowych były spełnione”. Zapis ten narzuca konieczność zapewnienia, że:

- warunki środowiskowe prowadzenia badań i pomieszczenia badawcze nie będą mieć negatywnego wpływu na ważność wyników;
- zostanie opracowana procedura zawierająca wymagania dotyczące nadzoru warunków środowiskowych niezbędnych do wykonywania badań w miejscach lub pomieszczeniach pozostających poza jego stałą kontrolą;
- laboratorium będzie monitorować, kontrolować i rejestrować warunki środowiskowe zgodnie z odpowiednimi procedurami, gdy wpływają one na ważność wyników badań realizowanych w miejscach lub pomieszczeniach pozostających poza jego stałą kontrolą.

W związku z powyższym poszerzenie zakresu akredytacji metody o badania realizowane bezpośrednio na miejscu zdarzenia wymaga zwiększenia zakresu walidacji o szereg dodatkowych parametrów (m.in. w zakresie odporności na czynniki zewnętrzne, określenia składników wpływających na niepewność pomiaru). Wymaga to także przygotowania dokumentacji dotyczącej nadzoru warunków środowiskowych, zapewnienia jakości wyników badań oraz postępowania z obiektami badań.

Źródło rycin i tabel: autorzy

Bibliografia

1. Alshehhi, A., Roy, R. (2015). Generating rapid DNA profiles from crime scene samples commonly encountered in the United Arab Emirates. *Journal of Forensic Research*, 6. <https://doi.org/10.4172/2157-7145.1000296>.
2. Butler, J.M., Buel, E., Crivellente, F., McCor, B.R. (2004). Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, 25.
3. ENFSI, (2010). *Recommended Minimum Criteria for Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process*.
4. Gangano, S., Elliott, K., Anoruo, K., Gass, J., Buscaino, J., Jovanovich, S., Harris, D. (2013). DNA investigative lead development from blood and saliva samples in less than two hours using the RapidHIT™ Human DNA Identification System. *Forensic Science International: Genetics*

- Supplement Series*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.022>.
5. Gill, P., Gusmão, L., Haned, H., Mayr, W.R., Morling, N., Parson, W., Prieto, L., Prinz, M., Schneider, H., Schnider, P.M., Weir, B.S. (2012). 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 Science International: Genetics*, 6(6). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.06.002>.
 6. Gilder, J.R., Doom, T.E., Inman, K., Krane, D.E. (2007). Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *Journal of Forensic Sciences*, 52(1).
 7. Hansson, O., Gill, P., Egeland, T. (2014). STR-validator: An open source platform for validation and process control. *Forensic Science International: Genetics*, 13.
 8. Hennessy, L.K., Franklin, H., Li, Y., Buscaino, J., Chear, K., Gass, J., Mehendale, N., Williams, S., Jovanovich, S., Harris, D., Elliott, K., Nielsen, W. (2013). Developmental validation studies on the RapidHIT™ Human DNA Identification System. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.003>.
 9. Holland, M., Wendt, F. (2015). Evaluation of the RapidHIT™ 200, an automated human identification system for STR analysis of single source samples. *Forensic Science International: Genetics*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.08.010>.
 10. Jovanovich, S., Bogdan, G., Belcinski, R., Buscaino, J., Burgi, D., Butts, E.L.R., Chear, K., Ciopyk, B., Eberhart, D., El-Sissi, O., Franklin, H., Gangano, S., Gass, J., Harris, D., Hennessy, L., Kindwall, A., King, D., Klevenberg, J., Li, Y., Mehendale, N., McIntosh, R., Nielsen, B., Park, C., Pearson, F., Schueren, R., Stainton, N., Troup, C., Vallone, P.M., Vangbo, M., Woudenberg, T., Wyrick, D., Williams, S. (2015). Developmental validation of a fully integrated sample-to-profile rapid human identification system for processing single-source reference buccal samples. *Forensic Science International: Genetics*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.004>.
 11. Kartasińska, E., Jurga, A. (2020). Rapid DNA – technologia umożliwiająca zautomatyzowaną, szybką analizę profili DNA wykorzystującą polimorfizm loci STR. *Problemy Kryminalistyki*, 309.
 12. Morgan, R., Illidge, S., Wilson-Wilde, L. (2019). Assessment of the potential investigative value of a decentralised rapid DNA workflow for reference DNA samples. *Forensic Science International*, 294.
 13. SWGDAM, (2016). *Validation guidelines for DNA analysis methods*.
 14. Tan, E., Turingan, R.S., Hogan, C., Vasantgadkar, S., Palombo, L., Schumm, J.W., Selden, R.F. (2013). Fully integrated, fully automated generation of short tandem repeat profiles. *Investigative Genetics*, 4(1).
 15. Thong, Z., Phua, Y.H., Loo, E.S., Goh, S.K., Ang, J., Looi, W.F., Syn, C.K.C. (2015). Evaluation of the RapidHIT™ 200 system: a comparative study of its performance with Maxwell® DNA IQ™/Identi ler® plus/ABI 3500xL workow. *Forensic Science International: Genetics*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.006>.
 16. Verheij, S., Clarisse, L., van den Berge, M., Sijen, T. (2013). RapidHIT™ 200, a promising system for rapid DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.130>.