

mgr Anna Brągoszewska
mgr Michał Boroń
Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Policji

Walidacja wewnętrzna programu biostatystycznego *LRmix Studio*

Streszczenie

Źródło pochodzenia DNA w śladzie nigdy nie jest znane z całą pewnością, mimo iż profil dowodowy może być zgodny z profilem DNA danej osoby z populacji. Metody statystyczne, w tym iloraz wiarygodności, pozwalają oszacować siłę dowodową uzyskanego wyniku oraz ocenić stosunek szans między konkurencyjnymi hipotezami, dotyczącymi pochodzenia profilu lub mieszaniny DNA. W rezultacie stosowanie analiz opartych na metodach probabilistycznych wydaje się logicznie uzasadnione oraz pozwala zmniejszyć subiektywizm w interpretacji wyników badań. Dokładne poznanie i zrozumienie zasad działania oraz ograniczeń narzędzi wykorzystywanych do statystycznych interpretacji wyników badań śladów biologicznych w kryminalistyce jest kluczowym etapem poprzedzającym formułowanie wniosków płynących z tych analiz. Proces sprawdzenia wydajności programu *LRmix Studio* oraz wiarygodności i powtarzalności wyników obejmował pojedyncze profile oraz mieszaniny od dwóch i trzech osób. Wykonano 1971 porównań z profilami referencyjnymi. Określono poprawność generowanych prawdopodobieństw warunkowych oraz wyznaczono ograniczenia w postaci liczby zjawisk *drop-out* w profilu dowodowym, których przekroczenie może generować fałszywe wartości LR.

Słowa kluczowe: mieszaniny DNA, iloraz wiarygodności, *LRmix Studio*, walidacja, genetyka sądowa

Wstęp

Analiza śladów zawierających DNA od dwóch lub więcej osób jest jednym z najtrudniejszych wyzwań stojących przed biegłymi z zakresu genetyki sądowej. Tego rodzaju ślady wymagają specjalistycznej wiedzy, doskonałego warsztatu badawczego oraz zachowania szczególnej ostrożności przy formułowaniu wniosków. Do biegłego należy prawidłowe oszacowanie wartości dowodu z badań i przedstawienie wyniku w sposób logiczny i przejrzysty dla organu procesowego, ale przede wszystkim zgodny ze standardami przyjętymi w środowisku genetyków sądowych. W świetle szybkiego rozwoju metod i narzędzi biostatystycznych Komisja DNA Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ang. International Society for Forensic Genetics – ISFG) przekonuje, że właściwą metodą oceny wartości dowodu z badań DNA jest metoda probabilistyczna oparta na ilorazie wiarygodności (ang. *Likelihood Ratio* – LR) (Gill i in., 2012), szczególnie w przypadku analiz dotyczących mieszanin DNA od dwóch i więcej osób, zwłaszcza gdy ilość pochodzącego od nich matrycowego DNA jest niewielka (Coble i in., 2016).

Analiza przeprowadzana za pomocą modeli probabilistycznych opartych na szacowaniu wartości ilorazu wiarygodności polega na ocenie ustaleń z badań genetycznych w odniesieniu do alternatywnych hipotez (H_p – hipotezy prokuratora i H_d – hipotezy obrońcy) dotyczących pochodzenia DNA w śladzie, sformułowanych przy uwzględnieniu okoliczności przestępstwa lub wskazanych przez organ procesowy. Współczynnik wiarygodności mierzy siłę wsparcia, jaką zapewniają ustalenia z badań w celu rozróżnienia konkurencyjnych hipotez kryminalistycznych będących przedmiotem zainteresowania. Jest naukowo akceptowanym i logicznie uzasadnionym sposobem prezentowania wniosków z badań genetycznych (Haned i in., 2015). Po sformułowaniu hipotez analiza matematyczna jest jednak bardzo złożona i można ją wykonać jedynie za pomocą specjalistycznego oprogramowania (Coble i in., 2016).

LRmix Studio to system ekspercki przeznaczony do statystycznej oceny profili DNA, umożliwiający określenie wartości dowodowej dowolnego profilu DNA ze szczególnym uwzględnieniem złożonych mieszanin DNA (Haned, Jong, 2016). Model statystyczny

Tab. 1. Symulowane mieszaniny DNA z odpowiadającymi im ilościami DNA.

Na przykład próbka numer 0.5 zawiera trzy komponenty, A, B i C. Kolumna *Drop-out* zawiera liczbę alleli z odpowiednich komponentów mieszaniny, które nie są obecne w próbce (to znaczy mają wysokość pików poniżej progu wykrywania wynoszącego 50 RFU), na przykład próbka 1.1 ma kombinację profili referencyjnych (D, E, F) z ze zjawiskami *drop-out* (0, 3, 2). Kolumna „Powyżej ST” oznacza składniki symulowanych mieszanin DNA, dla których wszystkie wysokości alleli były powyżej progu stochastycznego (tu powyżej 200 RFU). Wartości w nawiasach w kolumnie „Próbki” oznaczają liczbę powtórzeń.

Próbki	Składniki mieszanin DNA	Degradacja	DNA (pg)	Drop-out	Powyżej ST
0.1 (3)	(A, B)	Nie	(150, 30)	0, 3 / 0, 10 / 0, 6	brak
0.2 (3)	(A, B)		(300, 30)	0, 4 / 0, 15 / 0, 8	A
0.3 (3)	(A, B)		(30, 150)	5, 0 / 4, 0 / 6, 0	brak
0.4 (3)	(A, B)		(30, 300)	5, 0 / 7, 0 / 14, 0	B
0.5 (3)	(A, B, C)	Nie	(150, 6, 30)	0, 19, 13 / 2, 27, 22 / 0, 26, 11	brak
0.6 (3)	(A, B, C)		(150, 30, 30)	0, 4, 8 / 0, 7, 8 / 0, 5, 12	brak
0.7 (3)	(A, B, C)		(300, 6, 30)	0, 22, 11 / 0, 23, 11 / 0, 23, 14	A
0.8 (3)	(A, B, C)		(300, 30, 30)	0, 7, 13 / 0, 7, 14 / 0, 8, 13	A
0.9	(M, N, O)		(500, 250, 250)	0, 0, 4	M
0.10	(S, P, R)		(500, 250, 50)	0, 0, 8	S
0.11	(A, B)	Tak	(100, 40)	6, 16	brak
0.12	(C, D)		(100, 40)	5, 15	brak
0.12_II	(C, D)		(100, 40)	2, 10	brak
0.14	(G, H)		(100, 40)	4, 27	brak
0.14_II	(G, H)		(100, 40)	1, 10	brak
0.15	(I, J)		(100, 40)	9, 29	brak
0.15_II	(I, J)		(100, 40)	0, 11	brak
0.16	(A, B)	Tak	(250, 40)	8, 27	brak
0.17	(C, D)		(250, 40)	2, 21	brak
0.17_II	(C, D)		(250, 40)	0, 12	C
0.19	(G, H)		(250, 40)	0, 13	G
0.20	(I, J)		(250, 40)	0, 15	brak
0.22	(C, D)	Tak	(40, 100)	16, 5	brak
0.22_II	(C, D)		(40, 100)	26, 2	brak
0.24	(G, H)		(40, 100)	10, 6	brak
0.25	(I, J)		(40, 100)	15, 0	brak
0.27	(C, D)	Tak	(40, 300)	18, 0	brak
0.28	(E, F)		(40, 300)	21, 8	brak
0.28_II	(E, F)		(40, 300)	21, 8	brak
0.30	(I, J)		(40, 300)	17, 0	brak
1.1	(D, E, F)	Nie	(100, 40, 40)	0, 3, 2	brak
2.1	(G, H, I)		(100, 40, 40)	0, 4, 0	brak
3.1	(J, K, L)		(100, 40, 40)	0, 3, 6	brak
4.1	(M, N, O)		(100, 40, 40)	1, 6, 11	brak
5.1	(S, P, R)		(100, 40, 40)	2, 2, 4	brak
6.1	(W, T, U)		(100, 40, 40)	1, 7, 0	brak
7.1	(X, Y, Z)		(100, 40, 40)	1, 4, 1	brak

Tab. 1. cd.

Próbki	Składniki mieszanin DNA	Degradacja	DNA (pg)	Drop-out	Powyżej ST
1.2	(D, E, F)	Nie	(250, 40, 40)	1, 14, 9	brak
2.2	(G, H, I)		(250, 40, 40)	0, 2, 5	G
3.2	(J, K, L)		(250, 40, 40)	0, 7, 6	brak
4.2	(M, N, O)		(250, 40, 40)	0, 0, 7	M
5.2	(S, P, R)		(250, 40, 40)	0, 2, 5	S
6.2	(W, T, U)		(250, 40, 40)	0, 9, 3	brak
7.2	(X, Y, Z)		(250, 40, 40)	0, 3, 5	X
1.3	(D, E, F)	Nie	(250, 250, 40)	0, 0, 7	D
2.3	(G, H, I)		(250, 250, 40)	0, 0, 7	G
3.3	(J, K, L)		(250, 250, 40)	0, 0, 11	J
4.3	(M, N, O)		(250, 250, 40)	0, 0, 10	brak
5.3	(S, P, R)		(250, 250, 40)	0, 0, 11	S
6.3	(W, T, U)		(250, 250, 40)	2, 0, 6	brak
7.3	(X, Y, Z)		(250, 250, 40)	0, 0, 9	brak
1.4	(D, E, F)	Nie	(500, 40, 40)	0, 7, 4	D
2.4	(G, H, I)		(500, 40, 40)	0, 3, 10	G
3.4	(J, K, L)		(500, 40, 40)	0, 7, 9	brak
4.4	(M, N, O)		(500, 40, 40)	0, 1, 9	M
5.4	(S, P, R)		(500, 40, 40)	0, 6, 5	S
6.4	(W, T, U)		(500, 40, 40)	0, 6, 2	W
7.4	(X, Y, Z)		(500, 40, 40)	0, 4, 7	X
1.5	(D, E, F)	Nie	(500, 250, 40)	0, 0, 7	D
2.5	(G, H, I)		(500, 250, 40)	0, 0, 8	G
3.5	(J, K, L)		(500, 250, 40)	0, 0, 4	J
4.5	(M, N, O)		(500, 250, 40)	0, 0, 3	M, N
5.5	(S, P, R)		(500, 250, 40)	0, 0, 4	S
6.5	(W, T, U)		(500, 250, 40)	0, 0, 2	W
7.5	(X, Y, Z)		(500, 250, 40)	0, 0, 5	X

przyjęty w oprogramowaniu *LRmix Studio* uwzględnia oznaczenie alleli i liczbę składników mieszaniny DNA. Model taki określany jest jako jakościowy ciągły (ang. *qualitative continuous model*) (ENFSI, 2015). Program umożliwia obliczanie ilorazów wiarygodności dla profili i mieszanin DNA z wieloma składnikami i replikacjami, a także uwzględnia efekty stochastyczne związane z PCR, takie jak *drop-out* i *drop-in* (Haned, Gill, 2011). W niniejszym artykule opisujemy badania mające na celu walidację wewnętrzną programu *LRmix Studio* przeprowadzoną w ramach rekomendacji Komisji DNA ISFG (Coble i in., 2016) oraz ENFSI (ENFSI, 2015). Projektując doświadczenia walidacyjne, wsparło się przykładami zaprezentowanymi przez Øyvind Bleka (Bleka i in., 2016).

Materiały

Profilowanie STR

Profile DNA generowano przy zastosowaniu zestawu odczynników PowerPlex Fusion 6C (Promega) oraz termocyklera GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Liczba cykli amplifikacji wynosiła 29. Produkty reakcji PCR poddano elektroforezie kapilarnej przy użyciu analizatora genetycznego ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems). Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono za pomocą programu GeneMapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems), stosując próg analizy na poziomie 50 RFU oraz próg stochastyczny (ang. *Stochastic Threshold* – ST) na poziomie 200 RFU.

Profile DNA – baza próbek

Próbkę badawczą stanowiło 27 pojedynczych profili DNA, 32 mieszaniny DNA od dwóch osób i 48 mieszanin DNA od trzech osób, utworzonych przez zmieszanie próbek referencyjnych (o znanych profilach DNA) od 24 niespokrewnionych osób z populacji polskiej (tabela 1). Dodatkowo dane wykorzystane do wewnętrznych badań walidacyjnych obejmowały wyniki profilowania DNA z seryjnie rozcieńczonej próbki referencyjnej (1–0,03 ng) amplifikowanej w dwóch powtórzeniach. Wykorzystany materiał biologiczny stanowiły próbki krwi pobrane w ramach realizacji projektu NEXT (DOB-BIO7/17/01/2015). Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (KBET/122/6120/11/2016). Mieszaniny przygotowano przez zmieszanie dwóch i trzech składników w różnych proporcjach, stosując składniki o dużej zawartości matrycowego DNA (500 pg, 300 pg, 250 pg na składnik) oraz jeden lub dwa składniki o niskiej zawartości matrycowego DNA (100 pg, 40 pg, 30 pg, 6 pg na składnik). Próbki o numerach od 0.1 do 0.8 amplifikowano w trzech powtórzeniach, tzn. wykonano trzy oddzielne amplifikacje z tego samego izolatu DNA. Próbki o numerach od 0.11 do 0.30 były dodatkowo poddane procesowi degradacji przez siedmiogodzinną ekspozycję na światło słoneczne (Yoon i in., 2000). Wyniki profilowania DNA zostały wyeksportowane z GeneMapper ID-X i zaimportowane do *LRmix Studio* w wersji 2.1.3.

We wszystkich zbadanych mieszaninach DNA obserwowano zjawisko *drop-out*, czyli wypadanie alleli. Liczbę wypadających alleli określono przez zliczenie tych alleli, których korespondujące allele (odpowiedniki) w profilu referencyjnym miały w symulowanych mieszaninach wysokość poniżej 50 RFU (homozygoty liczono dwukrotnie).

Metody

Formuła likelihood ratio (LR)

Aby oszacować siłę wartości dowodowej w celu ustalenia, czy DNA osoby pozostającej w zainteresowaniu (ang. *Person Of Interest* – POI) jest składnikiem próbki *E*, zastosowano następującą formułę *likelihood ratio* (LR):

$$(1) LR = \frac{P(E|H_p)}{P(E|H_d)}, \text{ gdzie}$$

H_p : DNA w próbce pochodzi od osoby pozostającej w zainteresowaniu (POI),

H_d : DNA w próbce pochodzi od innej nieznannej, niespokrewnionej z POI osoby

Do oceny efektów stochastycznych wykorzystano model *drop-out/drop-in* zaimplementowany w programie *LRmix* (Haned i in., 2015). Powyższy model oprócz sformułowania wspomnianych hipotez, które będą oceniane za pomocą ilorazów prawdopodobieństwa, wymaga określenia dodatkowych parametrów wejściowych:

- częstości występowania alleli w populacji docelowej, wykorzystywanych do obliczania prawdopodobieństw genotypów w profilach nieznanymi osobami,
- korekty F_{st} służącej do korygowania niepewności w zakresie częstości alleli ze względu na strukturę subpopulacji,
- prawdopodobieństwa *drop-out*, które przekłada się na prawdopodobieństwo, że wypadły wszystkie allele hipotetycznego dawcy w ramach danej hipotezy,
- prawdopodobieństwa *drop-in*, czyli prawdopodobieństwa, że allel/allele niewyjaśnione przez hipotetycznych dawców w ramach danej hipotezy będą fałszywym allelem/allelami (niepochodzącym od żadnego z dawców) (Haned i in., 2012).

W trakcie przeprowadzanych obliczeń korektę F_{st} ustawiono na poziomie 0,01, natomiast prawdopodobieństwo *drop-in* na poziomie 0,05. Wartość ta odpowiada oczekiwanemu wystąpieniu jednego allela wynikającego ze zjawiska *drop-in* na 20 *loci*, który może się pokrywać z allelami pochodzącymi od realnych składników mieszaniny DNA (Haned i in., 2012). Do przeprowadzanych obliczeń wykorzystano częstości alleli opracowane przez European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) dla populacji europejskiej (Welch i in., 2012). W zakresie pięciu markerów, dla których częstości alleli nie zostały ujęte w bazie ENFSI, wykorzystano dane opracowane przez producenta zestawu PowerPlex Fusion 6C (Promega) (Steffen i in., 2017).

Prawdopodobieństwo *drop-out* dla każdej mieszaniny DNA szacowano metodą symulacji Monte Carlo, zaimplementowaną w programie *LRmix Studio*, z wykorzystaniem liczby 1000 symulacji przeprowadzanych w ramach każdej z hipotez. Zgodnie z metodologią zawartą w publikacji: Haned i in. (2015), założono, że oszacowana wartość prawdopodobieństwa *drop-out* jest taka sama dla wszystkich składników mieszaniny DNA, z wyjątkiem sytuacji, gdy jeden ze składników mieszaniny można uznać za znany – *K* (*known*). Wówczas dla tego składnika założono zerową wartość prawdopodobieństwa *drop-out*.

Program *LRmix Studio* w wyniku symulacji Monte Carlo wyznacza granice rozkładu prawdopodobieństwa *drop-out* w zakresie od 5 do 95 percentyla (Gill, Haned, 2013). Podczas analiz statystycznych iloraz wiarygodności obliczano, pozostając przy podejściu konserwatywnym, które jest użyciem mniejszego kwantyla rozkładu wartości LR jako miary wartości dowodowej. W większości przypadków raportowano LR odpowiadający w rzeczywistości percentylowi 5% rozkładu prawdopodobieństwa *drop-out* uzyskanego w wyniku symulacji Monte Carlo.

Projekt doświadczeń

Przeprowadzając poszczególne analizy statystyczne dla każdej symulowanej mieszaniny DNA (czyli dla każdej z 80 mieszanin DNA skomponowanych z 24 próbek referencyjnych), osobą pozostającą w zainteresowaniu

(POI) potraktowano po kolei jako każdą z 24 próbek referencyjnych, co dało 24 porównania na mieszaninę DNA. Analizy statystyczne przeprowadzono zgodnie z założeniami:

$$(2) LR = \frac{POI+UN+UN}{3 UN} \text{ lub } LR = \frac{POI+UN}{2 UN}, \text{ gdzie}$$

POI – osoba pozostająca w zainteresowaniu,

UN – osoba nieznaną

Dla 37 mieszanin DNA jeden z ich składników mógł być warunkowany *a priori* jako „osoba znana” – K. Profile tych składników miały wszystkie wysokości alleli powyżej progu stochastycznego, czyli powyżej 200 RFU. Dało to dodatkowych kilkadziesiąt porównań dla każdej z 37 mieszanin, według poniższych wzorów:

$$(3) LR = \frac{K+POI}{2 UN}, LR = \frac{K+POI}{K+UN},$$

$$LR = \frac{K+POI+UN}{3 UN}, LR = \frac{K+POI+UN}{K+2 UN}, \text{ gdzie}$$

POI – osoba pozostająca w zainteresowaniu,

UN – osoba nieznaną,

K – osoba znana.

Ostatecznie przeanalizowano 208 porównań, w których POI jest prawdziwym składnikiem mieszaniny DNA, oraz 1712 porównań, w których POI nie jest prawdziwym składnikiem mieszaniny DNA.

Wyniki i dyskusja

Analiza pojedynczych profili DNA

Ocenę pojedynczych profili DNA w programie *LRmix Studio* przeprowadzono zgodnie ze wzorem (1). Wartości LR raportowane przez program *LRmix Studio*

dla 27 pojedynczych profili DNA, dla których genotypy w każdym *locus* były jednoznaczne (bez *drop-out*), otrzymano w zakresie od $1,58 \times 10^{28}$ do $1,32 \times 10^{32}$ (tj. wartości $\log_{10}(LR)$ raportowane były w zakresie od 28,54 do 32,14). Wielokrotna analiza tego samego profilu DNA na walidowanym programie dawała powtarzalne wyniki.

Analiza mieszanin DNA

Porównywano wartości LR dla mieszanin DNA i pojedynczych profili DNA, w których osoba pozostająca w zainteresowaniu (POI) jest prawdziwym składnikiem dla obu tych typów próbek. Zgodnie z oczekiwaniem iloraz wiarygodności dla wszystkich analizowanych mieszanin DNA w żadnym przypadku nie był większy od ilorazu wiarygodności uzyskanego dla pojedynczego profilu DNA osoby pozostającej w zainteresowaniu. Ponadto wielokrotna analiza tych samych mieszanin DNA na walidowanym programie dawała powtarzalne wyniki.

Badanie wydajności modelu

W celu weryfikacji wydajności modelu zaimplementowanego w *LRmix Studio* wykorzystano wyniki profilowania DNA seryjnie rozcieńczonej próbki referencyjnej (tabela 2). Wykazano, iż raportowane przez program *LRmix Studio* wartości LR oszacowywane zgodnie ze wzorem (1) dla pojedynczych profili DNA obniżały się odpowiednio wraz ze zmniejszającą się ilością matrycowego DNA w próbce (1–0,03 ng), tj. od wartości maksymalnej dla pełnego profilu ($\log_{10}(LR) = 29,21$) w kierunku wartości LR = 0, wynikającej z wystąpienia zjawiska *drop-out* (Taylor, 2014). Po uwzględnieniu w obliczeniach szacowanego przy użyciu symulacji Monte Carlo prawdopodobieństwa *drop-out* wszystkie wyniki LR uzyskane dla niepełnych profili DNA miały wartość dodatnią, wspierając hipotezę H_p . Jednocześnie, zgodnie z oczekiwaniem, uzyskiwano odpowiednio niższe

Tab. 2. Wynik oszacowania wartości LR dla pojedynczych profili DNA powstałych w wyniku seryjnego rozcieńczenia jednej próbki DNA w dwóch powtórzeniach: a, b.

Ilość matrycowego DNA (ng)	Liczba <i>drop-out</i>	Log ₁₀ (LR)	Wartość prawdopodobieństwa P(D)
1a	0	29,21	0
1b	0	29,21	0
0,5a	1	27,33	0,01
0,5b	0	29,21	0
0,25a	3	24,31	0,02
0,25b	5	24,71	0,03
0,125a	11	19,64	0,18
0,125b	7	20,66	0,09
0,06a	19	11,23	0,36
0,06b	22	10,81	0,44
0,03a	34	5,16	0,68
0,03b	26	9,46	0,50

Tab. 3. Wyniki analizy biostatystycznej dla trzech próbek amplifikowanych w trzech powtórzeniach: a, b, c.

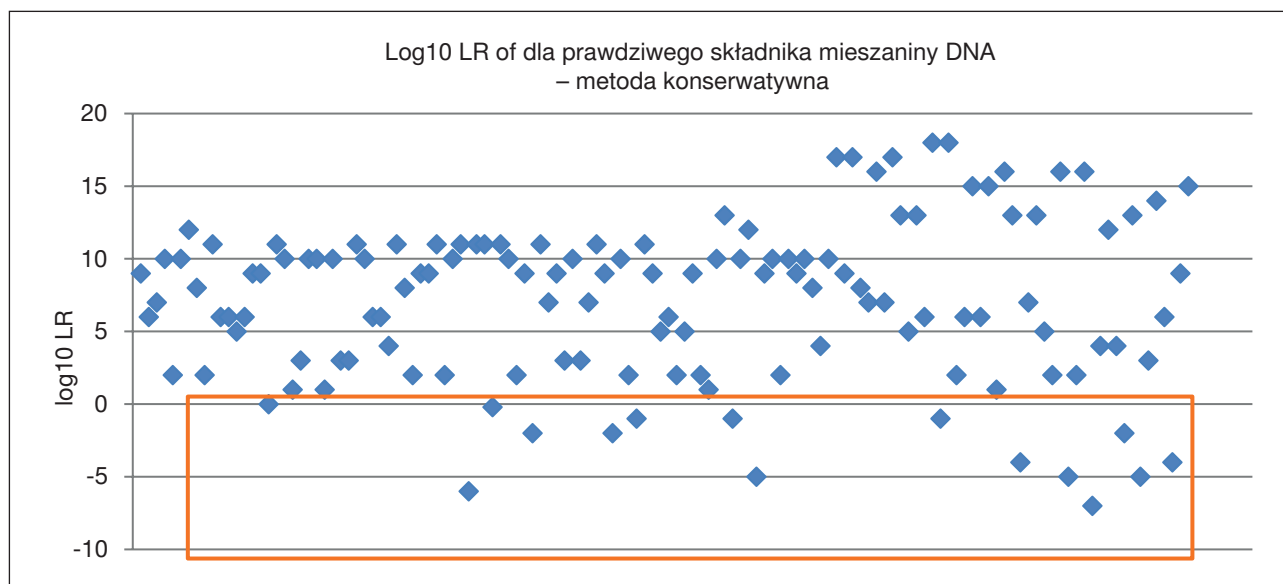
Nr próbki	Prawdziwy składnik, POI	Liczba zjawisk <i>drop-out</i>	Log10(LR)	Wspólny Log10(LR) dla trzech replikacji
0.8a	B	0, 7, 13	5,73	8,46
0.8b		0, 7, 14	6,56	
0.8c		0, 8, 13	4,86	
0.6a	C	0, 4, 8	0,005	3,43
0.6b		0, 7, 8	2,03	
0.6c		0, 5, 12	-1,62	
0.4a	A	7, 0	6,73	4,63
0.4b		6, 0	6,05	
0.4c		14, 0	1,72	

wartości LR dla niepełnych profili, w miarę nasilającego się zjawiska *drop-out*, a szacowane wartości prawdopodobieństwa *drop-out* wzrastały proporcjonalnie do zwiększającej się liczby wypadających alleli w kolejnych rozcieńczeniach próbki.

Badanie próbek w kilku powtórzeniach

W badaniach wykorzystano wyniki profilowania mieszanin DNA od trzech osób, amplifikowanych w trzech powtórzeniach. Analizy statystyczne dokonywane były osobno dla poszczególnych profili DNA uzyskanych z niezależnych amplifikacji tego samego ekstraktu DNA, a następnie przeprowadzono równoczesne analizy trzech powtórzeń amplifikacji tej samej próbki. W przypadku niskiej ilości matrycy DNA w próbce efekty stochastyczne w kolejnych powtórzeniach PCR tej samej próbki powodują duże zróżnicowanie

w wysokości pików, balansie heterozygotycznym oraz w liczbie zjawisk *drop-out* (Gill i in., 2000; Benschop i in., 2011). W odniesieniu do profili DNA wykazujących *drop-out* jednoczesna analiza statystyczna trzech powtórzeń amplifikacji w *LRmix Studio*, uwzględniająca ten sam składnik POI, zapewniała w większości przypadków wyższą wartość LR, niż gdy każde powtórzenie było analizowane osobno (tabela 3). Wynik LR dla łącznej analizy był tym większy od wartości LR uzyskiwanych dla pojedynczych wyników badań, im bardziej jednorodne były poszczególne wyniki szacowane dla kolejnych trzech powtórzeń. Gdy natomiast wyniki powtórzonych badań są rozbieżne, wynik LR dla łącznej ich analizy może być mniejszy niż wartości LR uzyskiwane dla pojedynczych wyników badań, co widać na przykładzie próbek oznaczonych numerem 0.4.



Ryc. 1. Wyniki porównań, w których próbka od osoby pozostającej w zainteresowaniu jest prawdziwym składnikiem mieszaniny DNA (czyli H_p jest prawdziwa). Obliczenia wartości LR były prowadzone z zastosowaniem metody konserwatywnej. Przypadki fałszywie negatywne zostały ujęte w pomarańczową ramkę.

Tab. 4. Wszystkie przypadki mieszanin DNA, dla których wyniki analizy statystycznej po uwzględnieniu prawdziwego składnika dały wartość $LR < 1$.

POI to osoba pozostająca w zainteresowaniu. DNA – ilość DNA dla każdego ze składników mieszaniny, z pogrubioną czcionką wskazującą POI. *Drop-out* – liczba obserwacji wystąpienia zjawiska *drop-out* alleli, liczona dla POI. LR – wartość ilorazu wiarygodności oszacowana za pomocą *LRmix Studio*.

Nr próbki	POI	DNA (pg)	Liczba zjawisk <i>drop-out</i>	LR
6.1	T	100: 40 :40	1, 7, 0	0,4
2.3	I	250:250: 40	0, 0, 7	4e-06
3.3	L	250:250: 40	0, 0, 11	1e-04
1.2	E	250: 40 :40	1, 14, 9	0,23
5.3	R	250:250: 40	0, 0, 11	3e-05
2.4	I	500:40: 40	0, 3, 10	0,0012
3.4	L	500:40: 40	0, 7, 9	0,03
1.5	F	500:250: 40	0, 0, 7	0,001
2.2	I	250:40: 40	0, 2, 5	0,9
2.5	I	500:250: 40	0, 0, 8	4e-05
0.5	B	150: 6 :30	0, 19, 13	3e-06
0.7a	B	300: 6 :30	20, 22, 11	1e-04
0.8a	C	300:30: 30	0, 6, 13	0,005
0.2b	B	300: 30	0, 15	0,02
0.5b	B	150: 6 :30	2, 27, 22	2e-04
0.5c	B	150: 6 :30	0, 26, 11	8e-06
0.6a	C	150:30: 30	0, 4, 8	0,5
0.6c	C	150:30: 30	0, 5, 12	0,02
0.7b	B	300: 6 :30	0, 23, 11	3e-05
0.8b	C	300:30: 30	0, 7, 14	2e-4
0.7b	B	300: 6 :30	0, 23, 11	9e-05
0.14	H	100: 40	4, 27	2e-05
0.15	J	100: 40	9, 29	0,0162
0.16	B	250: 40	8, 27	1e-04
0.19	H	250: 40	0, 13	0,5
0.25	I	40 :100	15, 0	0,0088
0.27	C	40 :300	18, 0	0,3
0.30	I	40 :300	17, 0	0,1102
0.17	D	250: 40	2, 21	0,02

Wskazania fałszywie negatywne ($LR < 1/H_p$ jest PRAWDZIWA)

Badanie inklinacji programu probabilistycznego do fałszywie negatywnych wykluczeń obejmuje test czułości systemu i odnosi się do oceny zdolności programu do niezawodnego szacowania wartości LR wspierających założenia co do obecności DNA pochodzącego od rzeczywistej osoby w wynikach profilowania DNA (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, 2016; Moretti i in., 2017). Rycina 1 pokazuje wyniki LR

dla porównań, w których POI był prawdziwym składnikiem mieszanin DNA. Obliczenia wartości LR były prowadzone z zastosowaniem metody konserwatywnej. Dla 20 mieszanin DNA od trzech osób (na 144 analizowane) uzyskano wartości LR poniżej 1, podczas gdy DNA osoby, której analiza dotyczyła (POI), jest prawdziwym składnikiem danej mieszaniny (H_p jest prawdziwa), a zatem dla powyższych przypadków uzyskano wyniki fałszywie negatywne. Na rycinie 1 wyniki te ujęte są w pomarańczową ramkę. Dla mieszanin DNA

od dwóch osób uzyskano 10 takich przypadków (na 64 analizowane). Wszystkie przypadki fałszywych wykluczeń ($LR < 1 | H_p$ jest „PRAWDZIWA”) zaprezentowano w tabeli 4. Fałszywie negatywne wyniki LR scharakteryzowano jako ograniczenie programu, dotyczą one jednak szczególnej kategorii mieszanin DNA – zawsze gdy udział POI w mieszaninie był równy wartości 40 pg bądź mniejszy.

Wskazania fałszywie pozytywne ($LR > 1 | H_p$ jest FAŁSZYWA)

Rycina 2 pokazuje wyniki LR dla porównań, w których POI nie jest prawdziwym składnikiem mieszaniny DNA. Na 1712 wykonanych porównań nie stwierdzono wskazań fałszywie pozytywnych, tj. wyników z dodatnimi wartościami LR (wartości LR nieco powyżej jednego), w sytuacji gdy DNA osoby pozostającej w zainteresowaniu nie jest prawdziwym składnikiem danej mieszaniny (H_p jest prawdziwa). Obliczenia LR były prowadzone z zastosowaniem metody konserwatywnej. Na rycinie 2 można zaobserwować, iż żaden z wyników nie przekracza granicznej wartości $LR = 1$ oznaczonej czerwoną linią.

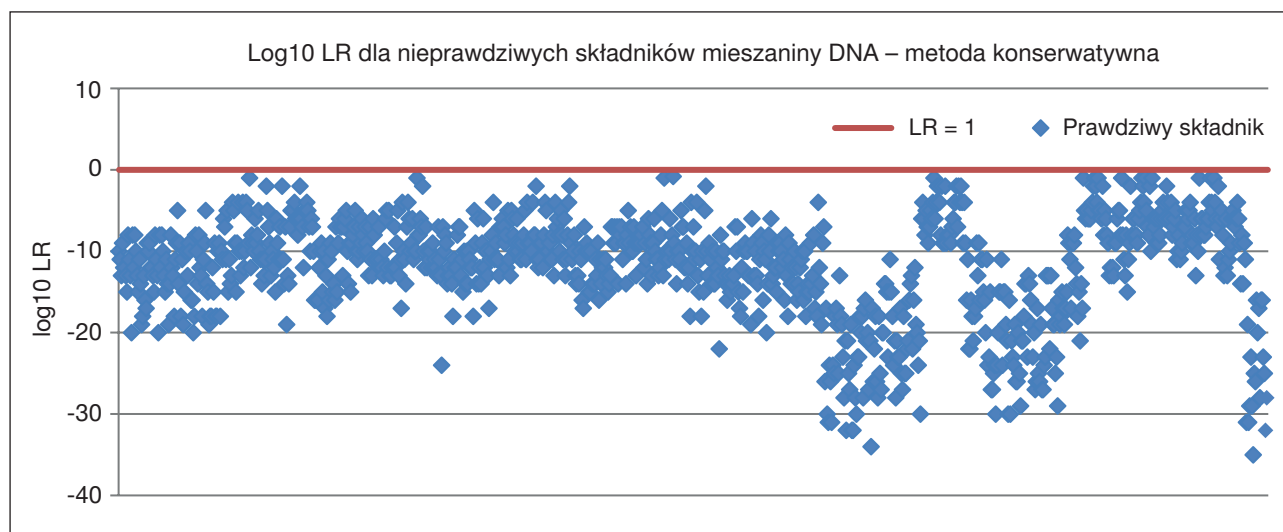
Wartość LR jako funkcja wypadania alleli

Zjawisko *drop-out* ma ogromny wpływ na interpretację profili genetycznych oznaczonych ze śladów zabezpieczonych z miejsca przestępstwa, stwarzając ryzyko fałszywych inkluzji lub wykluczeń. Programy probabilistyczne, takie jak *LRmix Studio*, przeznaczone szczególnie dla próbek z niewielką ilością DNA, mogą pozwolić laboratorium na poszerzenie zakresu interpretacji mieszanin DNA o takie właśnie przypadki. Nadal jednak nie jest możliwe poddanie wszystkim złożonych mieszanin DNA analizie probabilistycznej. Jeśli profil dowodowy znajduje się poniżej określonego poziomu lub wypadła zbyt duża liczba alleli, jego

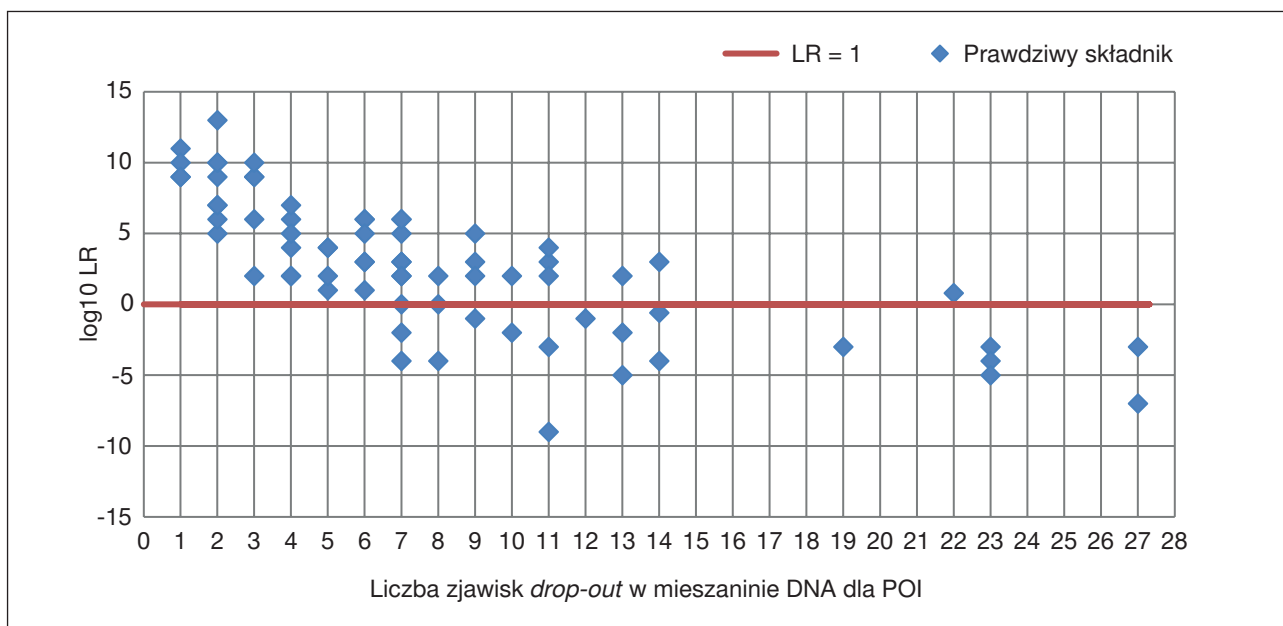
interpretacja wciąż może być niemożliwa (Coble i in., 2016). Podczas badań walidacyjnych niezwykle istotne jest określenie liczby zjawisk *drop-out*, przy której mieszanina DNA nie kwalifikuje się już do interpretacji za pomocą modeli probabilistycznych. Na rycinach 3 i 4 przedstawiono, w jaki sposób wartości LR oszacowane metodą konserwatywną z użyciem programu *LRmix Studio* powiązane są z liczbą zjawisk *drop-out* (dla profilu POI) w przypadkach, w których POI jest rzeczywistym składnikiem mieszaniny DNA (H_p jest prawdziwa), a wskazania programu pozostały negatywne. Gdy H_p jest prawdziwa, limit dla obserwacji wartości $LR > 1$ uzyskanych za pomocą *LRmix Studio* wynosił do 4 zjawisk *drop-out* dla mieszanin DNA od trzech osób i do 12 zjawisk *drop-out* dla mieszanin DNA od dwóch osób. Wyznaczone limity stanowią najmniejszą liczbę zjawisk *drop-out* obserwowaną w wynikach profilowania DNA, powyżej której odnotowano fałszywie negatywne wartości $LR < 1$. Wynik analizy statystycznej profili DNA z większą liczbą zjawisk *drop-out* może być niewiarygodny.

Wnioski

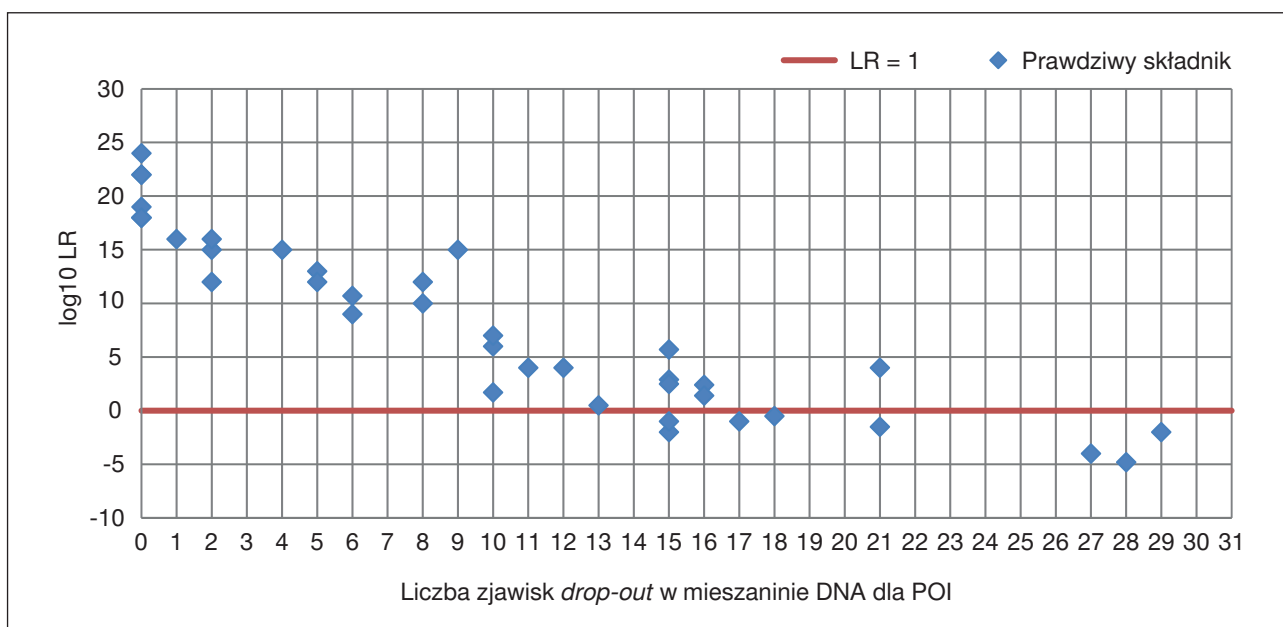
Proces sprawdzenia wydajności modelu jakościowego oraz wiarygodności i powtarzalności wyników raportowanych przez program *LRmix Studio* obejmował pojedyncze profile DNA oraz mieszaniny od dwóch i trzech osób o znanych profilach DNA. Celem badań było określenie ilorazu prawdopodobieństwa dla szerokiego zakresu porównań śladów typu LT-DNA (ang. *low template DNA*), których jakość sprawia największe trudności interpretacyjne. Z tego względu przygotowano próbki przez zmieszanie dwóch i trzech składników w różnych proporcjach, stosując składniki o dużej zawartości matrycowego DNA (500 pg, 300 pg, 250 pg) oraz zawsze jeden lub dwa składniki o niskiej zawartości matrycowego DNA (100 pg, 40 pg, 30 pg, 6 pg). Dodatkowo



Ryc. 2. Wyniki porównań, w których POI nie jest prawdziwym składnikiem mieszaniny DNA (H_p jest nieprawdziwa). Obliczenia wartości LR były prowadzone z zastosowaniem metody konserwatywnej. Czerwoną linią zaznaczono wartość $LR = 1$.



Ryc. 3. Sposób powiązania wartości LR z liczbą zjawisk *drop-out* dla POI, w przypadkach gdy POI jest rzeczywistym składnikiem mieszaniny DNA od trzech osób.



Ryc. 4. Sposób powiązania wartości LR z liczbą zjawisk *drop-out* dla POI, w przypadkach gdy POI jest rzeczywistym składnikiem mieszaniny DNA od dwóch osób.

niektóre próbki poddawano procesowi degradacji, tak aby badane mieszaniny DNA jak najlepiej odzwierciedlały realne ślady zebrane z miejsca zdarzenia. Dzięki temu uzyskano niekompletne profile z nasilonym zjawiskiem *drop-out* oraz *locus drop-out* (brak amplifikacji całego *locus*), które to zjawiska są powszechnie obserwowane w badaniach śladów typu LT-DNA (Gill, Buckleton, 2010; Buckleton i in., 2016). Badania walidacyjne obejmowały 250 porównań dla rzeczywistych składników próbek oraz 1712 porównań dla składników

niebędących prawdziwymi komponentami mieszanin DNA. Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że program *LRmix Studio* działał zgodnie z oczekiwaniami. Określone przez program prawdopodobieństwa genotypów były adekwatne do przewidywań, a wyniki statystyczne powtarzalne i uzasadnione.

Wyznaczenie ograniczeń programu probabilistycznego w ramach wewnętrznej walidacji jest kluczowe dla ustalenia zakresu profili DNA, które mogą być przez laboratorium poddawane analizie statystycznej.

Z tego względu każdy fałszywy wynik scharakteryzowano jako ograniczenie programu (przy założeniu $LR = 1$ jako wartości progowej). Na 1712 przeprowadzonych testów, 86% prawdziwych składników mieszanin DNA uzyskało wyniki LR wspierające hipotezę włączenia, a 100% fałszywie wybranych POI uzyskało wyniki LR wspierające hipotezę wykluczenia. Tym samym walidowana metoda spełnia warunek, według którego powinno się dążyć do minimalizowania liczby fałszywie pozytywnych dopasowań. Jednocześnie potwierdzono, iż zastosowanie metody konserwatywnej w obliczeniach statystycznych (Bleka i in., 2016), a także analiza mieszanin DNA w multipleksach STR zawierających przynajmniej 23 układy STR, ogranicza występowanie wyników fałszywie pozytywnych, zarówno w przypadku mieszanin dwuskładnikowych, jak i trzyskładnikowych. Minimalizowanie fałszywie pozytywnych wskazań jest osiągnięte kosztem nieznacznego wzrostu wyników fałszywie negatywnych (Bleka i in., 2016). Jednak w każdym przypadku fałszywe wykluczenia POI dotyczyły złożonych pod względem jakościowym mieszanin DNA od dwóch i trzech osób, w których prawdziwy składnik (POI) miał niskie stężenie matrycowego DNA w reakcji PCR.

Przeprowadzone badania walidacyjne dowodzą, że *LRmix Studio* można z powodzeniem wdrożyć do laboratorium kryminalistycznego jako wiarygodne narzędzie służące do interpretacji wyników profilowania genetycznego za pomocą modeli probabilistycznych opartych na szacowaniu wartości ilorazu wiarygodności. Ocena statystyczna może dotyczyć zarówno kompletnych profili genetycznych, jak i wyników badań śladów LT-DNA. Stosowanie tej metody pozwala biegłym z zakresu genetyki sądowej ominąć konieczność podejmowania binarnych decyzji w przypadku wystąpienia efektu stochastycznego i alleli podprogowych. Walidowany program ogranicza tym samym subiektywizm oceny uzyskanych wyników oraz sprzyja standaryzacji formułowanych wniosków.

Źródła rycin i tabel: autorzy

Bibliografia

1. Benschop, C.C.G., Van Der Beek, C.P., Meiland, H.C., Van Gorp, A.G.M., Westen, A.A., Sijen, T. (2011). Low template STR typing: Effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results. *Forensic Science International: Genetics*, 5(4), <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.06.006>.
2. Bleka, Ø., Benschop, C.C.G., Storvik, G., Gill, P. (2016). A comparative study of qualitative and quantitative models used to interpret complex STR DNA profiles. *Forensic Science International: Genetics*, 25, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.016>.
3. Buckleton, J., Bright, J.A., Taylor, D. (2016). *Forensic DNA evidence interpretation*. W: J. Buckleton, J.A. Bright, D. Taylor (red.), *Forensic DNA Evidence Interpretation*. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.4324/9781315371115>.
4. Coble, M.D., Buckleton, J., Butler, J.M., Egeland, T., Fimmers, R., Gill, P., ... Prinz, M. (2016). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Recommendations on the validation of software programs performing biostatistical calculations for forensic genetics applications. *Forensic Science International: Genetics*, 25, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.09.002>.
5. ENFSI (2015). *Best Practice Manual for the internal validation of probabilistic software to undertake DNA mixture interpretation* (n.d.).
6. Gill, P., Buckleton, J. (2010). A universal strategy to interpret DNA profiles that does not require a definition of low-copy-number. *Forensic Science International: Genetics*, 4(4), <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.008>.
7. Gill, P., Gusmão, L., Haned, H., Mayr, W.R., Morling, N., Parson, W., ... 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>.
8. Gill, P., Haned, H. (2013). A new methodological framework to interpret complex DNA profiles using likelihood ratios. *Forensic Science International: Genetics*, 7(2), <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.11.002>.
9. Gill, P., Whitaker, J., Flaxman, C., Brown, N., Buckleton, J. (2000). An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Science International*, 112(1), [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00158-4).
10. Haned, H., Slooten, K., Gill, P. (2012). Exploratory data analysis for the interpretation of low template DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*, 6(6), <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.08.008>.
11. Haned, H., Benschop, C.C.G., Gill, P. D., Sijen, T. (2015). Complex DNA mixture analysis in a forensic context: Evaluating the probative value using a likelihood ratio model. *Forensic Science International: Genetics*, 16, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.014>.
12. Haned, H., Gill, P. (2011). Analysis of complex DNA mixtures using the Forensim package. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2011.08.039>.
13. Haned, H., Jong, J. De. (2016). *LRmix Studio 2.1 user manual*. 1–21.
14. Moretti, T.R., Just, R.S., Kehl, S.C., Willis, L.E., Buckleton, J.S., Bright, J.A., ... Onorato, A.J. (2017). Internal validation of STRmix™ for the interpretation of single source and mixed DNA profiles. *Forensic*

- Science International: Genetics*, 29, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.004>.
15. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. (2016). *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods Validation Guidelines for DNA Analysis Methods SWGDAM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods*. (December 2016), https://docs.wixstatic.com/ugd/4344b0_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf.
 16. Steffen, C.R., Coble, M.D., Gettings, K.B., Vallone, P.M. (2017). Corrigendum to 'U.S. Population Data for 29 Autosomal STR Loci' [*Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) e82–e83](S1872497312002712) (10.1016/j.fsigen.2012.12.004). *Forensic Science International: Genetics*, 31, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.08.011>
 17. Taylor, D. (2014). Using continuous DNA interpretation methods to revisit likelihood ratio behaviour. *Forensic Science International: Genetics*, 11(1), <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.03.008>.
 18. Welch, L.A., Gill, P., Phillips, C., Ansell, R., Morling, N., Parson, W., ... Bastisch, I. (2012). European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. *Forensic Science International: Genetics*, 6(6), <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.03.005>.
 19. Yoon, J. H., Lee, C.S., O'Connor, T.R., Yasui, A., Pfeifer, G.P. (2000). The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *Journal of Molecular Biology*, 299(3), <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3771>.