



EVALUATION OF THE INVESTIGATOR 26PLEX QS AND SUREID PANGLOBAL SYSTEMS IN FORENSIC ANALYSIS AND COMPARISON WITH COMMONLY USED NGM PCR AMPLIFICATION KIT

Magdalena MARCIŃSKA , Agnieszka PARYS-PROSZEK , Maria WRÓBEL

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

The aim of the study was to evaluate the novel kits – Investigator 26plex QS and SureID PanGlobal in forensic analysis and confront with commonly applied NGM PCR Amplification Kit. The internal validation study involved sensitivity, reliability, stochastic, DNA mixtures, inhibition parameters analysis and 15 casework samples extracted from blood, saliva, semen, tooth, bones, soft tissue and epithelial cells. The sensitivity experiments were performed on a total of 24 samples from seven serial dilutions of 007 control DNA. Mixture analysis was performed for two persons in different proportions using 9947 and 007 control DNA. Inhibition effect was tested using PCR inhibitor – humic acid. Among three compared kits the highest sensitivity was noted for Investigator 26plex QS considering the total number of the markers in each system, as well as the shared set of markers. However, low PCR efficiency of D6S1043 *locus* was observed with aforementioned kit. Mixture analysis performed with Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM kits, considering shared set of markers revealed that NGM Kit is the most sensitive for detecting minor components in a mixture. Similarly, we demonstrated that NGM is the most successful in the analysis of challenging forensic samples. The internal validation showed that the Investigator 26plex QS and SureID PanGlobal have weaker performance for routine forensic application in comparison to NGM Kit. However, thanks to increased number of markers, these systems could be helpful in analysis of complex cases in paternity testing and kinship analysis, in which standard genetic analysis is insufficient.

Keywords

Investigator 26plex QS Kit; SureID PanGlobal Human DNA Identification Kit; Sensitivity; Mixture analysis; Inhibition; Challenging samples.

Received 14 March 2022; accepted 7 June 2022

1. Introduction

In forensic genetics, the analysis of short tandem repeat (STR) multiplex systems is the standard approach employed in laboratories as it provides high level of discriminatory power for human identification and paternity applications (Alsafiah, Aljanabi, Hadi, Alturayef, Goodwin, 2019). As a result, the global forensic market is growing enormously manufacturing

a great number of new powerful methods of high sensitivity and improved stability that are provided in extended number of STR markers. According to the guidelines, newly introduced kits must contain a panel of 12 selected genetic markers referred to as ESS – European Set Standards (FGA, TH01, VWA, D1S1656, D2S441, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D18S51, D21S11, D22S1045), which are recommended by the international genetic societies

ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) and EDNAP (European DNA Profiling Group, Council Resolution, 2009). One of the latest multiplex amplification systems launched by Qiagen and Health Gene Technologies were Investigator 26plex QS Kit (Butler, 2015) and SureID PanGlobal Human DNA Identification Kit (Butler, 2006) respectively. Investigator 26plex QS Kit allows typing a set of 23 autosomal STRs, one Y-chromosome marker and sex determining marker in a 6-dye fluorescent chemistry. Additionally, it integrates the quality control system (Quality Sensor) allowing checking the performance of a sample. Such innovation was already implemented in other kits like NGM Detect PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific; Carboni, Iozzi, Nutini, Torricelli, Ricci, 2014). As for SureID PanGlobal Kit, it is a 6-dye system which enable analysis of 24 autosomal STRs, two Y-chromosome markers and sex determining marker. Introducing a new system to a laboratory needs to go through internal validation study to assess its analytical performance characteristics. In this study, we compare the robustness of these two novel kits with NGM PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific), commonly applied in forensic laboratories. The kits were analyzed under validation guidelines outlined by the SWGDAM (Council Resolution of November 2009 on the exchange of DNA analysis results, 2009) and ENFSI (ENFSI DNA Working Group, 2010) including the sensitivity, reliability, stochastic, DNA mixtures, inhibition parameters and casework study. The aim of this study was to evaluate the possibility of implementing Investigator 26plex QS and SureID PanGlobal Human DNA Identification kits as assays for human identification in routine forensic practice.

2. Material and methods

The sensitivity and stochastic tests were performed using Control DNA 007 (Thermo Fisher Scientific) prepared in triplicates in seven serial dilutions with the following inputs: 500, 250, 125, 62, 31, 15 and 7 pg DNA per reaction. Mixture studies were carried out for two persons with known ratios of DNA. In the experiment two, control DNAs (9947 – Promega, female donor) and 007 (Thermo Fisher Scientific, male donor) with a total DNA input of 1 ng were tested. Samples of mixtures consisting of female and male components were prepared in the following proportions: 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20. In one dilution series there was a decreasing proportion of the male component, while in the second series there was a decreasing

proportion of the female component. In order to obtain reliable test results, three independent amplification and electrophoresis reactions were performed for each sample of the mixture. The performance of the kits was also evaluated on samples obtained from the forensic practice regarding sexual assaults, robberies, homicides, road accidents and suspicious deaths. 15 casework samples were selected from own practice including different types of biological material: blood, saliva, semen, tooth, bones, soft tissue and epithelial cells. Samples of blood, saliva, semen, soft tissues and epithelial cells were magnetically isolated on the BioRobot M48 using the MagAttract (Qiagen) Kit, while bone and tooth samples were isolated organically with extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol. According to the manufacturer's guidelines, DNA in concentrations of 0.5 ng/μl (Investigator 26plex QS) and 1 ng/μl (SureID PanGlobal and NGM) was used for PCR reactions, and in the case of samples with insufficient DNA concentration, the maximum possible amount of isolate was added to the reaction. The analyzed casework samples were as well as of good quality – containing optimal amount of DNA and particularly challenging characterized by insufficient amount of DNA and high degree of degradation. DNA quantification was performed using 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) with Quantifiler Trio DNA Quantification Kit. Sample amplification and DNA separation were performed according to the relevant kit's manufactures' protocols (Investigator®26plex QS Handbook, 04/2019; Liu et al., 2017) on the same instruments to provide the same test conditions. All amplifications were performed using an ABI GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) and PCR products were subjected to capillary electrophoresis with an ABI 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). The final reaction volume per amplification reaction for the both evaluated systems was 25 μl. Control DNA 2800M (Promega Corporation) was amplified with the presence of increasing concentrations (50, 100, 150, 200 and 250 ng/μl) of common PCR inhibitor – humic acid (Sigma-Aldrich, USA). Results obtained for tested kits were compared to NGM Kit routinely used in our forensic practice.

3. Results

A sensitivity study was performed to estimate the capability of a kit to produce reliable profiles from a range of template DNA concentrations. Sensitivity analysis revealed that full profiles were generated until

125 pg input with Investigator 26plex QS and SureID PanGlobal Human DNA Identification. However, in case of Investigator 26plex for one replicate already at an input of 250 pg was noticed dropout of one of two heterozygote alleles at D6S1043 locus. This tendency continued at lower DNA inputs for all replicates. The results showed that compared to other markers, locus D6S1043 is amplified very weakly even under optimal conditions and therefore it is susceptible for dropouts in the greatest extent. The electropherograms showing amplification efficiency of D6S1043 marker within Investigator 26plex QS Kit are included in Figure 1. For the Investigator 26plex, more than 80% of undetected markers were recorded at a concentration of 31.3 pg DNA, while for the SureID PanGlobal, the number of undetected markers exceeded 50% at a concentration of 62.5 pg. Sensitivity analysis showed that the Investigator 26plex QS Kit outperforms other kits, whereas SureID PanGlobal gives the weakest STR allele recovery rates (Figure 2). Furthermore, these results persist also considering only shared set of markers (Figure 3). The two-known source DNA mixture studies showed single allele dropouts of minor male contributor at 1 : 5 ratio for Investigator 26plex and SureID PanGlobal kits. Significant loss of the minor male component detection was noticed from 1 : 10 for both Investigator 26plex and SureID PanGlobal and from 1 : 15 for NGM markers' sets. It should be mentioned that very low performance for one PCR replicate already from 1 : 2 mixture ratio was reported for SureID PanGlobal. In case of Investigator 26plex, the tendency of early amelogenin Y allele dropout in the mixture with major female component was observed. The data showed that this kit failed to detect the presence of Y marker at amelogenin locus for one replicate already at 1 : 5 and 1 : 8 proportions in contrast to the other two kits (Figure 4). However, implementing in the system additional Y-STR marker (DYS391 locus) may be helpful in avoidance errors in gender determination and mixture interpretation. In the loss of amelogenin Y signal, thanks to the positively typed *DYS391 locus* it was possible to correctly deconvolute the sex of the minor component (Figure 5). In turn, a decrease in the percentage of minor female alleles were identified already from 2 : 1 mixtures for both examined kits. Comparing Investigator 26plex, SureID PanGlobal and NGM mixture analysis, the best detection of minor component was noticed for the latter one. The performance of NGM was significantly better than other two kits considering the total (Figure 6), as well the shared set of markers (Figure 7). To test the reliability of kits in DNA exposed to diverse and often harsh environmental conditions, 15 forensic

casework samples were tested. The study sample consisted of good quality samples and DNA extracts characterized by a high degree of degradation and/or low concentration of DNA. The success rate of the amplification was analyzed under consideration the number of all of the STR markers contained in a respective kit as well as only 16 STRs shared by two novel tested kits and routinely used NGM Kit – D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, amelogenin gene, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391. The evaluation of the kits was performed in a group of good quality and challenging casework samples derived from bones, tooth or soft tissue that were subjected to high degradation. The amplification success rate of each system is summarized in Table 1. For all samples, the genotypes within positive detected markers were concordant among the three kits, however the profile completeness was different. In the case of seven casework samples of good quality, SureID Pan Global Kit allowed to obtain full profiles within all shared markers. However, single dropouts were observed under consideration the total number of markers. In turn, Investigator 26plex QS Kit gave full or partial profiles considering overlapping *loci* and the percentage of dropouts increased with all the markers included in the kit. In contrast to routinely applied NGM, for almost all casework samples with high degradation index and/or suboptimal input of DNA amplified with SureID Pan Global and Investigator 26plex QS chemistry, a significant decrease in positively typed markers was observed. The number of positively typed genetic markers occurring both within shared markers and a set of markers included in the tested kits for casework samples is presented in Table 2. Despite the significant quantitative predominance of genetic markers included in the new kits, for most samples with suboptimal DNA quantity/quality, the same or fewer positively detected genetic markers were recorded for SureID PanGlobal and/or Investigator 26plex compared to the NGM. Both tested kits failed to produce full profile of minor component in a mixture source sample. In order to assess the capability of the systems to perform with inhibitory substances encountered in DNA extracts from forensic casework samples, inhibition models were developed. The performance of kits with five different concentration of PCR inhibitor – humic acid revealed that full profiles were generated with SureID Pan Global Kit in the presence of 200 ng/μl humic acid, whereas NGM Kit demonstrated resistance with 250 ng/μl of inhibitor. In turn, single allelic drop outs were observed for Investigator 26plex QS from the concentration of 150 ng/μl of humic acid.

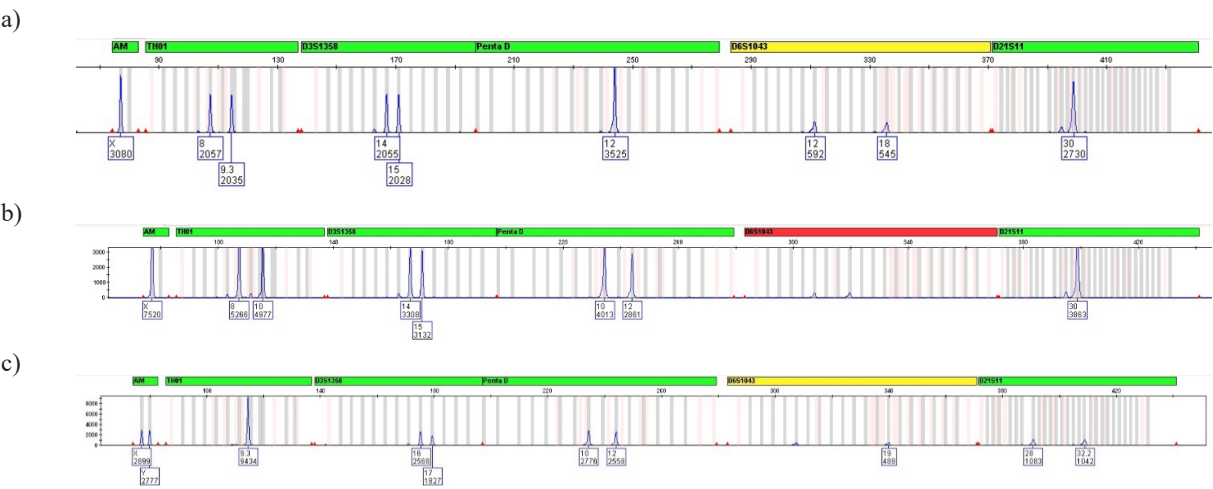


Figure 1. The electropherograms of three different samples (a, b, c) showing low efficiency of amplification of D6S1043 using Investigator 26plex QS.

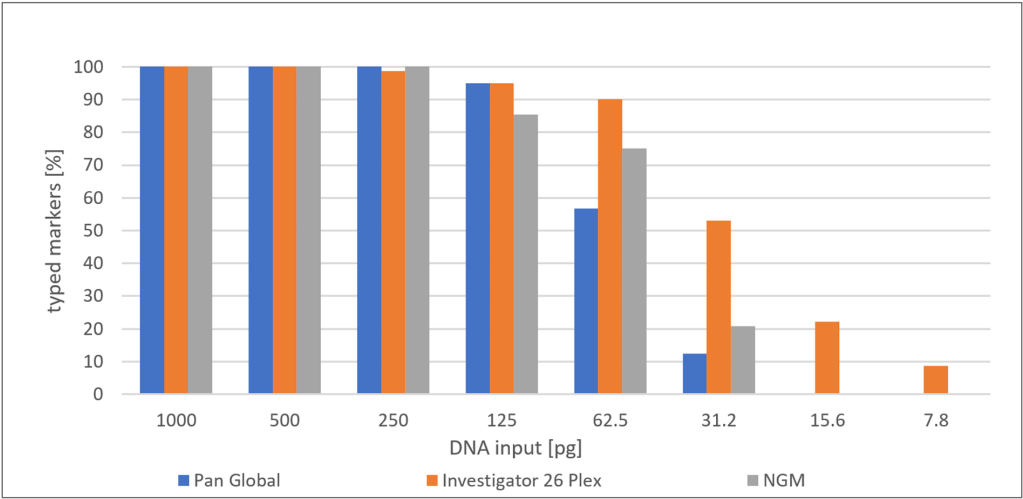


Figure 2. Comparison of sensitivity between Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM Kits.

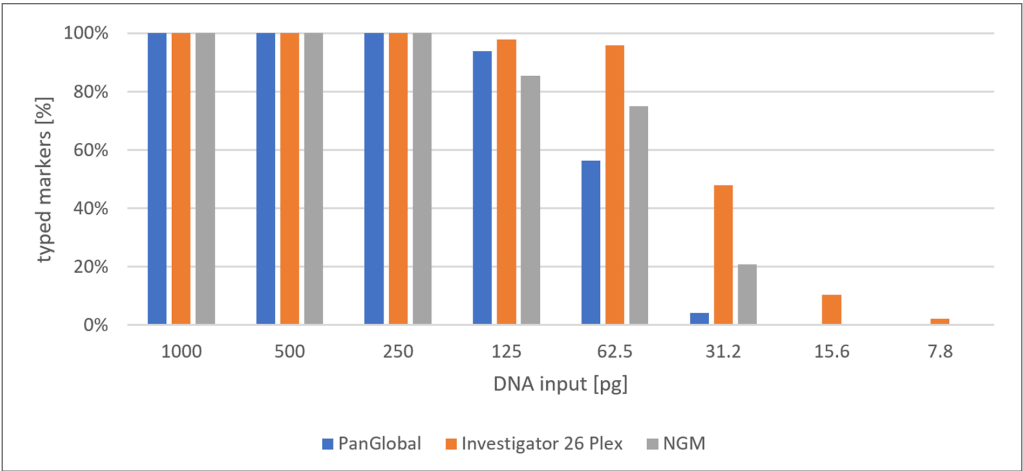


Figure 3. Comparison of sensitivity between Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM Kits, considering shared set of markers.

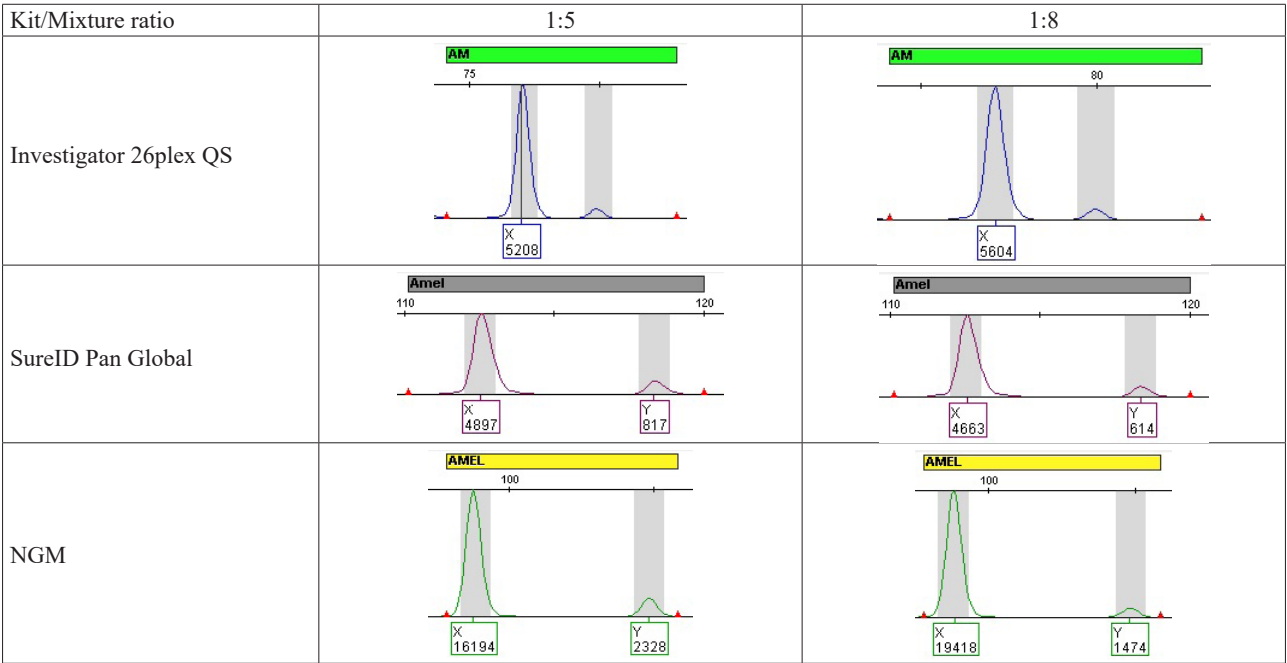


Figure 4. Comparison of efficiency of amplification of Y allele on amelogenin marker with major female mixtures between Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM Kits (amelogenin Y-allele dropout highlighted by the red square).

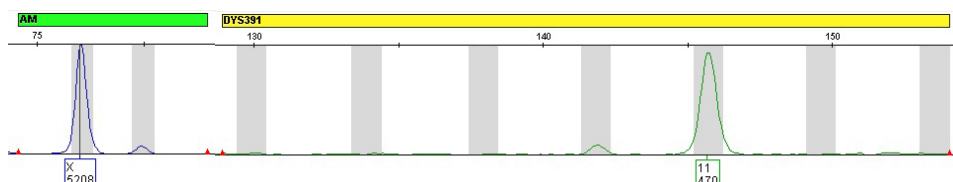


Figure 5. The electropherogram showing the loss of amplification of Y allele on amelogenin (highlighted by the red square) and positive amplification of DYS391 locus at the ratio 1 : 5 using Investigator 26plex QS.

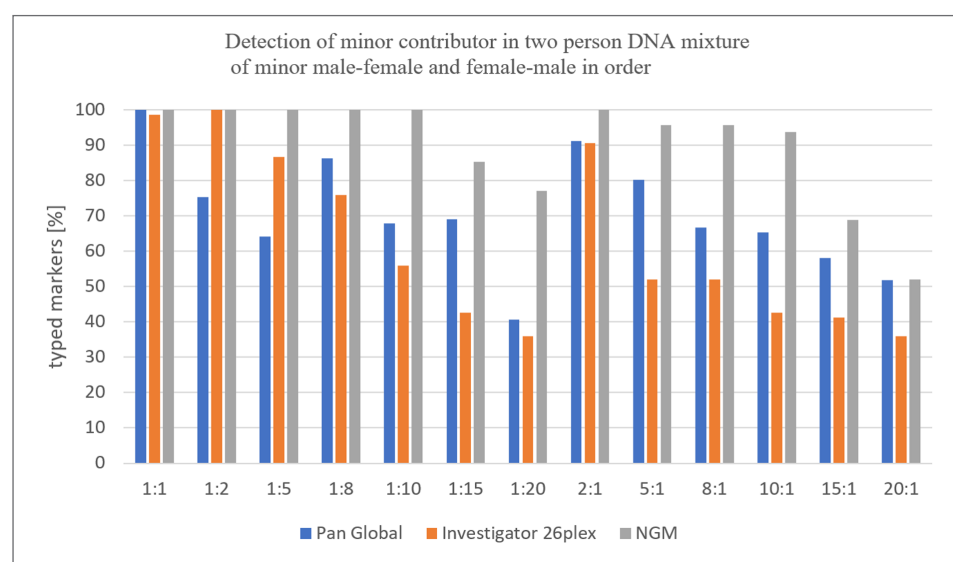


Figure 6. Comparison of mixture analysis between Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM Kits, considering total set of each marker.

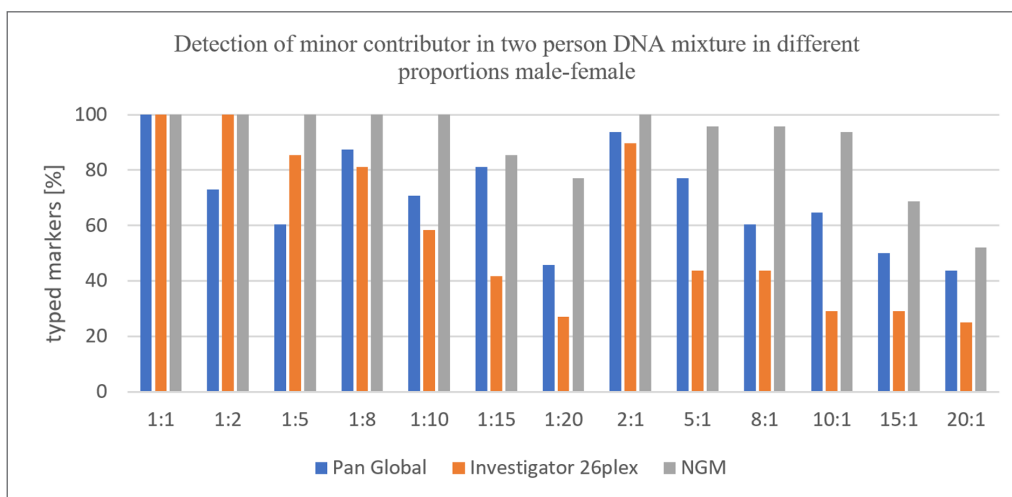


Figure 7. Comparison of mixture analysis between Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM Kits, considering shared set of markers.

Table 1

Comparison of the results of casework samples analysis between Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM

No.	Sample typology	% of positively typed markers					Degradation index	Concentration of DNA [ng/μl]	Source of a trace
		NGM	Shared set of the STR markers		Total set of the STR markers				
			Investigator 26Plex	SureID Pan Global	Investigator 26Plex	SureID Pan Global			
1.	Saliva	100	100.00	100.00	91.66	100.00	1.70	6.40	single
2.	Blood	100	87.50	100.00	76.00	96.30	1.60	13.50	single
3.	Touch DNA	100	93.75	93.75	83.33	84.00	2.80	0.04	single
4.	Old blood	81.25	62.50	75.00	54.16	72.00	7.80	0.06	single
5.	Blood	93.75	75.00	100.00	62.50	100.00	9.00	0.50	single
6.	Blood	100	100.00	100.00	100.00	100.00	1.40	0.08	single
7.	Cigarette butt	81.25	75.00	68.75	62.50	64.00	4.80	0.01	single
8.	Saliva	100	100.00	100.00	100.00	100.00	2.20	0.90	single
9.	Blood	100	93.75	50.00	84.00	48.14	1.20	0.01	single
10.	Soft tissue	100	93.75	100.00	84.00	100.00	1.40	0.22	single
11.	Semen	100	81.25	100.00	72.00	96.30	0.90	10.47	single
12.	Vaginal swab	100	75.00	100.00	68.00	88.88	1.50	51.20	mixture
13.	Tooth	100	100.00	100.00	96.00	100.00	N/A	11.00	single
14.	Leg bone	87.50	50.00	0.00	41.66	0.00	1.26	0.01	single
15.	Skull bone	100.00	50.00	37.50	41.66	20.00	3.87	0.05	single

Table 2

Comparison of the results of casework samples analysis between Investigator 26plex QS, SureID Pan Global and NGM taking into account the number of positively typed markers

No.	Sample typology	Number of positively typed markers					Degradation index	Concentration of DNA [ng/μl]	Source of a trace
		NGM	Shared set of the STR markers		Total set of the STR markers				
			Investigator 26Plex	SureID Pan Global	Investigator 26Plex	SureID Pan Global			
1.	Saliva	16	16	16	22	25	1.70	6.40	single
2.	Blood	16	14	16	19	26	1.60	13.50	single
3.	Touch DNA	16	15	15	20	21	2.80	0.04	single
4.	Old blood	13	10	12	13	18	7.80	0.06	single
5.	Blood	15	12	16	15	25	9.00	0.50	single
6.	Blood	16	16	16	25	27	1.40	0.08	single
7.	Cigarette butt	9	12	11	15	16	4.80	0.01	single
8.	Saliva	16	16	16	25	27	2.20	0.90	single
9.	Blood	16	15	8	21	13	1.20	0.01	single
10.	Soft tissue	16	15	16	21	27	1.40	0.22	single
11.	Semen	16	13	16	18	26	0.90	10.47	single
12.	Vaginal swab	16	12	16	17	24	1.50	51.20	mixture
13.	Tooth	16	16	16	24	25	N/A	11.00	single
14.	Leg bone	14	8	0	10	0	1.26	0.01	single
15.	Skull bone	16	8	6	10	5	3.87	0.05	single

4. Conclusions

The study compared the performance of Investigator 26plex QS Kit and SureID PanGlobal Human DNA Identification Kit by thorough examination of the minimum criteria recommended by SWGDAM and ENFSI DNA Working Group for forensic applications. It was demonstrated that among three compared systems – Investigator 26plex QS, SureID PanGlobal Human DNA Identification and NGM kits, the highest sensitivity is provided by the Investigator 26plex QS. The new kits performed robustness towards artificial inhibition on amplification efficiency. In the face of high sensitivity STR multiplex assays, more and more often mixture analysis become a great challenge in forensic casework analysis. Therefore detection of the minor DNA contributor in mixed samples is of great importance (Parys-Proszek, Wróbel, Marcińska, Kupiec, 2018). The experiments revealed that novel kits have significant limitation for mixture resolution compared to available NGM Kit. Comparison of case-type samples proved concordance and the reliability among positive detected *loci* of the systems. However, our data showed lower performance of novel kits with critical forensic material obtained from crime

scene in comparison to commonly used NGM. The configuration of the shared markers can vary between the systems as the primer sequences were designed to amplify different PCR products size. Our results confirmed that *locus* dropouts were observed within the longest amplicons. The data showed that the *loci* with negative results obtained using PanGlobal or Investigator 26plex QS (e.g. D2S1338, D1S1656, D8S1179, D19S433) are characterized by longer amplicons in comparison to NGM Kit. Consequently, multiple amplification of the same sample using complementary kits may be a good way to maximize genetic information recovery (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, 2016). According to the results of our internal validation studies based on the comparison of three tested kits, NGM demonstrated better performance for forensic application in which a high degree of degradation and/or low DNA concentration is observed. We conclude that Investigator 26plex QS and SureID Pan Global could find utility mainly as a supplementary kits for forensic genetics laboratories in dual amplification strategy of the same sample using a complementary kit. It could be possible that thanks to increased number of markers, these novel kits provide extremely high discriminatory power that could be

helpful to solve complex, inconclusive cases in paternity testing and kinship analysis (Vraneš et al., 2019; Zgonjanin, Perruccio Soler, Antov, Redhead, 2017).

Acknowledgments

The authors would like to gratefully acknowledge the members of Qiagen and Health Gene Technologies groups for the financial support of this research.

References

1. Alsafiah, H. M., Aljanabi, A. A., Hadi, S., Alturayef, S. S., Goodwin, W. (2019). An evaluation of the SureID 23comp Human Identification Kit for kinship testing. *Nature Scientific Reports*, 9(1), 16859.
2. Butler, J. M. (2015). *Advanced topics in forensic DNA typing: Interpretation*. Boston: Elsevier.
3. Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*, 51, 253–265.
4. Carboni, I., Iozzi, S., Nutini, A. L., Torricelli, F., Ricci, U. (2014). Improving complex kinship analyses with additional STR loci. *Electrophoresis*, 35, 3145–3151.
5. Council Resolution of November 2009 on the exchange of DNA analysis results (2009). *Official Journal of the European Communities C*, 296(44), 1–4.
6. ENFSI DNA Working Group. (2010). *Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process*.
7. Investigator®26plex QS Handbook. 04/2019.
8. Liu, Y., Guo, L., Jin, H., Li, Z., Bai, R., Shi, M., Ma, S. (2017). Developmental validation of a 6-dye typing system with 27 loci and application in Han population of China. *Nature Scientific Reports*, 7, 4706.
9. Parys-Proszek, A., Wróbel, M., Marcińska, M., Kupiec, T. (2018). Dual amplification strategy for improved efficiency of forensic DNA analysis using NGM Detect™, NGM™ or Globalfiler™ kits. *Forensic Science International: Genetics*, 35, 46–49.
10. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. (2016). *SWGDAM validation guidelines for DNA analysis methods*. SWGDAM.
11. User Guide SureID® Pan Global Human DNA Identification Kit. www.healthgenetech.com.
12. Vraneš, M., König, M., Cornelius, S., Kohns, A., Elliott, K., Prochnow, A., Scherer, M. (2019). Development of the Investigator®26plex QS kit: A new multiplex PCR kit for global STR analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7, 778–779.
13. Zgonjanin, D., Perruccio Soler, M., Antov, M., Redhead, P. (2017). Validation and implementation of the Investigator®24plex QS Kit for forensic casework. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, 77–79.

ORCID

Magdalena Marcińska  0000-0001-7616-7462
 Agnieszka Parys-Proszek  0000-0002-8321-6143
 Maria Wróbel  0000-0002-3168-5810

Corresponding author

Dr. Magdalena Marcińska
 Institute of Forensic Research
 ul. Westerplatte 9
 PL 31-033 Kraków
 e-mail: mmarcinska@ies.gov.pl

OCENA DZIAŁANIA ZESTAWÓW INVESTIGATOR 26PLEX QS KIT I SUREID PANGLOBAL HUMAN DNA IDENTIFICATION KIT W BADANIACH KRYMINALISTYCZNYCH I PORÓWNANIE ICH PARAMETRÓW ANALIZY Z POWSZECHNIE STOSOWANYM ZESTAWEM NGM PCR AMPLIFICATION KIT

1. Wprowadzenie

W genetyce sądowej powszechnym badaniem umożliwiającym identyfikację genetyczną jest analiza krótkich powtórzeń tandemowych (STR) w systemach multipleksowych, która zapewnia wysoki poziom siły dyskryminacji w badaniach identyfikacyjnych i ojcostwa (Butler, 2006). W konsekwencji globalny rynek badań kryminalistycznych dynamicznie się rozrasta, produkowanych jest wiele nowych zestawów multipleksowych o zwiększonej liczbie markerów STR charakteryzujących się wysoką czułością i stabilnością. Zgodnie z wytycznymi nowo wprowadzane zestawy muszą zawierać panel dwunastu wytypowanych markerów genetycznych określanych jako ESS – *European Set Standards* (FGA, TH01, VWA, D1S1656, D2S441, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D18S51, D21S11, D22S1045), które są rekomendowane przez międzynarodowe towarzystwa genetyczne ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*) i EDNAP (*European DNA Profiling Group*; Council Resolution, 2009). Jednymi z najnowszych systemów multipleksów wprowadzonych na rynek przez firmy Qiagen i Health Gene Technologies były odpowiednio Investigator 26plex QS Kit (Vrane i in., 2019) i SureID PanGlobal Human DNA Identification Kit (Liu i in., 2017). Zestaw Investigator 26plex QS umożliwia oznaczenie 23 autosomalnych markerów STR i dwóch markerów płci zaprojektowanych w sześciobarwnikowym systemie fluorescencyjnym. Zestaw ten posiada również system kontroli (*quality sensor*), który umożliwia ocenę jakości analizowanej próbki. Taka innowacja została już wdrożona w innym zestawie multipleksowym NGM Detect PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific; Zgonjanin, Perruccio Soler, Antov, Redhead, 2017). Zestaw SureID PanGlobal to system sześciobarwnikowy, który umożliwia analizę 24 autosomalnych markerów STR oraz trzech markerów płci. Wprowadzenie nowego zestawu multipleksowego do laboratorium wymaga przeprowadzenia wewnętrznych badań walidacyjnych celem oznaczenia jego parametrów analitycznych. Walidacja zestawów została wykonana zgodnie z wytycznymi określonymi przez SWGDAM (2016) i ENFSI (2010) z uwzględnieniem parametrów czułości, odtwarzalności, progów stochastycznych, analizy mieszanin DNA, inhibicji i próbek pozyskanych z praktyki laboratoryjnej. W niniejszych badaniach została porównana wydajność działania dwóch nowych zestawów

z powszechnie stosowanym w laboratoriach kryminalistycznych zestawem NGM (Thermo Fisher Scientific). Celem tego badania była ocena możliwości wdrożenia zestawów Investigator 26plex QS Kit i SureID PanGlobal Human DNA Identification Kit do rutynowej praktyki laboratoryjnej.

2. Materiały i metody

Analiza porównawcza zestawów Investigator 26plex QS, SureID PanGlobal oraz NGM została poprzedzona ustaleniem na etapie wewnętrznej walidacji w laboratorium progów parametrów analizy LOQ (*limit of quantification*), LOD (*limit of detection*) oraz ST (*stochastic threshold*) dla każdego z trzech zestawów.

Analiza czułości i wyznaczenie progów stochastycznych zostały przeprowadzone przy użyciu kontrolnego DNA 007 (Thermo Fisher Scientific) przygotowanego w trzech powtórzeniach w siedmiu seryjnych rozcieńczeniach o następujących stężeniach DNA: 500, 250, 125, 62, 31, 15 i 7 pg na reakcję. Analizę mieszanin przeprowadzono dla dwóch osób o znanych proporcjach DNA z wykorzystaniem dwóch kontrolnych fragmentów DNA: 9947 (Promega, żeński dawca) i 007 (Thermo Fisher Scientific, męski dawca) o całkowitym stężeniu DNA wynoszącym 1 ng. Próbkę mieszanin składającą się z komponenty żeńskiej i męskiej przygotowano w proporcjach: 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20. W jednej serii rozcieńczeń występował malejący udział komponenty męskiej, natomiast w serii drugiej – komponenty żeńskiej. W celu uzyskania wiarygodnych wyników badań wykonano dla każdej próbki mieszaniny trzy niezależne reakcje amplifikacji i elektroforezy. Wydajność działania zestawów została również sprawdzona na próbkach uzyskanych z praktyki kryminalistycznej związanych z przestępstwami na tle seksualnym, rozbojami, zabójstwami, wypadkami drogowymi i niewyjaśnionymi zgonami. Do badań zostało wyselekcjonowanych 15 próbek stanowiących różnego rodzaju materiał biologiczny: krew, ślina, nasienie, ząb, kości, tkanki miękkie i komórki nabłonkowe. Próbkę stanowiącą krew, ślinę, nasienie, tkanki miękkie i komórki nabłonkowe poddano izolacji metodą magnetyczną na aparacie BioRobot M48 za pomocą zestawu MagAttract (Qiagen), zaś próbki materiału kostnego i ząb poddano izolacji metodą organiczną z ekstrakcją mieszaniną fenol-chloroform-alkohol izoamylowy. Zgodnie

z wytycznymi producenta do reakcji PCR użyto DNA w stężeniach 0,5 ng/μl (zestaw Investigator 26plex QS) oraz 1 ng/μl (SureID PanGlobal i NGM), a w przypadku próbek o niewystarczającym stężeniu DNA do reakcji dodawano maksymalną możliwą ilość izolatu. W obrębie testowanych próbek były ślady zawierające zarówno optymalną ilość DNA, jak i próbki charakteryzujące się niewystarczającą ilością DNA/wysokim stopniem degradacji. Pomiar ilości DNA przeprowadzono przy użyciu 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) za pomocą Quantifiler Trio DNA Quantification Kit. Amplifikacja i rozdział elektroforetyczny DNA zostały wykonane zgodnie z zalecanymi protokołami producenta danego zestawu (Investigator® 26plex QS Handbook. 2019; User Guide SureID® Pan Global Human DNA Identification Kit) na tych samych aparatach w celu zapewnienia jednakowych warunków analizy. Reakcje amplifikacji zostały wykonane z użyciem termocyklera ABI GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific), a produkty PCR poddano elektroforezie kapilarnej z wykorzystaniem analizatora genetycznego ABI 3500xL (Thermo Fisher Scientific). Końcowa objętość reakcji dla obu porównywanych zestawów wynosiła 25 μl. Kontrolne DNA 2800M (Promega Corporation) poddano amplifikacji w obecności wzrastających stężeń (50, 100, 150, 200 i 250 ng/μl) powszechnie występującego inhibitora reakcji PCR – kwasu humusowego (Sigma-Aldrich, USA). Wyniki uzyskane dla nowych zestawów zostały porównane z zestawem NGM rutynowo stosowanym w praktyce laboratoryjnej.

3. Wyniki

Analiza czułości miała na celu oszacowanie możliwości otrzymywania wiarygodnych wyników w szerokim zakresie stężeń wzorcowego DNA. Analiza ta wykazała, że zarówno dla Investigator 26plex QS, jak i SureID PanGlobal Human DNA Identification pełne profile genetyczne uzyskano w zakresie do 125 pg DNA. Jednak w przypadku Investigator 26plex dla jednego powtórzenia już przy stężeniu DNA 250 pg doszło do wypadnięcia (tzw. *dropout*) jednego z dwóch alleli heterozygoty w *locus* D6S1043. Tendencja do utraty alleli w obrębie tego markera utrzymywała się przy niższych stężeniach DNA dla wszystkich powtórzeń. Uzyskane wyniki wykazały, że w porównaniu z innymi markerami *locus* D6S1043 w Investigator 26plex jest amplifikowany bardzo słabo nawet przy zachowaniu optymalnych warunków reakcji i dlatego jest on podatny w największym stopniu na zjawisko typu *dropout*. Elektroforegramy zestawu Investigator 26plex QS pokazujące wydajność amplifikacji markera D6S1043 zostały zamieszczone na rycinie 1. Dla zestawu Investigator 26plex odnotowano ponad 80% nieoznaczonych układów przy stężeniu 31,3 pg DNA, natomiast dla zestawu SureID PanGlobal

ilość nieoznaczonych układów przekroczyła 50% przy stężeniu 62,5 pg. Badania wykazały, że zestaw Investigator 26plex QS cechuje się najwyższym stopniem czułości – w przeciwieństwie do SureID PanGlobal, który daje najslabsze wyniki (Ryc. 2). Podobne rezultaty otrzymano dla zestawu markerów wspólnych dla trzech analizowanych zestawów (Ryc. 3). Badania dwuosobowej mieszaniny DNA wykazały pojedyncze dropouty alleli słabszej, męskiej komponenty na poziomie 1 : 5 dla zestawów Investigator 26plex i SureID PanGlobal. Znaczącą utratę słabszej komponenty męskiej odnotowano od poziomu 1 : 10 zarówno dla Investigator 26plex, jak i SureID PanGlobal oraz od poziomu 1 : 15 dla zestawu NGM. Należy zauważyć, że w przypadku SureID PanGlobal zaobserwowano bardzo niską wydajność amplifikacji dla jednej replikacji już od poziomu mieszaniny 1 : 2. W przypadku Investigator 26plex QS widoczna jest tendencja do wczesnej utraty allela Y amelogeniny w mieszaninie z dominującym składnikiem żeńskim. Z otrzymanych danych wynika, że w przypadku tego zestawu nie został oznaczony allel Y w *locus* amelogeniny dla jednego powtórzenia już przy proporcjach mieszanin 1 : 5 i 1 : 8 w przeciwieństwie do pozostałych dwóch zestawów (Ryc. 4). W przypadku *dropoutu* allelu Y amelogeniny nadal było możliwe poprawne oznaczenie płci słabszej komponenty ze względu na oznaczenie w profilu genetycznym markera DYS391 (Ryc. 5). Włączenie do systemu multipleksowego dodatkowego markera Y-STR (*locus* DYS391) może być pomocne w uniknięciu błędów w oznaczaniu płci i interpretacji mieszanin. Z kolei utratę słabszej komponenty żeńskiej zaobserwowano już od poziomu mieszanin 2 : 1 dla obu badanych zestawów. Analiza porównawcza mieszanin Investigator 26plex, SureID PanGlobal i NGM wykazała najlepszą detekcję słabszych komponent mieszanin dla zestawu NGM. Wydajność amplifikacji tego zestawu była znacząco lepsza niż pozostałych dwóch, gdy się weźmie pod uwagę zarówno całkowitą liczbę markerów w każdym zestawie (Ryc. 6), jak i wspólny dla nich wszystkich zestaw markerów (Ryc. 7). W celu sprawdzenia działania zestawów na próbkach kryminalistycznych do badań wytypowano grupę 15 próbek standardowo zabezpieczonych podczas oględzin dowodów rzeczowych. Pulę badawczą stanowiły próbki dobrej jakości oraz ekstrakty DNA charakteryzujące się wysokim stopniem degradacji i/lub niskim stężeniem DNA. Wydajność amplifikacji została przeanalizowana zarówno pod kątem liczby wszystkich markerów zawartych w danym zestawie, jak również z wzięciem pod uwagę tylko 16 markerów wspólnych dla dwóch nowych testowanych zestawów i rutynowo używanego zestawu NGM – tj. D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, gen amelogeniny, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w tabeli 1. Dla wszystkich analizowanych próbek

otrzymane profile genetyczne były zgodne pomiędzy trzema zestawami w obrębie pozytywnie oznaczonych układów genetycznych, jednak stopień kompletności profili był inny. W przypadku SureID Pan Global pełne profile genetyczne uzyskano dla wszystkich siedmiu próbek dobrej jakości dla wspólnego zestawu markerów. W przypadku analizy całkowitej liczby markerów zawartych w zestawie SureID Pan Global odnotowano jednak pojedyncze przypadki dropoutów. Z kolei dla Investigator 26plex QS otrzymano pełne lub częściowe profile, biorąc pod uwagę wspólne *loci*, a odsetek wypadniętych alleli zwiększył się przy analizie wszystkich markerów charakterystycznych dla tego zestawu. W przeciwieństwie do rutynowo stosowanego w laboratoriach NGM dla prawie wszystkich próbek o nieznacznej ilości DNA i wysokim stopniu degradacji amplifikowanych za pomocą SureID Pan Global i Investigator 26plex QS zaobserwowano znaczny spadek liczby pozytywnie oznaczonych układów genetycznych. Liczba pozytywnie oznaczonych układów genetycznych występujących zarówno w obrębie wspólnych markerów, jaki i kompletu markerów występujących w testowanych zestawach dla badanych próbek typu *casework* została przedstawiona w tabeli 2. Pomimo znacznej przewagi ilościowej markerów genetycznych zawartych w nowych zestawach dla większości próbek o suboptymalnej ilości/jakości DNA odnotowano dla SureID PanGlobal lub/i Investigator 26plex taką samą lub mniejszą liczbę pozytywnie oznaczonych układów genetycznych w porównaniu do zestawu NGM. Testowane zestawy nie pozwoliły na oznaczenie pełnego profilu genetycznego słabszej komponenty w śladzie stanowiącym mieszaninę materiału genetycznego. Analiza inhibicji z pięcioma różnymi stężeniami inhibitora reakcji PCR – kwasu humusowego – wykazała, że pełne profile genetyczne otrzymano dla zestawu SureID Pan Global w obecności kwasu humusowego o stężeniach 50–200 ng/μl, podczas gdy zestaw NGM wykazał odporność na 250 ng/μl stężenie inhibitora. Z kolei pojedyncze dropouty alleli zaobserwowano dla zestawu Investigator 26plex QS od stężenia 150 ng/μl kwasu humusowego.

4. Wnioski

W przeprowadzonym badaniu porównano wyniki parametrów analizy zestawów Investigator 26plex QS, SureID PanGlobal Human DNA Identification i NGM w zakresie minimalnych kryteriów dotyczących walidacji, zalecanych przez międzynarodowe towarzystwa genetyczne SWGDAM i ENFSI DNA Working Group dla laboratoriów genetycznych. W obrębie porównywanych systemów najwyższy poziom czułości wykazano dla Investigator 26plex QS. Z przeprowadzonych badań wynika, że nowe zestawy cechują się odpornością na inhibicję. Wysoka czułość zestawów multipleksowych STR sprawia, że coraz częściej w zabezpieczanych śladach

biologicznych ujawnia się, oprócz komponenty głównej, nieznaczne domieszki materiału genetycznego pochodzące od kolejnej osoby. Istotne zatem jest, aby wprowadzane do identyfikacji genetycznej nowe zestawy pozwalały wykrywać słabsze składniki mieszanin na takim poziomie, aby wyniki nadawały się do interpretacji (Butler, 2015). Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że testowane zestawy mają znaczne ograniczenia w detekcji słabszego składnika mieszaniny w porównaniu z zestawem NGM. Porównanie wyników analizy próbek zabezpieczanych w laboratorium podczas wykonywanych badań identyfikacyjnych (próbki typu *casework*) wykazało zgodność i wiarygodność otrzymanych wyników w obrębie pozytywnie oznaczonych układów genetycznych wszystkich zestawów. Jednakże uzyskane dane wskazują na niższą wydajność amplifikacji nowych zestawów w kontekście próbek stanowiących trudny materiał genetyczny o niewystarczającej ilości/jakości DNA w porównaniu do powszechnie stosowanego zestawu NGM. Lokalizacja wspólnych markerów może się różnić w zależności od danego systemu, ponieważ sekwencje primerów zostały zaprojektowane do amplifikacji różnych rozmiarów produktów PCR. Uzyskane wyniki potwierdziły, że zjawisko *dropout* występuje zwykle w obrębie najdłuższych amplikonów. W obrębie zestawów PanGlobal lub Investigator 26plex QS markery, w których obserwowano najczęstszą utratę alleli to D2S1338, D1S1656, D8S1179, D19S433. W testowanych zestawach posiadają one dłuższe amplikony w porównaniu do zestawu NGM. Kilukrotna amplifikacja tego samego izolatu DNA za pomocą komplementarnych zestawów może przyczynić się do zwiększenia ilości pozytywnie oznaczonych układów genetycznych podczas reakcji PCR (Parys-Proszek, Wróbel, Marcińska, Kupiec, 2018). Zgodnie z wynikami przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy badań walidacyjnych opartych na porównaniu trzech zestawów multipleksowych NGM cechuje się lepszymi parametrami analizy w badaniach genetycznych śladów, w których obserwuje się wysoki stopień degradacji lub/i niskie stężenie DNA. Natomiast zestawy Investigator 26plex QS i SureID Pan Global mogą znaleźć zastosowanie głównie jako zestawy uzupełniające w strategii podwójnej reakcji amplifikacji tej samej próbki przy użyciu komplementarnego zestawu STR. Dzięki zwiększonej liczbie markerów genetycznych te nowe zestawy multipleksowe zapewniają niezwykle wysoką siłę dyskryminacji, co może okazać się pomocne w wyjaśnianiu złożonych, niejednoznacznych przypadków w analizach ojcostwa i pokrewieństwa (Alsafia, Aljanabi, Hadi, Alturayef, Goodwin, 2019; Carboni, Iozzi, Nutini, Torricelli, Ricci, 2014).

Podziękowania

Autorzy składają podziękowania członkom grup Qiagen i Health Gene Technologies za wsparcie finansowe tych badań.