



Opis przypadku
Case report

Grażyna Kostrzewa¹, Magdalena Konarzewska¹, Witold Pepiński²

Zastosowanie techniki *massively parallel sequencing* (MPS) w analizie ojcostwa – opis przypadku Application of *massively parallel sequencing* (MPS) in paternity testing – case report

¹Zakład Medycyny Sądowej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska
²Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska
¹Department of Forensic Medicine, Medical University of Warsaw, Poland
²Department of Forensic Medicine, Medical University of Białystok, Poland

Streszczenie

Cel pracy: W pracy opisano przykład zastosowania techniki MPS (*massively parallel sequencing*) w celu poszerzenia zakresu analizy spornego ojcostwa.

Materiał i metody: Przy użyciu analizatora genetycznego 3130xl wykonano standardowy test ojcostwa obejmujący 16 markerów autosomalnych. Dodatkowo przeprowadzono badanie zestawem ForenSeq DNA Signature Prep Kit przy użyciu analizatora Illumina MiSeq FGx™ Forensic Genomics System. Obliczenia indeksu ojcostwa (PI) wykonano, stosując program DNASTat v.2.1.

Wyniki: W badaniu 16 markerów autosomalnych ujawniono obecność dwóch niezgodności (D21S11, VWA) dla pary pozwany – dziecko. Na podstawie wyników MPS przeanalizowano wymienione niezgodności, dla pary matka – dziecko ujawniono sekwencję *nonconsensus* allelela 14 *locus* VWA, u dziecka w *locus* D3S1358 stwierdzono różnice sekwencji alleli homozygoty 16-16.

Wnioski: Analiza MPS pozwoliła na sformułowanie rozstrzygającego wniosku odnośnie do ojcostwa pozwanego oraz uzyskanie pełnej informacji o polimorfizmie wewnątrzallelicznym.

Słowa kluczowe: DNA, analiza ojcostwa, MiSeq FGx™, polimorfizm wewnątrzalleliczny.

Abstract

Aim of the study: We present the application of *massively parallel sequencing* (MPS) to extend the scope of analysis in a disputed paternity case.

Material and methods: A standard paternity test comprising 16 autosomal STRs was performed by capillary electrophoresis (CE) using 3130xl Genetic Analyzer. Additionally, MPS was performed with ForenSeq DNA Signature Prep Kit and Illumina MiSeq FGx™ Forensic Genomics System. Paternity index (PI) was calculated using DNASTat v.2.1 software.

Results: CE revealed two mismatches, at D21S11 and VWA, between the putative father and the child. Based on MPS results, the mismatches were analyzed and a *nonconsensus* sequence of allele 14 at the VWA *locus* in the mother – child pair was identified. Different sequence variants were also detected in 16-16 homozygote alleles at the D3S1358 *locus* in the child.

Conclusions: MPS helped to formulate a definite conclusion regarding the paternity of the defendant and provided full information on intra-allelic polymorphism.

Key words: DNA, paternity testing, MiSeq FGx™, intra-allelic polymorphism.

Wprowadzenie

Niektóre z *loci* mini- i mikrosatelitarnych wykazują zmienność w obrębie regionu powtarzalnego, mając allele o tej samej długości, lecz różnych sekwencjach (tzw. izoallele) [1]. Mikrosatelity o kompleksowej lub złożonej budowie, np. VWA, FGA, D21S11, D2S1338 i D3S1358, składają się z przerywanych sekwencji powtórzonych i mają większą liczbę alleli w porównaniu z *loci* o budowie prostej. VWA (12p13.31) jest złożonym markerem STR, którego sekwencja powtarzalna jest połączeniem pierwotnie trzech prostych powtórzeń. Ma on też zwielokrotnione sekwencje pseudo-powtarzalne w obu regionach flankujących, które nie wykazują polimorfizmu długości. Poznany zakres długości alleli to 10–25 powtórzeń. Wskaźnik mutacji wynosi 0,17% (cstl.nist.gov/div831/strbase/str_VWA.htm). D21S11 (21q21.1) jest kompleksowym markerem STR składającym się z 6 podjednostek powtarzalnych i krótkich sekwencji łączących. Trzy regiony wykazują polimorfizm długości. Poznany zakres długości alleli liczy 12–41.2 powtórzeń. Opisano warianty o jednakowej długości, lecz różnych sekwencjach podjednostek powtarzalnych [2]. Wskaźnik mutacji wynosi 0,19% (cstl.nist.gov/strbase/str_D21S11.htm). D3S1358 (3p21.31) tworzą dwie różne jednostki powtarzalne [AGAT] i [AGAC]. Poznany zakres długości alleli to 8–20 powtórzeń. Wskaźnik mutacji wynosi 0,12% (cstl.nist.gov/strbase/str_D3S1358.htm). Ogólnie przyjmuje się, że mutacje w obrębie *loci* STR są skutkiem „poślizgu” polimerazy powodującego insercje lub delecje jednostek powtarzalnych [3]. Inne możliwe mechanizmy obejmują zaburzenia *crossing-over* i konwersję genów [4, 5]. Zmienne liczby jednostek powtarzalnych mogą pojawiać się jednocześnie w kilku podjednostkach złożonego *locus*. Wykazano, że: częstość występowania mutacji w danym *locus* jest związana ze składem nukleotydów oraz długością allele [6, 7]; mutacje pochodzenia ojcowskiego są częstsze niż pochodzenia matczynego [4, 8, 9]; mutacje jednostopniowe (delecje lub insercje pojedynczych bloków repetytywnych) są częstsze niż mutacje wielostopniowe [6, 7]. Obecnie analizy genetyczno-sądowe są rutynowo prowadzone na podstawie oznaczenia polimorfizmu długości kilkunastu do kilkudziesięciu *loci* STR. Komisja ds. Badania Ojcostwa (PTC) przy Międzynarodowym Towarzystwie Genetyki Sądowej (ISFG) ustaliła zestaw rekomendacji, na bazie standardów zgodności z normą ISO 17025, dla laboratoriów zajmujących

Introduction

Some of the mini- and microsatellite *loci* exhibit variation within the repeat region, having alleles of the same length but different sequences (the so-called isoalleles) [1]. Microsatellites with a complex structure, such as VWA, FGA, D21S11, D2S1338 and D3S1358, consist of interrupted repeat sequences and have a higher number of alleles than the *loci* having a simple structure. VWA (12p13.31) is a complex STR marker in which the repeat sequence is a combination of originally three simple repeats. It also has multiple pseudo-repeat sequences in both flanking regions, which do not demonstrate length polymorphism. The known range of allele lengths is between 10 and 25 repeats. The mutation rate is 0.17% (cstl.nist.gov/div831/strbase/str_VWA.htm). D21S11 (21q21.1) is a complex STR marker consisting of six repeat subunits and short linking sequences. Three regions exhibit length polymorphism. The known range of allele lengths is between 12 and 41.2 repeats. Variants of equal length but different sequences of repeat subunits have been described [2]. The mutation rate is 0.19% (cstl.nist.gov/strbase/str_D21S11.htm). D3S1358 (3p21.31) is made up of two different repeat units: [AGAT] and [AGAC]. The known range of allele lengths is between 8 and 20 repeats. The mutation rate is 0.12% (cstl.nist.gov/strbase/str_D3S1358.htm). It is generally recognized that mutations within STR *loci* are a result of polymerase slippage leading to insertions or deletions of repeat units [3]. Other possible mechanisms include *crossing-over* abnormalities and gene conversions [4, 5]. Variable numbers of repeat units may occur simultaneously in several subunits of a complex *locus*. Moreover, it has been shown that the frequency of mutations in a given *locus* correlates with nucleotide composition and allele length [6, 7]; mutations of paternal origin are more frequent than maternal mutations [4, 8, 9]; single-stage mutations (deletions or insertions of individual repetitive blocks) are more common than multi-stage mutations [6, 7]. At present, forensic genetic analyses are routinely performed by assessing polymorphism with the length ranging from about a dozen to several dozen STR *loci*. The Paternity Testing Commission (PTC) at the International Society for Forensic Genetics (ISFG) has established a set of recommenda-

się analizą ojcostwa [10]. Komisja ds. Badania Ojcostwa zaleca stosowanie obliczeń prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności, wyrażonego parametrem indeksu ojcostwa (*paternity index* – PI). Ze względu na brak sprzężeń między analizowanymi markerami genetycznymi, łączna wartość indeksu ojcostwa (*combined paternity index* – CPI) wynika z reguły iloczynu wartości PI obliczonych dla poszczególnych *loci*. Poprzednio wykazano, że relatywnie wysokie częstości mutacji powinny być uwzględniane w obliczeniach wartości dowodowej wyników identyfikacji genetycznej oraz analiz pokrewieństwa [11–13].

Według zaleceń Komisji Genetyki Sądowej przy Polskim Towarzystwie Medycyny Sądowej i Kryminologii wartość CPI wymagana dla potwierdzenia ojcostwa musi wynosić co najmniej 1 000 000, a wykluczenie ojcostwa musi być wykazane co najmniej w 4 *loci* (ptmsik.pl/komisja-genetyki-sadowej/zasady-atestacji-na-rok-2016.html). Jeśli podstawowy zestaw markerów nie pozwala na potwierdzenie lub wykluczenie ojcostwa, zakres badań musi być poszerzony o dodatkowe markery [14].

Technika MPS (*massively parallel sequencing*) umożliwia oznaczanie genotypów na podstawie jednoczesnej analizy polimorfizmu długości i polimorfizmu sekwencji [1], co ujawnia pełne zróżnicowanie markerów typu SNP i InDel w obrębie *loci* STR, pozwalając na identyfikację nowych alleli lub mutacji [15]. W ten sposób MPS umożliwia uzyskiwanie informacji z różnych rodzajów polimorfizmów, przy jednoczesnym zachowaniu zgodności nazewnictwa z istniejącymi bazami danych markerów genetycznych. W badaniach o ustalenie ojcostwa okazjonalnie ujawniane są przypadki niezgodności wynikające z mutacji w markerach STR, które mogą sugerować wykluczenie ojcostwa. Wskutek występowania jednostopniowych mutacji lub alleli null możliwe jest występowanie jednej lub dwóch niezgodności w przypadkach ustalonego pokrewieństwa. Z drugiej strony na tej podstawie możliwa jest także alternatywna hipoteza, że biologicznym ojcem dziecka nie jest pozwany, lecz mężczyzna blisko z nim spokrewniony [16].

Cel pracy

W niniejszej pracy opisano przykład zastosowania techniki MPS w celu wyjaśnienia przyczyny braku segregacji alleli w sprawie spornego ojcostwa z dwiema

tions, in compliance with the ISO 17025 standard, for laboratories dealing with paternity testing [10]. The Paternity Testing Commission recommends calculating the probability of random match which is expressed as the paternity index (PI). On account of the absence of linkages between the genetic markers under analysis, the combined paternity index (CPI) is obtained using the rule of product of PI values calculated for the individual *loci*. It has previously been demonstrated that relatively high mutation frequencies should be taken into account when determining the evidential value of genetic identification and kinship analysis results [11–13].

According to the recommendations issued by the Forensic Genetics Committee at the Polish Society of Forensic Medicine and Criminology, the minimum CPI value required for the confirmation of paternity is 1000000, and the exclusion of paternity must be demonstrated in at least four *loci* (ptmsik.pl/komisja-genetyki-sadowej/zasady-atestacji-na-rok-2016.html). If the basic set of markers fails to either confirm or exclude paternity, the scope of testing must be extended to include additional markers [14].

Massively parallel sequencing (MPS) is a genotyping technique based on simultaneous analysis of length and sequence polymorphisms [1], which demonstrates a full range of variation in SNP and InDel markers within STR *loci*, allowing the identification of new alleles or mutations [15]. Consequently, MPS makes it possible to obtain information from various types of polymorphisms, while maintaining compliance in nomenclature with existing genetic marker databases. Paternity tests occasionally reveal cases of mismatch arising from mutations in STR markers which may suggest the exclusion of paternity. The presence of single-stage mutations or null alleles may result in one or two mismatches in cases of established kinship. On the other hand, an alternative hypothesis is also possible, according to which the child's biological father is not the defendant but another man closely related to him [16].

Aim of study

The study describes the application of MPS to identify the cause of the lack of allelic segregation in a case of disputed paternity with two mismatches

niezgodnościami ujawnionymi przez analizę fragmentów *loci* autosomalnych dla pary dziecko – pozwany.

revealed by analyzing fragments of autosomal *loci* for the child – putative father pair.

Materiał i metody

Wykonano analizę ojcostwa dla trójki pozwany – dziecko (XY) – matka. Ekstrakcję DNA wykonano z wymazów nabłonka jamy ustnej, stosując zestaw DNA IQ™ Casework Sample Kit i aparat Maxwell® 16 (Promega). Kwantyfikację DNA wykonano z użyciem fluorometru Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). DNA amplifikowano z użyciem zestawów AmpFISTR® NGMSelect™ (Applied Biosystems) oraz PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega) w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Genotypowanie fragmentów PCR przeprowadzono przy użyciu analizatora 3130xl (Applied Biosystems). W celu weryfikacji wyników i poszerzenia zakresu badań przeprowadzono analizę zestawem ForenSeq DNA Signature Prep Kit przy użyciu analizatora Illumina MiSeq FGx™ Forensic Genomics System według instrukcji producenta (Illumina). Zestaw umożliwia jednoczesne sekwencjonowanie 57 STR-ów (27 autosomalnych, 7 chromosomu X, 24 chromosomu Y) oraz 172 SNP (94 identyfikacji osobniczej, 56 pochodzenia biogeograficznego, 22 pigmentacji włosów i tęczówki oka). Obliczenia statystyczne wykonano, stosując program DNASTat v.2.1 (Laser). Wyniki genotypowania markerów SNP i Y-STR nie były brane pod uwagę w obliczeniach statystycznych.

Material and methods

Paternity analysis was performed for the trio putative father – child (XY) – mother. DNA was extracted from buccal swabs using DNA IQ™ Casework Sample Kit and Maxwell® 16 instrument (Promega). DNA quantification was performed with Qubit 3.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). DNA was amplified by means of AmpFISTR® NGMSelect™ (Applied Biosystems) and PowerPlex® ESI 17 Pro System (Promega) kits in GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). The genotyping of PCR fragments was performed with 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). In order to verify the results and extend the scope of testing, an additional analysis was conducted with ForenSeq DNA Signature Prep Kit using Illumina MiSeq FGx™ Forensic Genomics System in accordance with the manufacturer's instructions (Illumina). The system provides a possibility to simultaneously sequence 57 STRs (27 autosomal, 7 X-STRs, 24 Y-STRs) and 172 SNPs (94 identity SNPs, 56 biogeographical ancestry SNPs and 22 phenotypic-informative SNPs for hair and eye colour). Statistical calculations were carried out using DNASTat v.2.1 (Laser). The results of SNP and Y-STR marker genotyping were not included in statistical calculations.

Wyniki i omówienie

W badaniu 16 markerów autosomalnych metodą elektroforezy kapilarnej ujawniono obecność dwóch

Results and discussion

An analysis of 16 autosomal markers by capillary electrophoresis revealed two mismatches at D21S11

Tabela I. Wyniki genotypowania metodą elektroforezy kapilarnej

Table I. Capillary electrophoresis genotyping results

	D10S1248	VWA	D16S539	D2S1338	AMY	D8S1179	D21S11	D18S51	D22S1045	D19S433	TH01	FGA	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
Domniemany ojciec Putative father	15, 16	17,20	11,12	20,25	X,Y	10,13	28,30	16,19	15, 15	15.2,16.2	6,9.3	19,21	12, 14	15,16	12, 16	18, 21	20,22.2
Dziecko Child	15, 15	14,19	11,12	20,20	X,Y	10,14	29,31	18,19	15, 16	15,15.2	9,9.3	19,21	14, 14	16,16	15.3, 16	17, 21	15,22.2
Matka Mother	15, 17	14,17	11,12	20,25	XX	13,14	29,30.2	16,18	16, 16	12,15	9,9	21,23	11, 14	16,18	12, 15.3	17, 18	15,20

Tabela II. Wyniki genotypowania techniką MPS (*loci* dodatkowe)**Table II.** MSP genotyping results (supplementary *loci*)

	TPOX	D4S2408	D5S818	CSF1PO	D6S1043	D7S820	D9S1122	D13S317	Penta E	D17S1301	D20S482	Penta D
Domniemany ojciec Putative father	8,8	9,11	12,12	10,12	11,11	10,13	11,13	9,11	10,11	11,12	13,13	10,12
Dziecko Child	8,8	9,11	12,12	12,12	11,14	10,10	11,13	9,11	10,12	11,12	13,13	9,10
Matka Mother	8,8	8,11	11,12	12,13	12,14	9,10	12,13	11,12	12,17	11,12	13,14	9,13

niezgodności w D21S11 i VWA dla pary pozwany – dziecko (tab. I) wynikających z jednostopniowych mutacji. Wyniki genotypowania AmpFlSTR® NGM-Select™ i PowerPlex® ESI 17 Pro System były ze sobą zgodne. Na podstawie łącznej wartości indeksu ojcostwa (CPI = 2541) uznano ojcostwo pozwanego za nierozstrzygnięte. Poszerzając zakres badania o analizę MPS, potwierdzono obecność ww. niezgodności polegających na insercji i delecji pojedynczych bloków repetytywnych (ryc. 1A, B) oraz dla pary matka – dziecko ujawniono sekwencję *nonconsensus* allele 14 *locus* VWA (ryc. 1B). Dodatkowo u dziecka w *locus* D3S1358 ujawniono różnice sekwencji alleli homozygoty długości 16-16 (ryc. 1C), co umożliwiło rozróżnienie ich matczynego i ojcowskiego pochodzenia. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia opisujące możliwości techniki MPS w określaniu matczynego lub ojcowskiego pochodzenia izoalleli w testach pokrewieństwa [17] oraz różnicowaniu bliźniąt homozygotycznych bądź pochodzącego od nich materiału dowodowego [18]. Zróżnicowanie sekwencji może mieć znaczenie w kontekście możliwości przeszacowania wartości PI, gdyż częstości występowania mutacji publikowane na podstawie analizy polimorfizmu długości *loci* autosomalnych są prawdopodobnie znacznie zaniżone [19]. Inni autorzy zauważyli, że *loci* D12S391, D2S1338, D21S11, D8S1179, VWA i D3S1358 faktycznie wykazują ok. 2 razy większą liczbę alleli różniących się sekwencją, niż alleli różniących się długością [20]. W analizowanym przypadku innych niezgodności nie stwierdzono. Indeks CPI obliczony wyłącznie na podstawie rozkładów częstości występowania alleli wszystkich oznaczonych STR autosomalnych (tab. I i II) wyniósł 276837924.

and VWA for the putative father-child pair (Table I), resulting from single-stage mutations. Genotyping results obtained by AmpFlSTR® NGMSelect™ and PowerPlex® ESI 17 Pro System were consistent. Based on the value of the combined paternity index (CPI = 2541) the paternity of the putative father was regarded as inconclusive. Extension of the scope of testing by MPS analysis confirmed the presence of the above mentioned mismatches (insertion and deletion of individual repetitive blocks, Fig. 1A, B), and identified a nonconsensus sequence in allele 14 at the VWA *locus* for the mother-child pair (Fig. 1B). In addition, the D3S1358 *locus* in the child revealed differences in homozygous allele sequences with the length of 16-16 (Fig. 1C), which enabled the differentiation of their maternal and paternal origin. The results are in agreement with earlier reports describing the capacity of the MPS technique for determining the maternal or paternal origin of isoalleles in paternity tests [17] and differentiating homozygous twins or evidence material collected from them [18]. Sequence variation may be of importance in the context of possible overestimation of the PI value, since the frequencies of mutations published on the basis of analysis of length polymorphism in autosomal *loci* are probably considerably undervalued [19]. Other authors have noted that the D12S391, D2S1338, D21S11, D8S1179, VWA and D3S1358 *loci* actually contain about twice as many alleles differing in sequence than alleles differing in length [20]. No other mismatches were found in the case analyzed. The CPI calculated exclusively on the basis of frequency distributions of alleles in all analyzed autosomal STRs (Tables I and II) was 276837924.

A

D3S1358

matka / mother
16 TCTA [TCTG]2 [TCTA]13
18 TCTA [TCTG]3 [TCTA]14
dziecko / child
16 TCTA [TCTG]3 [TCTA]12 – *od ojca/paternal*
16 TCTA [TCTG]2 [TCTA]13 – *od matki/maternal*
domniemany ojciec / putative father
15 TCTA [TCTG]2 [TCTA]12
16 TCTA [TCTG]3 [TCTA]12

B

D21S11

matka / mother
29 [TCTA]4 [TCTG]6 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]11
30.2 [TCTA]5 [TCTG]5 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]11 TA TCTA
dziecko / child
29 [TCTA]4 [TCTG]6 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]11
31 [TCTA]6 [TCTG]5 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]12 – *inercja/insertion*
domniemany ojciec / putative father
28 [TCTA]4 [TCTG]6 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]10
30 [TCTA]6 [TCTG]5 [TCTA]3 TA [TCTA]3 TCA [TCTA]2 TCCATA [TCTA]11

C

VWA

matka / mother
14 TCTA TCTG TCTA [TCTG]4 [TCTA]3 TCCA [TCTA]3 TCCA TCCA
17 TCTA [TCTG]4 [TCTA]12 TCCA TCTA
dziecko / child
14 TCTA TCTG TCTA [TCTG]4 [TCTA]3 TCCA [TCTA]3 TCCA TCCA
19 TCTA [TCTG]4 [TCTA]14 TCCA TCTA – *delecja/deletion*
domniemany ojciec / putative father
17 TCTA [TCTG]4 [TCTA]12 TCCA TCTA
20 TCTA [TCTG]4 [TCTA]15 TCCA TCTA

Ryc. 1. Wyniki analizy techniką MPS
Fig. 1. Results of MSP analysis

Wnioski

1. Analiza MPS pozwoliła na sformułowanie rozstrzygającego wniosku odnośnie do ojcostwa pozwanego oraz określenie typu mutacji.
2. Analiza MPS umożliwia rozróżnianie rodzicielskiego pochodzenia alleli w przypadku homozygot u dziecka.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Conclusions

1. MPS-based analysis helped to formulate a definite conclusion regarding the paternity of the defendant and determine the type of mutation.
2. MPS offers a possibility to identify the parental origin of alleles in cases of homozygotes in the child.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

1. Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM, Butler JM. STR allele sequence variation: current knowledge and future issues. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18: 118-130.
2. Möller A, Meyer E, Brinkmann B. Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int J Legal Med* 1994; 106: 319-323.
3. Levinson G, Gutman GA. Slipped strand mispriming: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 203-221.
4. Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet* 2000; 16: 551-558.
5. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 435-445.
6. Brinkmann B, Klitsch M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1408-1415.
7. Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet* 2000; 24: 400-402.
8. Muller M, Sibbing U, Hohoff C, Brinkmann B. Haplotype-assisted characterization of germline mutations at short tandem repeat loci. *Int J Legal Med* 2010; 124: 177-182.
9. Xu X, Peng M, Fang Z. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet* 2000; 24: 396-399.
10. Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, Carracedo A, Guidet F, Luque JA, Lessig R, Mayr WR, Pascali VL, Prinz M, Schneider PM, Morling N. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1: 223-231.
11. Kayser M, Sajantila A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci Int* 2001; 118: 116-121.
12. Sun M, Zhang X, Wu D, Shen Q, Wu Y, Fu S. Mutations of short tandem repeat loci in cases of paternity testing in Chinese. *Int J Leg Med* 2016; 130: 1203-1204.
13. Drabek J. Validation of software for calculating the likelihood ratio for parentage and kinship. *Forensic Sci Int* 2009; 3: 112-118.
14. Gomes C, Magalhaes M, Alves C, Amorim A, Pinto N, Gusmao L. Comparative evaluation of alternative battery of genetic markers to complement autosomal STRs in kinship investigations: autosomal indels vs. X-chromosome STRs. *Int J Legal Med* 2012; 126: 917-921.
15. Borsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Sci Int* 2015; 18: 78-89.
16. Tillmar AO, Mostad P. Choosing supplementary markers in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 128-133.
17. Rockenbauer E, Hansen S, Mikkelsen M, Borsting C, Morling N. Characterization of mutations and sequence variants in the D21S11 locus by next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 8: 68-72.
18. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B. Finding the needle in the haystack: Differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 9: 42-46.
19. Brenner CH. Multiple mutations, covert mutations and false exclusions in paternity casework. *Int Congress Series* 2004; 1261: 112-114.
20. Gettings BK, Kiesler KM, Faith SA, Montano E, Baker CH, Young BA, Guerrieri RA, Vallone PM. Sequence variation of 22 autosomal STR loci detected by next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 21: 15-21.

Adres do korespondencji

Grażyna Kostrzewa
Zakład Medycyny Sądowej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Wojciecha Oczki 1
02-007 Warszawa, Polska
e-mail: g.kostrzewa@wp.pl

Address for correspondence

Grażyna Kostrzewa
Department of Forensic Medicine
Medical University of Warsaw
Wojciecha Oczki 1
02-007 Warsaw, Poland
e-mail: g.kostrzewa@wp.pl