

# Determination of paternity on the basis of half-sibling testing

## Ustalenie ojcostwa na podstawie badań przyrodniego rodzeństwa

Katarzyna Linkowska

Katedra Medycyny Sądowej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

### Abstract

This paper presents the results of genetic testing in two cases of shared paternity between half-siblings. In the first example, the research was based on the analysis of half-siblings and their mothers with respect to 21 autosomal markers. In the second, the research was based on both the analysis of 30 autosomal markers and X chromosome markers in putative sisters and the mother of one of them. Selected examples are presented to illustrate how the use of different research strategies affects the outcome of the likelihood ratio and the ability to make inferences in complex kinship cases.

### Keywords

establishing paternity, kinship, half-siblings, STR, X-STR

### Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań genetycznych w dwóch sprawach o ustalenie wspólnego ojcostwa pomiędzy przyrodnim rodzeństwem. W pierwszym przykładzie badania oparto na analizie przyrodniego rodzeństwa oraz ich matek w zakresie 21 markerów autosomalnych. W drugim badania opierały się zarówno na analizie 30 markerów autosomalnych jak i markerów chromosomu X u domniemanych siostr i matki jednej z nich. Wybrane przykłady zaprezentowano w celu zobrazowania jak zastosowanie różnych strategii badawczych wpływa na wynik ilorazu wiarygodności i możliwości wnioskowania w skomplikowanych sprawach pokrewieństwa.

### Słowa kluczowe

ustalenie ojcostwa, pokrewieństwo, przyrodnie rodzeństwo, STR, X-STR

## Introduction

Kinship studies mostly involve establishing paternity through an examination of the mother, child and putative father. However, recently there have been an increasing number of cases in which the goal is to establish kinship through a common biological father in situations where the father is deceased. These are often inheritance cases in which the deceased man had children with different women. Such testing can be performed using a standard set of autosomal DNA-STR markers, but statistical analysis based on the results offers little chance of categorical conclusions when testing is based solely on the analysis of biological material from putative half-siblings [1]. According to the recommendations of the International Society of Forensic Genetics (ISFG), all biostatistical calculations in paternity tests should be based on the likelihood ratio (LR), which is the ratio of the probabilities of evidence considered for two hypotheses. This principle remains the same regardless of the complexity of the problem or which individuals were tested [2]. Unfortunately, in situations where sharing alleles from a common ancestor (IBD) is not mandatory in any of the kinship hypotheses, as is the case with half-siblings who may inherit only one allele or none by descent from a common ancestor, relatively poor, non-conclusive statistical analysis results are most often achieved for a standard set of autosomal markers [1,3]. Increasing the value of LR in establishing kinship by increasing the number of individuals tested and the number of markers tested, including the inclusion of non-autosomal markers, has been successfully used for many years in forensic genetics. However, according to data collected by the Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics (ISFG-POL), almost half of forensic genetics laboratories in Poland do not perform analyses of STR markers of the X chromosome, even though they are most informative when establishing shared paternity between two women. An alternative for autosomal STR markers remains the inclusion of additional individuals in the study. Expanding testing by including relatives will be the strategy of choice when determining shared paternity of half-siblings of different sexes. The examples presented in this paper illustrate the use of different research strategies and different markers including X chromosome markers to elucidate complex cases of kinship.

## Description of cases

### Case 1

The case for denying the acknowledgment of paternity of a deceased man to a woman (the putative daughter) was brought by the man's daughters from the marriage (daughter 1 and daughter 2). In addition to the daughters of the deceased man, material for testing was also collected from their mothers. DNA

## Wprowadzenie

Badania pokrewieństwa w większości dotyczą ustalenia ojcostwa na podstawie badania matki, dziecka i domniemanego ojca. Jednak w ostatnim czasie pojawia się coraz więcej spraw, w których celem jest ustalenie pokrewieństwa poprzez wspólnego ojca biologicznego w sytuacji kiedy ten nie żyje. Są to często sprawy spadkowe, w których zmarły mężczyzna miał dzieci z różnymi kobietami. Badanie takie można przeprowadzić z wykorzystaniem standardowego zestawu autosomalnych markerów DNA-STR, jednak analiza statystyczna w oparciu o uzyskane wyniki daje niewielkie szanse na kategoryczne wnioski w sytuacji kiedy badania opierają się wyłącznie na analizie materiału biologicznego od domniemanego przyrodniego rodzeństwa [1]. Zgodnie z rekomendacjami Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG) wszystkie obliczenia biostatystyczne w testach na ojcostwo powinny opierać się na ilorazie wiarygodności (LR), który jest stosunkiem prawdopodobieństw dowodu rozważanego dla dwóch hipotez. Zasada ta pozostaje taka sama niezależnie od złożoności problemu, ani tego jakie osoby zostały poddane badaniu [2]. Niestety w sytuacjach, gdy dzielenie alleli od wspólnego przodka (IBD) nie jest obowiązkowe w żadnej z hipotez pokrewieństwa, tak jak ma to miejsce w przypadku przyrodniego rodzeństwa, które może dziedziczyć tylko jeden allel lub żaden przez pochodzenie od wspólnego przodka, najczęściej osiąga się stosunkowo słabe, niekonkluzywne wyniki analiz statystycznych dla standardowego zestawu markerów autosomalnych [1,3]. Podniesienie wartości LR w ustalaniu pokrewieństwa poprzez zwiększenie liczby badanych osób i liczby badanych markerów, w tym włączenie do badań markerów nieautosomalnych, jest z powodzeniem stosowane od wielu lat w genetyce sądowej. Niemniej jednak, jak wynika z danych zebranych przez Polskojęzyczną Grupę Roboczą Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG-POL), prawie połowa laboratoriów genetyczno-sądowych w Polsce nie wykonuje analiz markerów STR chromosomu X, choć są one najbardziej informatywne w przypadku ustalania wspólnego ojcostwa dwóch kobiet. Alternatywą w zakresie autosomalnych markerów STR pozostaje włączenie do badań dodatkowych osób. Rozszerzenie badań poprzez włączenie krewnych będzie strategią z wyboru w przypadku ustalania wspólnego ojcostwa przyrodniego rodzeństwa różnej płci. Przedstawione w niniejszej pracy przykłady ilustrują zastosowanie różnych strategii badawczych i różnych markerów w tym również markerów chromosomu X w celu wyjaśniania złożonych przypadków pokrewieństwa.

## Opis przypadków

### Przypadek 1

Sprawę o zaprzeczenie uznania ojcostwa zmarłego mężczyzny w stosunku do kobiety (domniemana córka) wniosły córki tego mężczyzny ze związku małżeńskiego (córka 1 i córka 2). Poza córkami zmarłego mężczyzny materiał do badań pobrano również od ich matek. Z pobranego materiału wyizolowano DNA

was isolated from the collected material using the “GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit” (EURx). DNA concentration was determined by spectrophotometric method using DeNovix equipment. Genetic testing was performed for 21 polymorphic DNA-STR *loci* using the “AmpFISTR NGM SElect” and “AmpFISTR Identifier Plus” multiplex kits (Applied Biosystems). DNA amplification was performed using the GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems). Fractionation of the amplified DNA fragments was performed using the ABI Prism 3130xl automated sequencer (Applied Biosystems). DNA fragment length evaluation and genotyping were performed using the GeneMapper ID v.3.2.1 computer program. The genetic profiles of the subjects are shown in Table 1. Based on the obtained genetic results, the likelihood ratio – LR and the kinship probability – W (with an a priori probability of 0.5) were calculated. The calculations were performed using the Familias computer program (version 3.2.6). When genetic testing was based solely on the study of half-siblings, the value of statistical parameters allowed only moderate support for the hypothesis of a common father (Table 2). Therefore, it was decided to include the mothers of the women under study (mother 1 is the biological mother of daughter 1 and daughter 2, and mother 2 is the biological mother of the putative daughter). The results of the statistical analyses for the different hypotheses are summarized in Table 2. The value of LR>1000000 was obtained only after the inclusion of the mothers of the women under study, which allowed extreme strong support for the hypothesis that the putative daughter and daughter 1 and daughter 2 share a biological father (Figure 1).

przy użyciu zestawu „GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit” (EURx). Stężenie DNA określono metodą spektrofotometryczną z użyciem aparatu DeNovix. Badania genetyczne przeprowadzono w zakresie 21 polimorficznych *loci* DNA-STR w oparciu o zestawy multipleksowe „AmpFISTR NGM SElect” oraz „AmpFISTR Identifier Plus” (Applied Biosystems). Amplifikację DNA wykonano z wykorzystaniem termocyklera GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Frakcjonowanie zamplifikowanych fragmentów DNA przeprowadzono z wykorzystaniem automatycznego sekwenatora ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). Ocenę długości fragmentów DNA i genotypowanie przeprowadzono w oparciu o program komputerowy GeneMapper ID v.3.2.1. Profile genetyczne badanych osób przedstawiono w tabeli 1. W oparciu o uzyskane wyniki badań genetycznych obliczono iloraz wiarygodności – LR i prawdopodobieństwo pokrewieństwa – W (przy prawdopodobieństwie a priori 0,5). Obliczenia wykonano wykorzystując program komputerowy Familias (version 3.2.6). W przypadku kiedy badania genetyczne opierały się wyłącznie na badaniu przyrodniego rodzeństwa wartość parametrów statystycznych pozwoliła zaledwie na umiarkowane wsparcie hipotezy o wspólnym ojcu (Tabela 2). W związku z powyższym zdecydowano o włączeniu matek badanych kobiet (matka 1 jest matką biologiczną córki 1 i córki 2, a matka 2 jest matką biologiczną domniemanej córki). Wyniki analiz statystycznych dla różnych hipotez zestawiono w tabeli 2. Wartość LR>1000000 uzyskano dopiero po włączeniu do badań matek badanych kobiet, co pozwoliło na ekstremalnie silne wsparcie hipotezy zakładającej, że domniemana córka oraz córka 1 i córka 2 mają wspólnego ojca biologicznego (Rycina 1).

**Table 1. Amplification results of autosomal loci (DNA STR) for case 1**

**Tabela 1. Wyniki amplifikacji loci autosomalnych (DNA STR) dla przypadku 1**

	Mother 1 / Matka 1	Daughter 1 / Córka 1	Daughter 2 / Córka 2	Putative daughter / Domniemana córka	Mother 2 / Matka 2
D8S1179	13/14	12/14	12/14	12	12/13
D21S11	28/31.2	28/31.2	30/31.2	30/32.2	32.2
D7S820	9/15	9/12	9/12	12/13	10/13
CSF1PO	11	10/11	11	10/11	11/12
D3S1358	16	16/18	16/17	14/17	14/15
TH01	9	9/9.3	9/9.3	9.3	8/9.3
D13S317	8/11	8	11/14	11/14	11
D16S539	11/13	11	11	11/12	9/12
D2S1338	17/24	17/19	19/24	19/24	17/24
D19S433	12/15.2	12/13	12/13	13/14	14
vWA	17	17/19	17/19	14/19	14/18
TPOX	8/11	8	8	8/11	8/11
D18S51	16/20	20	20	14/15	14

	Mother 1 / Matka 1	Daughter 1 / Córka 1	Daughter 2 / Córka 2	Putative daughter / Domniemana córka	Mother 2 / Matka 2
D5S818	11/12	12	11/12	12/13	11/12
FGA	21/22	22/24	21/24.2	24/25	20/25
D10S1248	16	14/16	14/16	14/16	14
D22S1045	11/15	15	11/16	11/15	11/16
D2S441	12/14	10/12	10/12	10/11.3	11.3/12
D1S1656	17.3	17.3	17.3	17/17.3	13/17
D12S391	18.3/20	20/21	20/21	17/19	19/22
ACTBP2	14.2/22.2	14.2/28.2	22.2/24.2	26.2/28.2	19/26.2

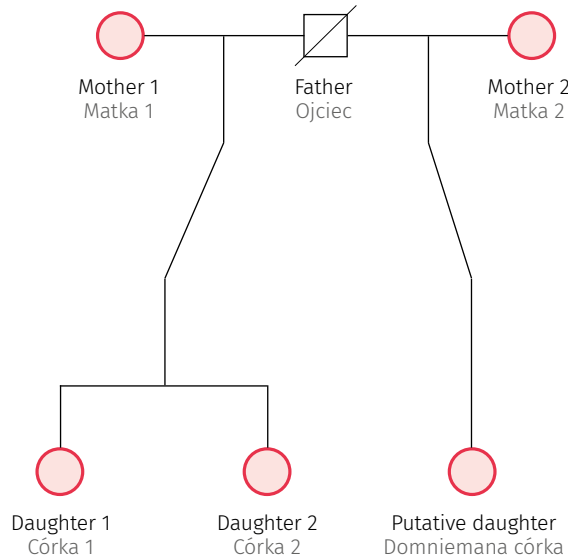
**Table 2. Results of statistical analyses obtained for hypotheses tested in case 1.**

LR – likelihood ratio, W – kinship probability with a priori probability = 0.5

**Tabela 2. Wyniki analiz statystycznych uzyskane dla hipotez testowanych w ramach przypadku 1.**

LR – iloraz wiarygodności, W – prawdopodobieństwo pokrewieństwa przy prawdopodobieństwie a priori = 0,5

Hypotheses tested / Testowane hipotezy	LR	W
Putative daughter and daughter 1 are children of the same biological father vs. putative daughter is not related to daughter 1 Domniemana córka i córka 1 są dziećmi tego samego ojca biologicznego vs. domniemana córka nie jest spokrewniona z córką 1	14.81	0.936
Putative daughter and daughter 2 are children of the same biological father vs. putative daughter is not related to daughter 2 Domniemana córka i córka 2 są dziećmi tego samego ojca biologicznego vs. domniemana córka nie jest spokrewniona z córką 2	57.08	0.983
Putative daughter, daughter 1 and daughter 2 are children of the same biological father vs. putative daughter is not related to daughter 1 and daughter 2 Domniemana córka, córka 1 i córka 2 są dziećmi tego samego ojca biologicznego vs. domniemana córka nie jest spokrewniona z córką 1 i córką 2	179.176	0.9944
Putative daughter, daughter 1 and daughter 2 are children of the same biological father. In addition, putative daughter is the child of mother 2 vs. putative daughter is the child of mother 2 and is not related to daughter 1 and daughter 2 Domniemana córka, córka 1 i córka 2 są dziećmi tego samego ojca biologicznego. Ponadto domniemana córka jest dzieckiem matki 2 vs. domniemana córka jest dzieckiem matki 2 i nie jest spokrewniona z córką 1 i córką 2	18 777.29	0.9999
Putative daughter, daughter 1 and daughter 2 are children of the same biological father. In addition, daughter 1 and daughter 2 are children of mother 1 vs. putative daughter is not related to daughter 1 and daughter 2, who are children of mother 1 Domniemana córka, córka 1 i córka 2 są dziećmi tego samego ojca biologicznego. Ponadto córka 1 i córka 2 są dziećmi matki 1 vs. domniemana córka nie jest spokrewniona z córką 1 i córką 2, które są dziećmi matki 1	22 893.94	0.999956
Putative daughter, daughter 1 and daughter 2 are children of the same biological father. In addition, putative daughter is the child of mother 2 and daughter 1 and daughter 2 are the children of mother 1 vs. putative daughter is the child of mother 2 and is not related to daughter 1 and daughter 2, who are the children of mother 1 Domniemana córka, córka 1 i córka 2 są dziećmi tego samego ojca biologicznego. Ponadto domniemana córka jest dzieckiem matki 2 a córka 1 i córka 2 są dziećmi matki 1 vs. domniemana córka jest dzieckiem matki 2 i nie jest spokrewniona z córką 1 i córką 2, które są dziećmi matki 1	8 555 505	0.999999988



**Figure 1. A tree describing hypothesis H0 assuming that daughter 1, daughter 2 and the putative daughter have a common biological father. Red color indicates individuals whose genetic material was included in the study**

**Rycina 1. Drzewo opisujące hipotezę H0 zakładającą, że córka 1, córka 2 i domniemana córka mają wspólnego ojca biologicznego. Czerwonym kolorem zaznaczono osoby, których materiał genetyczny został uwzględniony w badaniu**

## Case 2

The case concerned establishing the paternity of a deceased man to two women, with each of the women having a different biological mother. For genetic testing, it was possible to collect material from only one of the mothers. DNA was isolated from the collected material using the “GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit” (EURx). Genetic testing was performed for 30 polymorphic STR DNA loci using “AmpFLSTR NGM SElect”, “AmpFLSTR Identifier Plus” (Applied Biosystems) and “Investigator HDplex Kit” (Qiagen) multiplex kits. In addition, genetic testing was also performed on 12 STR loci of the X chromosome (X-STR) using the “Investigator Argus X-12 QS” kit (Qiagen). DNA amplification was performed in a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems). Fractionation of the amplified DNA fragments was performed using an ABI Prism 3130xl automated sequencer (Applied Biosystems). DNA fragment length evaluation and genotyping were performed using the GeneMapper ID v.3.2.1 computer program. The genetic profiles of the subjects are shown in Table 3. Based on the results obtained from the polymorphism analysis of DNA STR and DNA X-STR loci, the likelihood ratio – LR and kinship probability – W (with an a priori probability of 0.5) were calculated. Calculations were performed using the Familias and FamLinkX computer program. Based on the analysis of 30 autosomal STRs in two women who are putative half-sisters, an inconclusive result was obtained (LR= 0.436). When the genetic results of the DNA-STR loci of the mother of one of the women were included in the statistical analysis, the LR increased to 19.5, but was still too low for the result to be considered conclusive. Only the analysis of the X chromosome loci provided LR = 5.172 ×10<sup>7</sup> for the two half-sisters, and after also including the mother of one of the women in the statistical analysis, LR = 2.874 ×10<sup>9</sup>, which in both cases extremely strongly supports the hypothesis of a common biological father between the half-sisters.

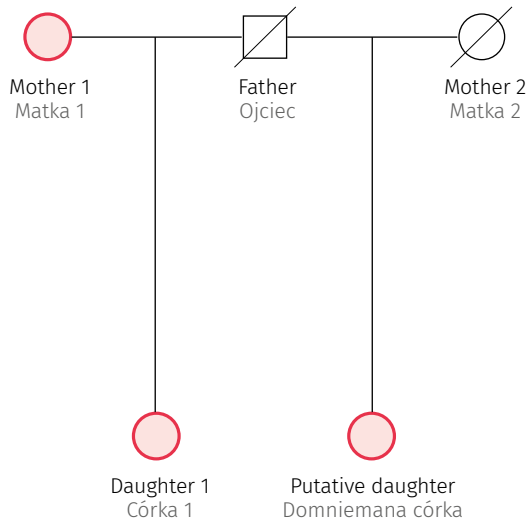
## Przypadek 2

Sprawa dotyczyła ustalenia ojcostwa zmarłego mężczyzny w stosunku do dwóch kobiet, przy czym każda z tych kobiet ma inną matkę biologiczną. Do badań genetycznych możliwe było pobranie materiału tylko od jednej z matek. Z pobranego materiału wyizolowano DNA przy użyciu zestawu „GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit” (EURx). Badania genetyczne przeprowadzono w zakresie 30 polimorficznych loci DNA STR w oparciu o zestawy multipleksowe „AmpFLSTR NGM SElect”, „AmpFLSTR Identifier Plus” (Applied Biosystems) oraz „Investigator HDplex Kit” (Qiagen). Ponadto badania genetyczne przeprowadzono również w zakresie 12 loci STR chromosomu X (X-STR) z wykorzystaniem zestawu „Investigator Argus X-12 QS” (Qiagen). Amplifikację DNA wykonano w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Frakcjonowanie zamplifikowanych fragmentów DNA przeprowadzono z wykorzystaniem automatycznego sekwenatora ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). Ocenę długości fragmentów DNA i genotypowanie przeprowadzono w oparciu o program komputerowy GeneMapper ID v.3.2.1. Profile genetyczne badanych osób przedstawiono w tabeli 3. W oparciu o wyniki uzyskane z analizy polimorfizmu loci DNA STR oraz DNA X-STR obliczono iloraz wiarygodności – LR i prawdopodobieństwo pokrewieństwa – W (przy prawdopodobieństwie a priori 0,5). Obliczenia wykonano wykorzystując program komputerowy Familias i FamLinkX. Na podstawie analizy 30 autosomalnych układów STR u dwóch kobiet będących domniemanymi przyrodnimi siostrami otrzymano wynik nierozstrzygujący (LR= 0,436). Po uwzględnieniu w analizie statystycznej wyników badań genetycznych loci DNA-STR matki jednej z kobiet, LR wzrósł do 19,5, ale nadal był zbyt niski, aby wynik uznać za rozstrzygujący. Dopiero analiza loci chromosomu X pozwoliła na uzyskanie LR = 5,172 ×10<sup>7</sup> dla dwóch przyrodnich sióstr, a po uwzględnieniu w analizie statystycznej również matki jednej z kobiet LR = 2,874 ×10<sup>9</sup>, co w obu przypadkach ekstremalnie silnie wspiera hipotezę wspólnego ojca biologicznego pomiędzy przyrodnimi siostrami.

Table 3. Amplification results of autosomal loci (DNA STR) and X chromosome loci (DNA X-STR) for case 2

Tabela 3. Wyniki amplifikacji loci autosomalnych (DNA STR) oraz loci chromosomu X (DNA X-STR) dla przypadku 2

	Mother 1 / Matka 1	Daughter 1 / Córka 1	Putative daughter / Domniemana córka
D8S1179	12/13	12	13/14
D21S11	29/31.2	30/31.2	30
D7S820	11/12	11	8/11
CSF1PO	11/12	11/12	10/14
D3S1358	14/18	14/18	16/18
TH01	6/9.3	6	9.3
D13S317	11	8/11	8/11
D16S539	9/12	9/13	11/13
D2S1338	18/20	18/24	18/25
D19S433	14/15	15	12/14
vWA	16/17	15/17	13/18
TPOX	8/9	8	8
D18S51	12/15	15/16	12/16
D5S818	12/13	12	12
FGA	20/24	24/25	22
D10S1248	15/16	16	13/15
D22S1045	15/17	11/17	15/16
D2S441	11	11/14	11/14
D1S1656	14/16.3	11/16.3	11/12
D12S391	18/24	20/24	17/21
ACTBP2	20.2/27.2	20.2/22.2	22.2/29.2
D7S1517	23	20/23	20/22
D3S1744	17	17	14/17
D2S1360	22/25	20/22	20/22
D6S474	15/17	15/16	14/16
D4S2366	9/14	9/14	9
D8S1132	18	18	20/22
D5S2500	11/12	12/15	16
D21S2055	23.1/33	19.1/23.1	26/32
D10S2325	11/15	11/13	10/13
DXS10103	17/18	17/20	19/20
DXS8378	9/12	12	10/12
DXS10101	27.2/31	30.2/31	30.2
DXS10134	31/34	34/37	37/38
DXS10074	16	16/19	15/19
DXS7132	14	14	14
DXS10135	23/24	18/24	18/25
DXS7423	15	14/15	14/15
DXS10146	27	27/30	28/30
DXS10079	18/19	18/19	18/20
HPRTB	11/14	14	13/14
DXS10148	18/25.1	18	18/24.1



**Figure 2. A tree describing the H0 hypothesis assuming that daughter 1 and the putative daughter have a common biological father. Red color indicates individuals whose genetic material was included in the study**

**Rycina 2. Drzewo opisujące hipotezę H0 zakładającą, że córka 1 i domniemana córka mają wspólnego ojca biologicznego. Czerwonym kolorem zaznaczono osoby, których materiał genetyczny został uwzględniony w badaniu**

## Conclusions

Cases which involved establishing paternity based on testing of half-siblings have become very common in the practice of forensic geneticists in recent years. It is important to realize what the chances of a conclusive result are, based on the available options (test subjects or tools in the form of various DNA amplification kits) and how the use of different testing strategies can help resolve such cases. Analyzing Y chromosome markers seems to be the best solution when half-siblings are male. However, the discovery of rapidly mutating Y-STRs (RM Y-STRs) and their introduction into commercial kits has changed the possibilities of male line identification to the identification of male individuals [4]. Distinguishing relatives in the male line based on RM Y-STR analysis is highly desirable in criminal cases, but can make it difficult to resolve civil cases of kinship. Neuhuber et al (2022) showed that the differentiation rate for the Yfiler Plus PCR Amplification kit (Thermo Fisher Scientific) was 14% for father-son pairs and 33% for brothers, respectively [4]. Sala et al (2023) described the case of two men related through a common father whose Y-STR haplotypes differ in three systems. In the study, neither the putative father, the biological mothers of the two men, nor any other relative was available. Analysis of 27 Y-chromosome markers showed differences in the *DYS458*, *DYS533* and *DYS627* loci by one repeat unit. LR calculated taking into account two transmission events and mutations for Y-STR markers allowed neither to confirm nor to exclude a patrilineal relationship between the men studied. Extending the study to include 23 autosomal STRs resulted in  $LR = 3.5 \times 10^6$  for the hypothesis that the men studied are half-brothers versus the alternative hypothesis of no kinship between them [5]. Unfortunately, in most cases, the study of only autosomal markers only in putative half-siblings does not achieve such high LR values [1]. The results of simulations by Pinto et al. (2019) show how the number of STR markers affects the LR value, while stipulating that

## Wnioski

Sprawy dotyczące ustalenia ojcostwa na podstawie badań przyrodniego rodzeństwa stały się w ostatnich latach bardzo powszechne w praktyce genetyków sądowych. Istotne jest aby, zdawać sobie sprawę jakie są szanse na wynik rozstrzygający w oparciu o dostępne możliwości (osoby badane czy narzędzia w postaci różnych zestawów do amplifikacji DNA) i jak zastosowanie różnych strategii badawczych może pomóc w rozwiązaniu takich spraw. Najlepszym rozwiązaniem w sytuacji, gdy przyrodnie rodzeństwo jest płci męskiej wydaje się analiza markerów chromosomu Y. Jednak odkrycie szybko mutujących Y-STR (RM Y-STR) i wprowadzenie ich do komercyjnych zestawów zmieniło możliwości identyfikacji linii męskiej na identyfikację osobników męskich [4]. Rozróżnienie krewnych w linii męskiej na podstawie analizy RM Y-STR jest bardzo pożądane w sprawach karnych, ale może utrudniać rozwiązanie spraw cywilnych dotyczących pokrewieństwa. Neuhuber i wsp. (2022) wykazali, że wskaźnik zróżnicowania dla zestawu Yfiler Plus PCR Amplification (Thermo Fisher Scientific) wynosi odpowiednio 14% dla par ojciec-syn i 33% dla braci [4]. Sala i wsp. (2023) opisał sprawę dwóch mężczyzn spokrewnionych poprzez wspólnego ojca, których haplotypy Y-STR różnią się w trzech układach. W badaniu ani domniemany ojciec, ani biologiczne matki obu mężczyzn, ani żaden inny krewny nie byli dostępni. Analiza 27 markerów chromosomu Y wykazała różnice w loci *DYS458*, *DYS533* i *DYS627* o jedną jednostkę powtarzalną. LR obliczony z uwzględnieniem dwóch zdarzeń transmisji i mutacji dla markerów Y-STR nie pozwolił ani na potwierdzenie, ani na wykluczenie związku patrylinearnego pomiędzy badanymi mężczyznami. Rozszerzenie badań o 23 autosomalne STR pozwoliło uzyskać wynik  $LR = 3,5 \times 10^6$  dla hipotezy, że badani mężczyźni są przyrodnimi braćmi w stosunku do hipotezy alternatywnej o braku pokrewieństwa między nimi [5]. Niestety w większości przypadków badanie wyłącznie markerów autosomalnych tylko u domniemanego przyrodniego rodzeństwa



this value depends on their informative power and the database used. Moreover, the authors advise against studies based solely on putative siblings for 22 autosomal markers (and less) due to the high risk of obtaining poor or even misleading conclusions. This is confirmed by the results in the two examples presented here, in which analysis of autosomal STRs based solely on the study of half-siblings did not lead to conclusive conclusions.

The results of the previously mentioned simulation studies showed that the addition of a third person significantly improved LR values, with those obtained based on the genetic profile of the grandparent on the father's side showing the best statistical results, followed by those that included the genotype of full siblings. In their paper, the authors present guidelines on the approximate number of markers and additional individuals that should be considered first for kinship analysis in order to achieve the highest possible values of statistical parameters [1]. Unfortunately, in real cases, we do not always have the material that would be most desirable in a particular case, and as the presented examples show, the inclusion of only one additional person even when expanding the study to 30 autosomal STR markers was not enough to obtain a conclusive result. In addition, extending the tests with additional STR markers increases the number of *loci* on the same chromosome (syntenic *loci*), which in turn raises concerns about their independence.

In example 2, autosomal STR testing was supplemented with Investigator HDplex Kit markers, which show independent inheritance with respect to the syntenic markers of the AmpFL-STR NGM Select and AmpFISTR Identifier Plus kits [6,7]. It was only when the study was expanded to include X chromosome markers that a conclusive result was obtained. X-STR analysis is a powerful tool, especially in complex cases of kinship [8]. As example 2 shows, a conclusive result could be obtained by testing only half-sisters for X chromosome STR. Analysis based solely on autosomal markers requires the inclusion of additional individuals, which not only generates additional costs, but can also be hindered by the inability to obtain material. It should also be added that transmission on the X chromosome allows for the differentiation of certain hypotheses of ancestry that cannot be distinguished on the basis of autosomal markers, e.g. half-siblings, uncle-niece, grandparents-grandchildren, which may be important in identification cases [9,10].

nie pozwala na osiągnięcie tak wysokich wartości LR [1]. Wyniki symulacji przeprowadzonych przez Pinto i wsp. (2019) pokazują, jak liczba markerów STR wpływa na wartość LR, zastrzegając jednocześnie, że jest to wartość zależna od ich mocy informacyjnej i zastosowanej bazy danych. Co więcej autorzy odradzają badania oparte wyłącznie na domniemanym rodzeństwie w zakresie 22 markerów autosomalnych (i mniej) z uwagi na duże ryzyko uzyskania słabych lub wręcz mylnych wniosków.

Potwierdzają to wyniki w obu prezentowanych przykładach, w których analiza autosomalnych STR wyłącznie na podstawie badania przyrodniego rodzeństwa nie pozwoliła na rozstrzygające wnioski. Wyniki wspomnianych wcześniej badań symulacyjnych wykazały, że dodanie trzeciej osoby znacznie poprawiło wartości LR, przy czym te uzyskane w oparciu o profil genetyczny dziadka ze strony ojca, wykazały najlepsze wyniki statystyczne, a następnie te, w których uwzględniono genotyp pełnego rodzeństwa. Autorzy w swojej pracy prezentują wytyczne dotyczące orientacyjnej liczby markerów i dodatkowych osób, które należy wziąć pod uwagę w pierwszej kolejności do analizy pokrewieństwa, aby osiągnąć możliwie jak najwyższe wartości parametrów statystycznych [1]. Niestety w rzeczywistych sprawach nie zawsze dysponujemy materiałem, który w konkretnym przypadku byłby najbardziej pożądany, a jak pokazują prezentowane przykłady włączenie tylko jednej dodatkowej osoby nawet przy rozszerzeniu badań do 30 autosomalnych markerów STR nie wystarczyło, aby uzyskać wynik rozstrzygający. Ponadto rozszerzenie badań o dodatkowe markery STR zwiększa liczbę *loci* na tym samym chromosomie (*loci* synteniczne), co z kolei budzi obawy dotyczące ich niezależności.

W przykładzie 2 badania autosomalnych STR uzupełniono o markery zestawu Investigator HDplex Kit, które wykazują niezależność dziedziczenia w odniesieniu do syntenicznych markerów zestawów AmpFL-STR NGM Select oraz AmpFISTR Identifier Plus [6,7]. Dopiero rozszerzenie badań o markery chromosomu X pozwoliło uzyskać wynik rozstrzygający. Analiza X-STR stanowi potężne narzędzie, szczególnie w skomplikowanych przypadkach pokrewieństwa [8]. Jak pokazuje przykład 2 wynik rozstrzygający można było uzyskać badając wyłącznie przyrodnie siostry w zakresie STR chromosomu X. Analiza oparta wyłącznie na markerach autosomalnych wymaga włączenia dodatkowych osób, co nie tylko generuje dodatkowe koszty, ale również może być utrudnione z powodu braku możliwości pozyskania materiału. Należy również dodać, że transmisja na chromosomie X pozwala na zróżnicowanie pewnych hipotez dotyczących rodowodów, których nie można rozróżnić na podstawie markerów autosomalnych np. przyrodnie rodzeństwo, wujek-siostrzenica, dziadkowie-wnuki, co może mieć istotne znaczenie w sprawach identyfikacyjnych [9,10].



## References | Piśmiennictwo

1. Pinto, N., Simoes, R., Amorim, A. & Conde-Sousa, E. Optimizing the information increase through the addition of relatives and genetic markers in identification and kinship cases. *Forensic Sci Int Genet* 40, 210-218, doi:10.1016/j.fsigen.2019.02.019 (2019).
2. Gjertson, D. W. et al. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet* 1, 223-231, doi:10.1016/j.fsigen.2007.06.006 (2007).
3. Wenk, R. E. & Chiafari, F. A. Distinguishing full siblings from half-siblings in limited pedigrees. *Transfusion* 40, 44-47, doi:10.1046/j.1537-2995.2000.40010044.x (2000).
4. Neuhuber, F. et al. Improving the differentiation of closely related males by RMplex analysis of 30 Y-STRs with high mutation rates. *Forensic Sci Int Genet* 58, 102682, doi:10.1016/j.fsigen.2022.102682 (2022).
5. Sala, A., Caputo, M. & Corach, D. Three mutations at a Y-STR haplotype defy a paternal half-brothers kinship case analysis. *Int J Legal Med* 137, 1017-1022, doi:10.1007/s00414-023-03027-9 (2023).
6. Wojtkiewicz, R., Markiewicz, B., Jedrzejczyk, M. & Jacewicz, R. Polymorphism of 12 STR loci included in the Investigator HD-plex kit in Polish population of Lodz region. *Arch Med Sądowej Kryminol* 66, 13-22, doi:10.5114/amsik.2016.62331 (2016).
7. Alsafiah, H. M., Aljanabi, A. A., Hadi, S., Alturayef, S. S. & Goodwin, W. An evaluation of the SureID 23comp Human Identification Kit for kinship testing. *Sci Rep* 9, 16859, doi:10.1038/s41598-019-52838-7 (2019).
8. Tillmar, A. O. et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis. *Forensic Sci Int Genet* 29, 269-275, doi:10.1016/j.fsigen.2017.05.005 (2017).
9. Pinto, N., Gusmao, L. & Amorim, A. X-chromosome markers in kinship testing: a generalisation of the IBD approach identifying situations where their contribution is crucial. *Forensic Sci Int Genet* 5, 27-32, doi:10.1016/j.fsigen.2010.01.011 (2011).
10. Garcia, F. M. et al. Forensic Applications of Markers Present on the X Chromosome. *Genes (Basel)* 13, doi:10.3390/genes13091597 (2022).

### Date:

date of submission | data nadeśtania: **18.01.2024**  
acceptance date | data akceptacji: **10.04.2024**

### Corresponding author:

Katarzyna Linkowska  
Katedra Medycyny Sądowej, Collegium Medicum w Bydgoszczy,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz  
e-mail: linkowska@cm.umk.pl

### ORCID:

Katarzyna Linkowska: 0000-0001-7632-4181