



# archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Krótkie doniesienie  
Short communication

Lurdes Pontes<sup>1,2</sup>, José Carneiro de Sousa<sup>1,3</sup>, Rui Medeiros<sup>3,4,5</sup>

## SNP i STR w medycynie sądowej. Metoda analizy pokrewieństwa

### SNPs and STRs in forensic medicine. A strategy for kinship evaluation

<sup>1</sup>National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, IP, North Delegation, Portugal

<sup>2</sup>CENCIFOR – Forensic Science Center, Portugal

<sup>3</sup>ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Portugal

<sup>4</sup>Molecular Oncology Group, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal

<sup>5</sup>LPCC, Research Department-Portuguese League Against Cancer (NRNorte), Porto, Portugal

#### Streszczenie

Na przestrzeni ostatnich lat spore zainteresowanie w wielu dziedzinach nauki budzą polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphisms* – SNP) analizowane przy użyciu najnowocześniejszych technologii. Są one powszechnie wykorzystywane jako markery identyfikacji genów leżących u podłoża wielu złożonych chorób. Przyczyniają się także do wykorzystywania potencjału farmakogenomiki w odniesieniu do różnic w odpowiedzi na stosowane leki. Ponadto wykazano wysoką przydatność SNP w genetyce sądowej, m.in. w sprawach kryminalnych, identyfikacji ofiar katastrof oraz przy ustalaniu ojcostwa i pokrewieństwa. Z uwagi na niskie tempo mutacji SNP są bardzo przydatne jako markery w analizach pokrewieństwa. W ogromnej większości przypadków analizy na bazie powszechnie wykorzystywanych zestawów markerów krótkich powtórzeń tandemowych (*short tandem repeats* – STR) dostarczają dowody o wysokiej mocy statystycznej, jednak notuje się także wyniki niejednoznaczne. Dzieje się tak w złożonych analizach pokrewieństwa bądź w przypadkach problematycznych, np. związanych z mutacjami, które są specyficzne dla stosowania STR. Obecnie niektóre laboratoria medycyny sądowej wykorzystują SNP jako uzupełnienie analizy STR w części przypadków. Celem pracy jest przedstawienie wybranych analizowanych przez przypadków oraz najnowszych danych dotyczących jednej z metod aktualnie wykorzystywanych w tej dziedzinie, czyli łącznej analizy STR i autosomalnych SNP, przy ustalaniu pokrewieństwa. W tym celu przeprowadzono przegląd i porównanie wyników badań wykonanych przez różne grupy badawcze.

**Słowa kluczowe:** medycyna sądowa, genetyka sądowa, identyfikacja człowieka, polimorfizmy pojedynczego nukleotydu, SNPforID, mutacja.

#### Abstract

Some emerging technologies are used as strategies for the analyses of single nucleotide polymorphisms (SNPs) that have attracted much interest in recent years, applied to various scientific areas. They have been extensively used as markers to identify genes that underlie complex diseases and also to realize the potential of pharmacogenomics in relation to different drug responses. Additionally, SNPs have been shown to be very useful in forensic genetics resolving all kinds of legal problems, namely crime cases, disaster victim identification and paternity and kinship investigation testing. The low mutation rate of SNPs, makes these markers very suitable for relationship testing. In the great majority of the cases, analyses with the widely used sets of STR markers provide powerful statistical evidence but some of them remain with ambiguous results. Those include cases with complex pedigrees or cases with some problems, like

mutations, that are inherent to the use of STRs. At this time several forensic laboratories are using SNPs especially to complement the study of STRs in some of their casework cases. This paper intends to analyze some of our casework examples and to provide a data update on the joint use of STRs and autosomal SNPs in the evaluation and kinship calculation, one of the strategies currently used for this purpose, namely reviewing and comparing results published by various working groups.

**Key words:** legal medicine, forensic genetics, human identification, single nucleotide polymorphisms, SNPforID, mutation.

## Wprowadzenie

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphisms* – SNP) stanowią znaczną część polimorfizmów obecnych w ludzkim genomie. Liczbę SNP szacuje się na 10–11 mln, co oznacza, że SNP występuje średnio co 275 par zasad (pz) [1, 2]. Zazwyczaj SNP stanowią formy bialleliczne, a średnie tempo mutacji w danej pozycji pary zasad jest wyjątkowo niskie (od 10<sup>-7</sup> do 10<sup>-9</sup>). Z tego względu SNP są szeroko wykorzystywane w analizie demograficznej historii populacji człowieka. Badane są również zależności między markerami SNP a niektórymi cechami i chorobami [3–6].

Oprócz zastosowań między innymi w badaniach genetycznych dotyczących pochodzenia etnicznego, cech fizycznych [7, 8] i nieprawidłowości molekularnych [6], w ciągu ostatniego dziesięciolecia SNP zyskały również istotne znaczenie w medycynie sądowej. W niektórych laboratoriach SNP są stosowane jako niezwykle wartościowe markery w rutynowej analizie przypadków, przy identyfikacji ludzi oraz ustalaniu pokrewieństwa [9, 10]. Większość placówek wykorzystuje SNP jako markery uzupełniające, jednak są również sytuacje, w których stanowią one optymalną, a niejednokrotnie jedyną, metodę analizy [9, 11]. Dzieje się tak, gdy DNA charakteryzuje się znacznym stopniem degradacji. W takich przypadkach analiza STR często kończy się niepowodzeniem. Znacznie większą szansę na uzyskanie wyników daje wówczas wykorzystanie markerów SNP [11, 12] ze względu na możliwość ich amplifikacji na bardzo krótkich amplikonach (< 100 pz). Ponadto z uwagi na to, że w rutynowych analizach wykorzystywane są zestawy STR przeznaczone do amplifikacji 15–17 STR, należy przyjąć, że pojedyncza mutacja wystąpi w jednym z *loci* typowanych w takich zestawach w ok. 3% wszystkich mejoz [1]. Dla porównania w SNP mutacje występują

## Introduction

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the more abundant class of polymorphisms in the human genome and are estimated to be 10–11 million with an average of 1 SNP per 275 base pairs (bp) [1, 2]. Most SNPs are bi-allelic, and the average mutation rate at a particular base pair position is extremely low (approximately 10<sup>-7</sup> to 10<sup>-9</sup>). For these reasons, SNPs have been widely used to trace the demographic history of human populations and for association studies between SNP markers and some traits and diseases [3–6].

In the last decade, SNPs have been given special attention in forensic medicine, tending to continue, since they are used in genetic research concerning ethnic origin, physical traits [7, 8], and molecular pathology [6], among others. SNPs are also being used by some laboratories in routine casework investigations, for human identification purposes and relationship testing, and have proved to be very valuable markers [9, 10]. In these laboratories SNPs are mainly used as supplementary markers, but there are situations where SNPs may be the best and often the only alternative of choice [9, 11]. Some of these situations include cases where the DNA is highly degraded, in which frequently STR analysis fails. In those cases, there is a much higher chance of obtaining results with the use of SNP markers [11, 12]. This is because SNPs may be amplified on very short amplicons (< 100 bp). Furthermore, as STR kits that amplify 15–17 STRs are commonly used in routine work, one mutation is expected to occur in one of the *loci* typed with these kits in approximately 3% of all meioses [1]. In contrast, mutations occur 100,000 times less frequently in SNPs than in STRs, and inconsisten-

100 tys. razy rzadziej niż w STR, a niezgodności wywołane mutacjami w *loci* SNP są niezwykle rzadkie [13]. Projekt sekwencjonowania 1000 genomów (*1000 Genomes Project*) wykazał, że za znaczną większość obserwowanej różnorodności genetycznej (zarówno międzyosobniczej, jak i między populacyjnej) odpowiadają rzadkie warianty [14]. Podobnie jak inne warianty strukturalne, takie jak np. delecja, duplikacja czy insercja, większe od SNP, SNP można podzielić na podstawie częstości rzadszego allela (*minor allele frequency* – MAF) na częste i rzadkie. Jako punkt odcięcia przy definiowaniu rzadkich SNP często przyjmuje się wartość MAF poniżej 0,05 [3]. W genetyce sądowej uznaje się natomiast, że w rzadkich SNP wartość MAF przekracza 1% [2]. Ta wartość odcięcia nie ma jednak szczególnego znaczenia biologicznego. Różnice w częstotliwości występowania alleli SNP mogą być warunkowane licznymi czynnikami demograficznymi, takimi jak dobór i wielkość populacji. Część badaczy jest jednak zdania, że podstawową przyczyną większej bądź mniejszej częstości alleli jest jednak czynnik czasowy [15]. Relatywne znaczenie częstych i rzadkich SNP dla fenotypu jest przedmiotem intensywnych dyskusji. Potwierdzono, że większość cech mendelowskich oraz szkodliwych mutacji występuje rzadko. Niektóre badania wskazują z kolei, że pewne cechy ciągłe: wzrost, ciśnienie krwi itp., w których rozkład fenotypów w populacji wykazuje zmienność w obrębie pewnego kontinuum, można wyjaśnić obecnością częstych SNP [5]. W niektórych badaniach stwierdzono, że SNP oraz warianty strukturalne mają często charakter swoisty dla danej populacji, czyli występują wyłącznie w obrębie pojedynczej populacji. Takie SNP mogą mieć znaczenie przy przyporządkowywaniu charakterystycznych fenotypów oraz podatności/odporności na choroby poszczególnych populacji [6]. Tym samym częstotliwości SNP są warunkowane występującymi w czasie zjawiskami mutacji, selekcji oraz dryfu.

W badaniach ojcostwa wykorzystuje się profile genetyczne analizowanych osób w celu porównania względnego ilorazu prawdopodobieństwa (*likelihood ratio* – LR) dla dwóch ewentualności. W liczniku umieszcza się prawdopodobieństwo wystąpienia obserwowanych genotypów przy założeniu, że badany mężczyzna jest ojcem, a w mianowniku możliwość wystąpienia obserwowanych genotypów przy założeniu, że ojcem jest losowy (niespokrewniony) mężczyzna. W ogromnej większości przypadków analizy przeprowadzane przy użyciu powszechnie wykorzystywanych zestawów markerów STR (krótkich powtórzeń tandemowych) zapewniają wysoką moc statystyczną z wyraźnym wskazaniem jednej z alter-

cies caused by mutations in SNP *loci* are extremely rare [13]. The 1000 Genomes Project showed that rare variants account for a large majority of the existing genetic diversity between individuals as well as within populations [14]. SNPs as other structural variants such as deletions, duplications, insertions, among others, larger than SNPs, are classified into common and rare based on minor allele frequencies (MAF). A widely used cut-off for defining rare SNPs being a MAF of less than 0.05 [3]. But in forensic genetics it is considered that in a rare SNP the MAF is greater than 1% [2]. However, this cut-off does not have any special biological relevance. Differences in SNP allele frequencies might be influenced by various demographic factors like selection and population size, but some scientists think that time is the major cause for the increase or decrease of allele frequencies [15]. The relative phenotypic importance of common and rare SNPs is highly debated. Most of the Mendelian traits and deleterious mutations have been shown to be rare while several studies suggest that some continuous traits, like height, blood pressure and others, in which the distribution of phenotypes in the population vary along a continuum, might well be explained in terms of common SNPs [5]. Some studies have also shown that SNPs and structural variants are often 'population-specific' – that they have been found to occur only in a single population. These SNPs might be important in assigning characteristic phenotypes and disease susceptibility/protection to a population [6]. Therefore, SNP frequencies are affected by mutation, selection and drift phenomenon occurring over time.

In paternity testing the genetic profiles of the individuals are used to compare the relative likelihood ratios (LR) of two probabilities: on the numerator the probability of observed genotypes, given the tested man is the father, and on the denominator the probability of observed genotypes, given a random man (being unrelated) is the father. In the great majority of the cases, analyses with the widely used sets of short tandem repeat markers (STRs) provide powerful statistical evidence, favoring one of the alternative hypotheses. Nevertheless, there are some situations where the final statistical result is ambiguous, namely in cases of common paternity investigation of trios

natywnych hipotez. Istnieją jednak sytuacje, w których końcowy wynik analizy statystycznej jest niejednoznaczny. Dzieje się tak w standardowych badaniach ojcostwa obejmujących trzy osoby (trio: domniemanego ojca, matkę i dziecko), jeśli obliczona wartość LR wynosi  $\leq 10\,000$ . W razie wykrycia jednej lub dwóch niezgodności genetycznych między dzieckiem a domniemanym(i) rodzicem(-ami) rozstrzygnięcie analizowanej sprawy może być trudne. Niezgodności mogą być skutkiem mutacji lub wskazywać, że jeden z domniemanych rodziców nie jest faktycznym rodzicem biologicznym. Gdy domniemany ojciec wykazuje niezgodny genotyp w kilku *loci*, można uzyskać bardzo wysoki wskaźnik ojcostwa przy wykorzystaniu pozostałych układów. Innym rodzajem problematycznej sytuacji jest analiza przy niepełnych danych, np. gdy zamiast domniemanego ojca analizie poddawani są inni krewni w linii ojcowskiej, np. jego domniemany brat, ojciec, syn bądź inny krewny. W pierwszym przypadku, czyli przy obecności jednej lub dwóch niezgodności allelicznych, można racjonalnie przyjąć, iż domniemany ojciec jest faktycznie bliskim krewnym ojca biologicznego (synem, ojcem lub bratem). Inną sytuacją tego typu jest uzyskiwanie profili częściowych w analizach obejmujących DNA o wysokim stopniu degradacji, na przykład przy identyfikacji osób na podstawie szczątków kostnych. W przypadkach, w których uzyskane wyniki odznaczają się niewystarczającą mocą statystyczną, jednym z popularnych rozwiązań jest rozszerzenie zestawu analizowanych markerów [16–18]. Inną opcją jest zastosowanie markerów liniowych, jednak nie zawsze metoda ta pozwala uzyskać rozstrzygający wynik [19]. W niektórych analizach przy ustalaniu ojcostwa spośród krewnych można też wykorzystywać szybko mutujące Y-STR [20]. W tym kontekście wielu autorów wskazuje na zasadność stosowania markerów biallelicznych (takich jak SNP) jako markerów z wyboru, ponieważ charakteryzują się one wyższą stabilnością i niższym tempem mutacji niż STR. Należy zaznaczyć, że przy zastosowaniu SNP – z uwagi na niższe tempo mutacji – w niektórych przypadkach wyniki są nadal niejednoznaczne [21].

Do celów analizy sądowej wykorzystywane są dwa rodzaje markerów binarnych: SNP oraz polimorfizmy insercyjno-delecyjne (indele). Indele stanowią lepiej dopasowany układ typowania, ponieważ w analizie tego typu wykorzystywana jest bezpośrednio amplifikacja PCR, a następnie detekcja metodą elektroforezy kapilarniej, przy pojedynczym transferze między probówkami, z zastosowaniem takiej samej metodologii jak w tradycyjnych zestawach STR, w których istnieje bezpośrednia

(alleged father, mother and child), if the calculated LR is  $\leq 10\,000$ . If one or two genetic inconsistencies is detected between a child and his alleged parent(s) in a relationship case, it can be difficult to draw a conclusion. The inconsistencies might be due to mutations or, alternatively, indicate that one of the alleged parents may not be the true biological parent. When the alleged father shows incompatible genotypes at a few number of *loci*, a very high paternity index may be achieved with the remaining systems. Other ambiguous situations emerge if deficient cases families are under investigation, like in cases where instead of the alleged father we have other relatives from the paternal line to analyze, like his alleged brother, father, son or other. In the first type of cases, those with one or two allelic inconsistencies, the possibility that the alleged father is actually a close relative of the biological father (son, father or brother) can reasonably be raised. Another situation can occur if partial profiles are obtained when highly degraded DNA is analyzed for instance in identification cases arising from skeletonized remains. In all cases, when the obtained statistical evidence is considered not sufficient, one common practice is to extend the set of analyzed markers [16–18]. Lineage markers are also an option, but sometimes are also not sufficient to reach to a concluding result [19]. In some cases, when applied, rapidly mutating Y-STRs could be used to resolve paternity relatives [20]. In this context, bi-allelic markers such as SNPs, have been suggested and used, as markers of choice by many authors, as they are more stable markers with lower mutation rate than STRs. However it should be expected that, with SNPs, because of the lower mutation rate, some cases would remain ambiguous [21].

Two kinds of binary markers with nearly identical characteristics: single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertion/deletion polymorphisms (indels) have been used for forensic purposes. The indels have a better-suited typing system since it directly uses a PCR amplification followed by capillary electrophoresis detection, thus reducing tube transfers to one, using the same methodology as traditional STR kits with a direct relationship between signal strength and the DNA input. The only difference is that foren-



zależność między siłą sygnału a wejściowym DNA. Jedyna różnica polega na tym, iż w typowaniu SNP do celów sądowych metodą wydłużania starterów (SNaPshot) przeprowadzane są dwie reakcje.

W ramach kilku zespołów badawczych opracowano szereg oznaczeń typu multipleks na bazie autosomalnych SNP, przeznaczonych między innymi do analizy pochodzenia przodków [8], identyfikacji [22] oraz badań fenotypowych [23]. Na przykład w konsorcjum SNPforID ([www.snpforid.org](http://www.snpforid.org)) powstała metoda typowania SNP do identyfikacji człowieka, która umożliwia amplifikację 52 SNP z minimalnych ilości genomowego DNA [13–24]. Wszystkie *loci* SNP amplifikowano w ramach jednej reakcji PCR, a SNP analizowano przy wykorzystaniu dwóch reakcji wydłużania łańcucha o jedną zasadę (*single base extension* – SBE) oraz elektroforezy kapilarnej. Produkty reakcji SBE analizowano metodą elektroforezy kapilarnej.

Selekcji *loci* SNP do multipleksu SNPforID dokonywano na podstawie zdefiniowanych kryteriów głównych, z uwzględnieniem SNP wykazujących wysoki polimorfizm w większości populacji ludzkich (heterozygotyczność > 0,32). SNP niebędące w równowadze sprzężeń, SNP niezwiązane z funkcjami komórkowymi ani *loci* STR wykorzystywanymi powszechnie w badaniach z zakresu genetyki sądowej, a ostatecznie wszystkie SNP można było poddać amplifikacji metodą PCR w ramach pojedynczej reakcji [24]. Istnieją również doniesienia opisujące inne oznaczenia SNP, np. mikromacierze, które umożliwiają typowanie znacznie większej liczby SNP niż SNaPshot. Metody te często wymagają jednak stosowania urządzeń, które nie są dostępne w większości laboratoriów medycyny sądowej [25].

Opublikowano także kilka opracowań naukowych prezentujących wyniki symulacji z wykorzystywaniem autosomalnych SNP jako uzupełniających lub głównych markerów w badaniach pokrewieństwa [9, 21, 26, 27]. Dostępne są jednak tylko nieliczne prace opisujące przypadki analizy ojcostwa, w których obliczono wartości LR lub wskaźnika ojcostwa (PI) przed i po zastosowaniu analizowanych SNP [19, 28, 29]. W niektórych z tych doniesień badano indele należące do innej klasy SNP [30].

Niniejsza praca zawiera przegląd i porównanie wyników analiz z wykorzystaniem zestawu autosomalnych SNP jako uzupełnienia wyników uzyskanych z laboratoriów wykorzystujących tradycyjne zestawy STR w badaniach ojcostwa, w których ostateczny wynik jest niejednoznaczny ze statystycznego punktu widzenia. W analizach wykorzystywano zestaw autosomalnych SNP, uwzględ-

nic SNP typing with SNaPshot primer extension methodology employs two reactions.

Various autosomal SNP multiplexes have been developed by some working groups, for different applications: ancestry determination [8], human identification [22], and phenotypic studies [23]. The SNPforID consortium ([www.snpforid.org](http://www.snpforid.org)) developed a SNP typing assay for human identification purposes that made it possible to amplify 52 SNPs from diminutive amounts of genomic DNA [13–24]. All SNP *loci* were amplified in one PCR reaction and the SNPs were analyzed by two single base extension (SBE) reactions and capillary electrophoresis. The SBE products were analyzed by Capillary electrophoresis.

The selection of the SNP *loci* in the SNPforID multiplex, was made based on some main criteria and included SNPs with high polymorphism in most human populations (heterozygosity > 0.32): SNPs that were not in linkage disequilibrium, SNPs not associated with cellular functions or with STR *loci* commonly used in forensic genetics investigations and finally all SNPs could be amplified by PCR in one reaction [24]. There are also reports that use other SNP assays, such as microarrays, that type far more SNPs than the SNaPshot assay, but these methodologies often need other equipment's that most of the common forensic laboratories do not have [25].

There are some published scientific papers that present some simulation results concerning the use of autosomal SNPs as supplementary markers or as sole markers in kinship testing [9, 21, 26, 27]. However, there are very few reported concrete cases of paternity investigation with calculated values of LR or Paternity Indexes (PI) before and after the use of analyzed SNPs [19, 28, 29]. Besides, in some of them another class of SNPs were studied, the indels [30].

In this study, we sought to review and compare the results of employing a set of autosomal SNPs to complement the results obtained by laboratories that use routine batteries of STRs in paternity investigations where the final statistical result is ambiguous. These employed a set of autosomal SNPs in the analyzes, and included cases where the final statistical result was ambiguous, in which the hypothesis of the alleged father may be, in fact, a close relative of the biological father.

niając przypadki, w których końcowy wynik statystyczny był niejednoznaczny, a domniemanym ojcem mógł być bliski krewny ojca biologicznego. Badano również przypadki, w których SNP były wykorzystywane jako uzupełnienie rutynowego typowania STR.

## Material i metody

Przeprowadzono przegląd literatury pod kątem publikacji wykorzystujących dane pochodzące z połączonej analizy STR i SNP. Choć upłynął stosunkowo długi okres od opracowania multipleksów SNP przeznaczonych do badań identyfikacyjnych człowieka (np. 52-pleksu), dostępnych jest niewiele opracowań dotyczących zastosowań tych markerów w konkretnych przypadkach. Na potrzeby badania dokonano kompilacji i porównania opisanych w literaturze przypadków. Uwzględniono również siedem opublikowanych przypadków, które zostały przez nas przeanalizowane w ramach rutynowej praktyki [31].

W przypadku złożonej analizy siedmiu rodzin z naszej praktyki typowanie przeprowadzono pierwotnie przy wykorzystaniu konwencjonalnych markerów STR z zestawów Identifiler (AB) i PowerPlex 16 (Promega). W trzech spośród rodzin wśród analizowanych trio wykazano niezgodności w jednym lub dwóch STR ze względu na domniemaną obecność mutacji (rodzina 1 – F1, rodzina 2 – F2 i rodzina 7 – F7) wywołujących obniżenie wskaźników ojcostwa. W pozostałych analizowanych rodzinach domniemany ojciec nie był obecny, a w badaniach uwzględniono krewnych z linii ojcowskiej: domniemanego dziadka ze strony ojca oraz domniemanego wujka (rodzina 3 – F3), dwóch synów domniemanego ojca z inną matką, co do których nie zachodziły wątpliwości odnośnie ojcostwa (rodzina 4 – F4), domniemanej babki ze strony ojca (rodzina 5 – F5) oraz jednego syna domniemanego ojca, o niekwestionowanym ojcostwie (rodzina 6 – F6) (ryc. 1.).

DNA z próbek wyekstrahowano przy zastosowaniu nieznacznie zmodyfikowanej wersji metody ekstrakcji Chelex [32]. Ocenę ilościową przeprowadzono na podstawie reakcji PCR w czasie rzeczywistym, przy wykorzystaniu zestawu Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (AB) oraz aparatu ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (AB). We wszystkich analizowanych rodzinach przebadano łącznie 52 autosomalne SNP metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a następnie, zgodnie z powyższym opisem, przeprowadzono dwie nieznacznie zmodyfikowane reakcje wydłużania łańcucha

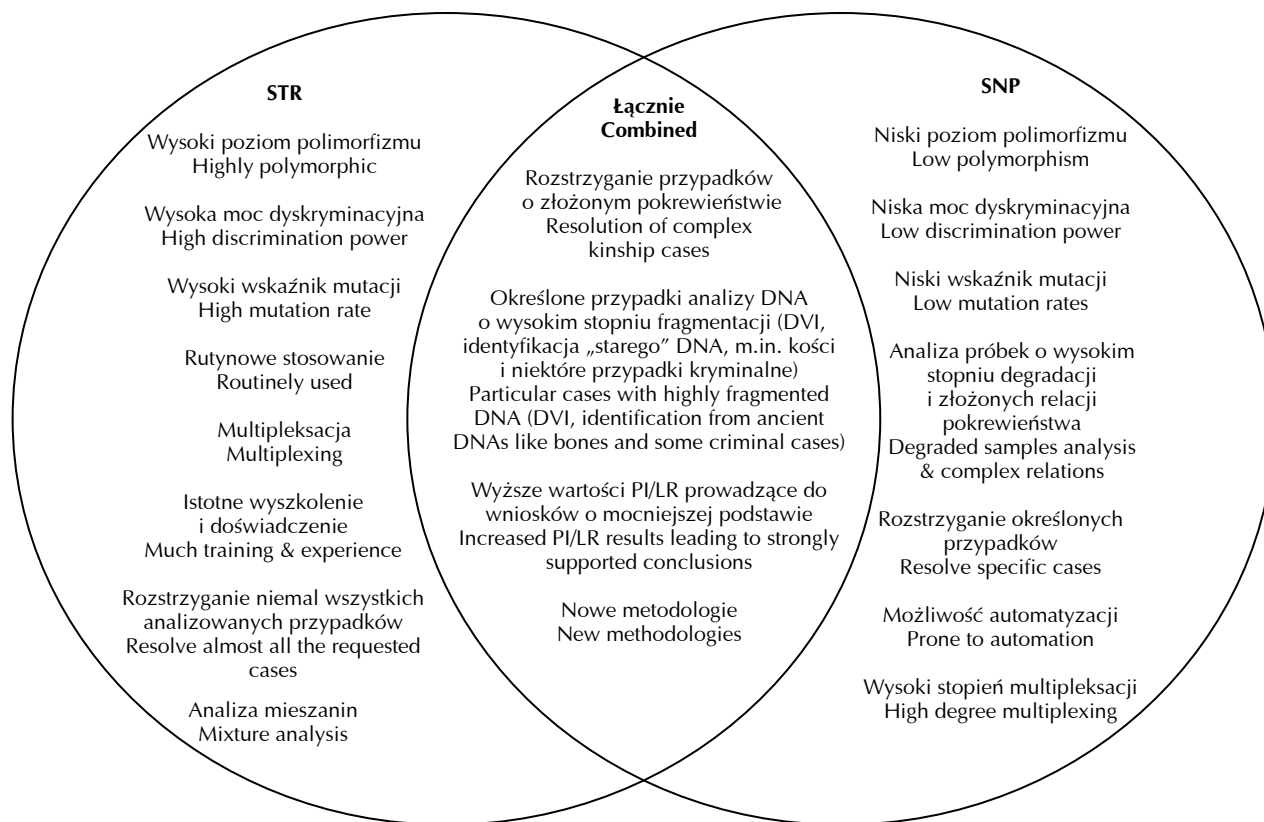
Some casework cases that included SNPs as an approach to complement routine STR typing were also analyzed.

## Material and methods

A revision of the literature concerning the use of the joined information obtained from STRs and SNPs analysis was made. Although it has been some years since the time when some SNPs multiplexes were developed for human identification purposes, as is the case of the 52-plex, there are few studies that report concrete applications of these markers to specific cases. The reported cases were resumed and compared. Seven of our routine cases already published [31] were also compiled.

The seven complex families from our casework that were already reported were first typed using conventional STR markers with the Identifiler (AB) and PowerPlex 16 (Promega) kits. The first three families concerned trios that show incompatibilities in one or two STR, due to alleged mutations (Family 1 – F1, Family 2 – F2 and Family 7 – F7) leading to reduced paternity indexes. In the other families the alleged father was absent and we disposed of other relatives from the paternal line: the alleged paternal grandfather and alleged uncle (Family 3 – F3), two undoubted sons of the alleged father with a different mother (Family 4 – F4), the alleged paternal grand-mother (Family 5 – F5) and a single undoubted son of the alleged father (Family 6 – F6) (Fig. 1).

DNA from the samples was extracted using a slightly modified version of the Chelex extraction method [32]. Quantification was achieved by real-time PCR using the Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (AB) and the ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (AB). In all these families a total of 52 autosomal SNPs were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) followed by two single base extension (SBE) reactions as previously described, with slight modifications [23] after STR typing as mentioned. SBE products separation was performed by capillary electrophoresis, using an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (AB), with 36 cm capillary arrays and POP-4 polymer (AB). Analysis was made using GeneMapper ID-X. Allele calls were made manually.



**Ryc. 1.** Charakterystyka metod bazujących na STR, SNP oraz połączenia obu metod  
**Fig. 1.** Summary of the features involving the analysis of STRs, SNPs or a combination of both

o jedną zasadę (SBE) [23] po typowaniu STR. Produkty reakcji SBE rozdzielono metodą elektroforezy kapilarnej za pomocą aparatu ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (AB), przy wykorzystaniu macierzy kapilarnych 36 cm i polimeru POP-4 (AB). Analizy wykonano przy pomocy oprogramowania GeneMapper ID-X. Typowanie alleli przeprowadzono ręcznie.

Po zastosowaniu 52-pleksu SNP obliczono wskaźniki ojcostwa (PI) przy użyciu oprogramowania Familias [33], biorąc pod uwagę informacje o STR oraz 52 SNP jako odrębnych oznaczeń oraz łącząc wyniki obu oznaczeń w jeden profil genetyczny przy wykorzystaniu dostępnych w literaturze częstotliwości tych markerów w próbce populacji z północnej Portugalii [34], przy założeniu niezależności wszystkich markerów.

Analizując polimorfizmy DNA, ściśle przestrzegano rekomendacji Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG) w zakresie zalecanej nomenklatury i wytycznych odnośnie do kontroli jakości i obliczeń statystycznych [10].

After applying the 52plex SNP assay, calculations of paternity indexes (PI) were made using the software Familias [33] considering the information of STRs and of the 52 SNPs as stand-alone assays, and joining the two assays on a single genetic profile, using the previous published frequencies for those markers in a population sample of the North of Portugal [34], assuming that all the markers are independent.

The recommendations of the International Society of Forensic Genetics (ISFG) on the analysis of DNA polymorphisms were strictly followed which included the use of recommended nomenclature and guidelines regarding quality control and statistical calculations [10].

## Results

A review of the literature that presents a number of concrete examples of joining the information

## Wyniki

Publikacje opisujące konkretne przykłady łącznego wykorzystywania danych pochodzących z analizy STR i SNP zestawiono w tabeli I. W 47,3% analizowanych przypadków (9 na 19) wartość PI uzyskana wyłącznie na podstawie analizy markerów SNP była zbliżona do wartości bazującej wyłącznie na STR – bądź od niej wyższa. W każdym z opisanych przypadków wartość PI uzyskana tylko na podstawie markerów SNP była zbliżona lub wyższa od wartości obliczonej na podstawie wyłącznie STR, w zależności od liczby dodatkowych SNP w odniesieniu do liczby STR oraz ich ogólnej heterozygotyczności. Nawet uwzględniając nieliczne przypadki zestawione w tabeli I, istnieją sytuacje, w których multiplex SNP dostarcza mniej informacji niż multiplexy STR. Wniosek ten sygnalizowały już niektóre wcześniejsze badania symulacyjne [21, 26]. Część autorów przeprowadziła również symulacje w przypadkach, w których badana relacja jest odległa o kilka stopni, obejmując kilka pokoleń i gałęzi, w celu ustalenia dla identyfikowanych w parach powiązań określonych wartości granicznych, po których przekroczeniu analiza STR uzupełniona o jednakową liczbę dodatkowych STR i/lub dwukrotnie większą liczbę SNP w istotnej większości przypadków nie pozwoli na zadowalające rozstrzygnięcie analizowanej sytuacji. Niezbędne jest wówczas uzyskanie dodatkowych danych genetycznych od badanych osób [35].

Wartości PI osiągnięte po uzyskaniu dodatkowych informacji z różnych zestawów markerów SNP wykorzystywanych w różnych laboratoriach były jednak bardzo przydatne we wszystkich analizowanych przypadkach (tab. I). Można zatem jednoznacznie stwierdzić, że dodatkowe wykorzystanie SNP może zwiększać poziom ufności przy interpretacji wyników w wielu trudnych przypadkach dotyczących pokrewieństwa, które analizowano początkowo przy użyciu rozszerzonego badania STR lub typowania MiniSTR albo Y-STR [36]. Jest to szczególnie istotne w przypadkach dotyczących rodzicielstwa lub identyfikacji osoby, w których analizowane są kompleksowe próbki DNA pozyskiwanego z kości i zębów.

Na szczególną uwagę zasługują przypadki wskazujące jedną lub dwie mutacje jednoetapowe na przestrzeni pokoleń, w których zastosowanie typowania SNP przy zignorowaniu danych STR zwiększyło wartość PI o co najmniej dwa rzędy wielkości. Może wynikać to z tego, iż multiplex wykorzysta-

from STRs and SNPs is shown in Table I. In 47,3% (9 in 19) of the total number of analyzed cases, the PI value obtained only with the SNP markers was similar or higher than the obtained with STRs alone. In each reported case, the obtained PI value based only in the information taken from the SNP markers was similar or higher than the obtained with STRs alone, depending on the number of additional SNPs compared with the number of STRs and their overall heterozygosity. Even with the few cases presented in Table 1, there are situations where the SNP multiplex is less informative than the STR multiplexes. In some previous simulation studies this conclusion was already predicted [21, 26]. Some authors also have made simulations in cases where the examined relationship is distanced by several degrees of separation across multiple generations and pedigree branches in order to find the limits of pairwise relatedness beyond which STRs supplemented by an equal number of supplementary STRs and/or twice as many SNPs will not resolve the claim satisfactorily in a significant proportion of cases. In these cases much more genetic information must be obtained from the tested individuals [35].

However, the PI values obtained after the additional information from the diverse sets of SNP markers, used by the different laboratories, in all the analyzed cases (Table I) was very useful. This clearly illustrates that the addition of SNPs can help to reach a higher degree of confidence in the interpretation of many challenging relationship tests that were first processed using extended STR and, in some cases MiniSTR or Y-STR typing [36]. This is particularly important in parentage or identification cases that involve the analysis of complex DNA samples extracted from bones and teeth.

Special attention is given to cases that display one or two single-step mutations across generations on which the application of SNP typing, ignoring STR data, increased the PI by at least two magnitude orders. This is may be due to the fact that the applied SNP typing multiplex, the SNPforID-52plex, provides a higher statistical power on European populations than the 15 to 16 human identity STRs contained on the frequent employed amplification kits [25]. Moreover, it is highly unlikely that any parent-to-child mutation would be spotted since the mutation rate of SNPs is on aver-



**Tabela I.** Wykaz przypadków opisanych w pracach objętych przeglądem, w których autosomalne SNP wykorzystywano jako markery uzupełniające typowanie STR

**Table I.** Resume of the casework reported in the reviewed literature where it was used the autosomal SNPs as supplementary markers to STR typing

| Opublikowane przypadki<br>Reported cases   | Wskaźnik ojcostwa (PI)<br>Paternity index (PI) |                             |                             |
|--|--|-----------------------------|-----------------------------|
|  | 18 STR   | 43 SNP                      | Łącznie<br>Combined         |
| <b>Břrsting i wsp. (2012) [9]</b><br><b>Břrsting et al. (2012) [9]</b>   |  |                             |                             |
| 2 domniemanych ojców<br>2 alleged fathers  |  |                             |                             |
| LR = P(EIH1) / P(EIH2)†<br>†H1: AF1 jest ojcem. H2: AF2 jest ojcem.<br>LR = P(EIH1) / P(EIH2)†<br>†H1: AF1 is the father. H2: AF2 is the father.                                     | 2,90E+03                                       | 2,80E+9                     | 7,80E+12                    |
| <b>Philips i wsp. (2012) [35]</b><br><b>Philips et al. (2012) [35]</b>   | <b>21 STR</b>                                  |                             | <b>Łącznie<br/>Combined</b> |
| LR = P(EIH1) / P(EIH2)†<br>†H1: Wujek jest ojcem. H2: Osoba niespokrewniona jest ojcem.<br>LR = P(EIH1) / P(EIH2)†<br>†H1: The Uncle is the father. H2: Unrelated is the father.     | 4.63E+04                                       | *                           | 4.04+E07                    |
| LR = P(EIH1) / P(EIH2)†<br>†H1: Zmarły jest ojcem. H2: Osoba niespokrewniona jest ojcem.<br>LR = P(EIH1) / P(EIH2)†<br>†H1: The Deceased is the father. H2: Unrelated is the father. | 1,12+E07                                       | *                           | 3,53E+08                    |
| Trio z dwiema niezgodnościami (CSF1PO + D19S433)<br>Trio with two incompatibilities (CSF1PO + D19S433)   | 2,03E+05                                       | *                           | 1,89E+10                    |
| <b>Schwark i wsp. (2012) [29]</b><br><b>Schwark et al. (2012) [29]</b>   | <b>17 STR</b>                                  | <b>50 SNP</b>               |                             |
| P.Trio 1 – brak mutacji<br>P.Trio 1 – no mutations   | 1,53 E+08                                      | 2,14E+07                    | *                           |
| P.Trio 2 – brak mutacji<br>P.Trio 2 – no mutations   | 7,32E+07                                       | 1,41E+05                    | *                           |
| P.Trio 3 – brak mutacji<br>P.Trio 3 – no mutations   | 5,13E+07                                       | 2,35E+06                    | *                           |
| P.Trio 4 – 2-etapowa mutacja ojcowska (D2S1338)<br>P.Trio 4 – 2-step paternal mutation (D2S1338)   | 2,22 E+03                                      | 1,10 E+06                   | *                           |
| P.Trio 5 – 1-etapowa mutacja ojcowska (FGA)<br>P.Trio 5 – 1-step paternal mutation (FGA)   | 8,71E+04                                       | 1,65E+08                    | *                           |
| P.Trio 6 – dwie 1-etapowe mutacje ojcowskie (vWA+PentaD)<br>P.Trio 6 – two 1-step paternal mutations (vWA+PentaD)  | 3,22E+01                                       | 6,32 E+08                   | *                           |
| <b>Ibarra i wsp. (2013) [36]</b><br><b>Ibarra et al. (2013) [36]</b>   | <b>STR + MiniSTR</b>                           | <b>52-pleks<br/>52-plex</b> | <b>Łącznie<br/>Combined</b> |
| Przypadek 1. (U + C + M)<br>Case 1 (U + C + M)   | 9,98E+02                                       | 1,02E+01                    | 1,02E+04                    |

Tabela I. Cd.

Table I. Cont.

| Opublikowane przypadki<br>Reported cases   | Wskaźnik ojcostwa (PI)<br>Paternity index (PI) |                            |                             |
|--|--|----------------------------|-----------------------------|
|  | Przypadek 2. (B + C + M)<br>Case 2 (B + C + M) | 1,64E+03                   | 9,53E+01                    |
| Przypadek 3. (Kość + C + M)<br>Case 3 (Bone + C + M)   | 8,77E+01                                       | 1,22E+06                   | 1,07E+08                    |
| Przypadek 4. (Kość + C + M)<br>Case 4 (Bone + C + M)   | brak wyników                                   | 1,11E+04                   | 1,11E+04                    |
| <b>Lindner i wsp. (2014) [19]</b><br><b>Lindner et al. (2014) [19]</b>   | <b>23STR+16Y-STR</b>                           | <b>50 SNP</b>              |                             |
| Domniemany ojciec<br>STR: 2 niezgodności<br>Y-STR: 1 niezgodność<br>SNP: 0 niezgodności<br>Putative father<br>STRs: 2 mismatches<br>Y-STRs: 1 mismatch<br>SNPs: 0 mismatch | 7,15E+06                                       | 6,32E+08                   | *                           |
| <b>Nasze złożone przypadki [31]</b><br><b>Our complex cases [31]</b>   | <b>18 STR</b>                                  | <b>52-plex<br/>52-plex</b> | <b>łącznie<br/>Combined</b> |
| F1 (1Mut D2S1338)  | 2,00E+03                                       | 1,29E+02                   | 2,84E+05                    |
| F2 (2Mut FGA i SE33)   | 2,96E+03                                       | 1,18E+01                   | 3,50E+04                    |
| F3 (GF + 2U + C + M)   | 1,19E+03                                       | 4,12E+00                   | 4,92E+03                    |
| F4 (2S(M1) + C(M2))  | 2,41E+02                                       | 7,31E+00                   | 1,76E+03                    |
| F5 (GM + C + M)  | 1,55E+02                                       | 9,43E+02                   | 1,46E+06                    |
| F6 (B + C + M)   | 3,87E+03                                       | 1,76E+01                   | 681E+04                     |
| F7 (1Mut D16S539)  | 6,13E+03                                       | 9,71E+05                   | 5,96E+09                    |

GF – domniemany dziadek ze strony ojca; U – domniemany(-a) wujek/ciotka po stronie ojca; B – domniemany brat; C – dziecko; M – matka; S – syn domniemanego ojca; GM – domniemana babcia ze strony ojca; Mut – niezgodność przeniesienia STR

\* brak danych

GF – Alleged Paternal Grand-father; U – Alleged Paternal Uncle/Aunt; B – Alleged Brother; C – Child; M – Mother; S – Son of the alleged father; GM – Alleged Paternal Grand-Mother; Mut – Inconsistency in STR transmission

\* no available data

ny do typowania SNP (SNPforID-52plex) zapewnia wyższą moc statystyczną w populacjach europejskich niż 15–16 STR umożliwiających identyfikację człowieka, które są zawarte w często wykorzystywanych zestawach do amplifikacji [25]. Za wysoce nieprawdopodobne należy uznać wykrycie mutacji w linii rodzic–dziecko, ponieważ tempo mutacji SNP jest średnio o 5 rzędów wielkości niższe niż STR [13]. Dodatkowo we wszystkich przypadkach uzyskane wartości PI – wyższe dzięki połączonej analizie STR/SNP – dostarczyły wiarygodnego potwierdzenia hipotezy o ojcostwie. Wyniki takie były zgodne z przewidywaniami, ponieważ oprócz wyjątkowo niskiego tempa

age five magnitude orders lower than STRs' [13]. Additionally, in all these cases, the combined STR/SNP increased PI results lead to a strongly supported hypothesis of paternity. These results were expected, since besides SNPs show extremely low mutation rates, these methodologies accomplish the multiplexing of a great number of markers. Moreover, these markers have been selected to cover all chromosomes amply distributed across the genome in order to ensure finding recombination-born differences even among members of complex inbred pedigrees [10]. Even with the new developed kits like the GlobalFiler kit (AB), case-

mutacji SNP metodologie te umożliwiają analizę typu multipleks obejmującą dużą liczbę markerów. Markery te zostały dobrane w taki sposób, aby uwzględnić wszystkie chromosomy o wysokim rozkładzie w obrębie genomu w celu identyfikacji różnic powstałych na skutek rekombinacji nawet wśród członków złożonych układów pokrewieństwa o wysokim inbredzie [10]. Skomplikowane przypadki, w których można stosować alternatywne markery SNP, zdarzają się nawet wtedy, gdy stosuje się nowo opracowane zestawy badawcze, np. GlobalFiler *kit* (AB), ponieważ markery ujęte w takich nowych zestawach analizowano już w niektórych poprzednio opublikowanych przypadkach [19].

## Dyskusja i wnioski

W medycynie sądowej, a zwłaszcza w genetyce sądowej, powszechne jest ustalanie rodzicielstwa na podstawie testów z udziałem bliskich krewnych rzeczywistego ojca biologicznego. W niniejszej pracy uwzględniono jeden przypadek, w którym testami w kierunku domniemanego ojcostwa objęto brata faktycznego ojca. Złożone badania rodzicielstwa tego typu zawsze wiążą się ze zwiększonym ryzykiem błędnego potwierdzenia ojcostwa. W jednym z pierwszych opublikowanych badań brazylijskich [37] przeanalizowano przypadki wykluczenia ojcostwa przy wykorzystaniu zestawu 40 autosomalnych SNP. We wszystkich przypadkach poza jednym stwierdzono dodatkowe niespójności w markerach bi-allelicznych, zgodne z wcześniejszymi wynikami. Tylko w analizowanym trio 2 spośród 20 autosomalnych STR miały charakter wykluczający i nie stwierdzono niezgodności w żadnym z *loci* panelu SNPforID. Z opublikowanych rezultatów (tab. I) wynika, że w wielu spośród badanych złożonych przypadków, w których stwierdza się jeden lub dwa markery wykluczające, można podwyższyć obliczone wskaźniki PI, analizując SNP. W symulowanych porównaniach przy użyciu 52-pleksu SNPforID uzyskano również 2 fałszywe wyniki dopuszczające ojcostwo [27].

Inny rodzaj złożonych testów na ustalenie rodzicielstwa dotyczy przypadków, w których ojciec nie żyje, a analizie poddawany jest domniemany wujek ze strony ojca, dziadek/babka bądź rodzeństwo pełne lub przyrodnie. W drugim rodzaju przypadków analiza STR często daje niskie wartości PI. Jak wynika z zestawionych w tabeli I sześciu badań przeprowadzonych przez różne zespoły badawcze, informacje uzyskane dzięki SNP stanowią skuteczny sposób na podwyższenie uzyskanego

work with challenging results, where alternative SNP markers can be used, tend to happen, because the markers included in these new *kits* were already analyzed in some of the previous reported cases [19].

## Discussion and conclusions

In forensic medicine, namely in forensic genetics, it is common to deal with parentage testing in the presence of close relatives of the true biological father. In this work one case where the brother of the true father was tested as the AF is reviewed. These complex paternity investigations have always represented an increased risk of reporting false inclusions of paternity. In one of the first reported studies by a Brazilian group [37], cases of paternity exclusions were analyzed with a set of 40 autosomal SNPs. In all cases, except one, there were found to be additional inconsistencies in these bi-allelic markers, supporting the previous results. Only in a trio, 2 out of 20 autosomal STR were exclusionary, none of the SNPforID panel *loci* were inconsistent. As it can be observed in the reported results (Table I), many of these complex cases where one or two exclusionary markers are observed, are studied and the respective PI calculations can be incremented by SNP analysis. An experience with the SNPforID 52-plex has also revealed two false inclusions of paternity in simulated comparisons [27].

Another type of complex parentage testing are the cases where the father is already deceased, their relatives are analyzed, as an alleged paternal uncle, a grand-father/mother or a full or half siblings. In these second type of cases, is frequent to reach low PI values after STR are analyzed. As can be seen by the six reported studies by various working groups presented in Table I, the SNPs information represents a good approach to increase the previously obtained PI, at least for some cases [21].

The last class of cases that often result in low LR or PI are those that involve the analysis of degraded materials which leads to incomplete STR profiles. These are very frequent in the identification of very decomposed or skeletonized human remains. Some of these cases are reported in the literature, where SNPs are very useful to comple-

inną metodą wskaźnika PI, przynajmniej w niektórych analizach [21].

Ostatnią grupę przypadków, w których często uzyskuje się niskie wartości LR lub PI, stanowią analizy materiałów o wysokim stopniu degradacji, skutkujące opracowaniem niekompletnych profili STR. To zjawisko występujące bardzo często przy identyfikacji silnie rozłożonych lub zeszkieletowanych szczątków ludzkich. W niektórych przypadkach opisanych w literaturze SNP okazały się przydatne jako uzupełnienie innych danych w zależności od źródła analizowanych próbek DNA oraz stopnia degradacji/zanieczyszczenia materiału [9, 11].

Ponieważ markery te są mniej podatne na mutacje, są bardzo przydatne przy ustalaniu rodzicielstwa pomimo niewielkiej liczby analizowanych przypadków opisanych w literaturze. Wniosek ten potwierdzają badania symulacyjne. W związku z niższym tempem mutacji niejednokrotnie zdarza się, iż wyniki uzyskane wyłącznie na podstawie SNP są niższe od wyników analizy STR [27].

Badania z wykorzystaniem SNP mają jeszcze jedną zaletę. Wprawdzie są pracochłonne, jednak można je automatyzować, np. stosując platformy do pipetowania. Analizę autosomalnych SNP można także przeprowadzić przy użyciu metodologii SNaPshot. Uzyskane znakowane fluorescencyjnie fragmenty rozdzielane są metodą elektroforezy kapilarnej. Te metody analityczne są bardzo proste we wdrożeniu w większości funkcjonujących laboratoriów genetyki sądowej na świecie, ponieważ większość placówek jest wyposażona w automatyczne sekwencery. Metody te wydają się korzystne także ze względu na niższy ogólny koszt analizy w przeliczeniu na badaną próbkę.

Podsumowując, należy stwierdzić, że pomimo potencjalnych trudności, jakie mogą występować w niektórych analizowanych przypadkach (zwłaszcza jeśli informacje uzyskane na podstawie analizy SNP są niepełne), SNP są bardzo przydatnym uzupełnieniem STR jako markerów identyfikacji i pokrewieństwa genetycznego. Liczbę *loci* SNP wykorzystywanych do badań oraz dobór SNP można optymalizować w miarę wzrostu dostępności danych populacyjnych. Przykładowo, niektóre z markerów zawartych w opracowanym przez konsorcjum SNPforID SNP-pleksie obejmującym 52 autosomalne SNP mogą nie być niezależne. *Loci* te mogą być również przydatne jako uzupełnienie *loci* STR w tych przypadkach z zakresu medycyny sądowej, w których uzyskiwane są niskie wartości LR (jak pokazano na ryc. 1.). Kilku badaczy korzystało również z innych markerów, m.in. liniowych,

ment sole information, depending on the source of the analyzed DNAs and on the degree of their degradation/contamination [9, 11].

The fact that these markers are less prone to mutation makes them very useful in parentage testing despite the reduced number of concretely analyzed and reported cases in the literature. This has also been predicted by simulation studies. As a result of this lower mutation rate it can also be seen that the information that results from SNPs alone, sometimes is lower than those obtained from STR analysis [27].

Other advantages of studying SNPs may include the fact that their analysis, despite being laborious, is prone to automation, with the possibility of using pipetting platforms. Also the analysis of autosomal SNPs can be achieved by the application of a SNaPshot methodology, followed by capillary electrophoresis (CE) separation of the resulting fluorescent labeled fragments. These analysis methodologies are very easy to implement in most of the existing Forensic Genetic laboratories around the world almost all of them equipped with automated sequencers. Furthermore, these strategies are also attractive due to the associated reduced overall cost per analyzed sample.

In conclusion, despite there being some difficulties that can arise in some cases, especially if the information after the study of SNPs is still not enough, we believe that SNPs are very useful to complement STRs as markers of human identification and genetic relatedness. The number of SNP loci used for testing and the selected SNPs can be improved as more population data becomes available. For instance, some of the markers included in the developed autosomal 52 SNP-plex by the SNPforID Consortium, may not be independent. These loci can also usefully supplement the use of STR *loci* in forensic casework that sometimes leads to low LR values as summarized in Fig. 1. Furthermore, other markers have been used by several authors, including lineage markers that may be considered as more prone to the real mutation rate as it is the case of the Y chromosome associated markers [38–40].

Additionally, as some authors are beginning to report, with some degree of investment, new



które jednak można uznać za bardziej podatne na mutacje, podobnie jak markery powiązane z chromosomem Y [38–40].

Jak wskazują niektóre nowe doniesienia, rozwój tej dziedziny przełoży się na opracowanie nowych strategii badawczych umożliwiających analizowanie większych zestawów markerów biallelicznych. Najnowsza metodologia badań, znana jako sekwencjonowanie nowej generacji, dzięki wykorzystaniu zaawansowanych urządzeń obliczeniowych do analizy danych, umożliwi inne zastosowania w dziedzinie genetyki sądowej, np. analizę DNA mitochondrialnego. Badania tego typu są wprawdzie wykonywane od początku lat 90. XX wieku, jednak można oczekiwać przyspieszenia i usprawnienia integracji wyników oraz nowych zastosowań medyczno-sądowych np. w badaniach przypadków nagłych zgonów [41, 42].

approaches that will permit us to analyze greater sets of these bi-allelic markers. This new methodology, the next generation sequencing (NGS), with the help of advanced computational devices for the analysis of the produced data, will permit other applications in Forensic Genetics like mitochondrial DNA analysis, that is used since the early 1990s, but that will be faster and easier to integrate the results, and even in other Medico Legal areas like sudden death among other interesting uses [41, 42].

*The authors declare no conflict of interest.*

*Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.*

## Piśmiennictwo

### References

1. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 179-192.
2. Nelson MR, Marnellos G, Kammerer S, Hoyal CR, Shi MM, Cantor CR, Braun A. Large-Scale Validation of Single Nucleotide Polymorphisms in Gene Regions. *Genome Res* 2004; 14: 1664-1668.
3. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; 467: 1061-1073.
4. Qin P, Li Z, Jin W, Lu D, Lou H, Shen J, Jin L, Shi Y, Xu S. A panel of ancestry informative markers to estimate and correct potential effects of population stratification in Han Chinese. *Eur J Hum Genet* 2013; 22: 248-253.
5. Kryukov GV, Pennacchio LA, Sunyaev SR. Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 727-739.
6. Shastry BS. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J Hum Genet* 2007; 52: 871-80.
7. Pulker H, Lareu MV, Phillips C, Carracedo A. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. *Forensic Science International: Genetics* 2007; 1: 100-104.
8. Kidd JR, Friedlaender FR, Speed WC, Pakstis AJ, De La Vega FM, Kidd KK. Analyses of a set of 128 ancestry informative single-nucleotide polymorphisms in a global set of 119 population samples. *Investigative Genetics* 2011; 2: 1 (doi:10.1186/2041-2223-2-1).
9. Børsting C, Mikkelsen M, Morling N. Kinship Analysis with Diallelic SNPs – Experiences with the SNPforID Multiplex in an ISO17025 Accredited Laboratory. *Transfus Med Hemother* 2012; 39: 195-201.
10. Phillips C, Fondevila M, Garcia-Magarinos M, Rodriguez A, Salas A, et al. Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Sci Int Genet* 2008; 2: 198-204.
11. Fondevila M, Phillips C, Naveran N, Fernandez L, Salas A, Carracedo A, Laréu MV. Case report: Identification of skeletal remains using short-amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur. *Forensic Sci Int Genet* 2008; 2: 212-218.
12. Børsting C, Mogensen HS, Morling N. Forensic genetic SNP typing of low-template DNA and highly degraded DNA from crime case samples. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 345-352.
13. Schneider PM. Beyond STRs: The Role of Diallelic Markers in Forensic Genetics. *Transfus Med Hemother* 2012; 39: 176-180.
14. The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491: 56-65.



15. Choudhury A, Hazelhurst S, Meintjes A, Achinike-Oduaran O, Aron S, Gamielien J, Sefid Dashti MJ, Mulder N, Tiffin N, Ramsay M. Population-specific common SNPs reflect demographic histories and highlight regions of genomic plasticity with functional relevance. *BMC Genomics* 2014; 15: 437.
16. Borsting C, Morling N. Mutations and/or close relatives? Six casework examples where 49 autosomal SNPs were used as supplementary markers. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 5: 236-241.
17. Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmao L. Insertion/deletion polymorphisms: a multiplex assay and forensic applications. *Forensic Sci Int Genet Suppl Series* 2009; 2: 513-515.
18. Phillips C, Fondevila M, Garcia-Magarinos M, Rodriguez A, Salas A, Carracedo A, Lareu MV. Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Sci Int Genet* 2008; 2: 198-204.
19. Lindner I, von Wurmb-Schwark N, Meier P, Fimmers R, Büttner Andreas. Usefulness of SNPs as Supplementary Markers in a Paternity Case with 3 Genetic Incompatibilities at Autosomal and Y Chromosomal Loci. *Transfus Med Hemother* 2014; 41: 117-121.
20. Ballantyne KN, Keerl V, Wollstein A, Choi Y, Zuniga SB, Ralf A, Vermeulen M, de Knijff P, Kayser M. A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 208-218.
21. Amorim A, Pereira L. Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Sci Int* 2005; 150: 17-21.
22. Boonyarit H, Mahasirimongkol S, Chavalvechakul N, Aoki M, Amitani H, Hosono N, Kamatani N, Kubo M, Lertrit P. Development of a SNP set for human identification: A set with high powers of discrimination which yields high genetic information from naturally degraded DNA samples in the Thai population. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: 166-173.
23. Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, Wolańska-Nowak P, Wojas-Pelc A. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci* 2007; 52: 349-354.
24. Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevilla M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 2006; 27: 1713-1724.
25. Krjutskov K, Viltrop T, Palta P, Metspalu E, Tamm E, Suvi S, Sak K, Merilo A, Sork H, Teek R, Nikopensus T, Kivisild T, Metspalu A. Evaluation of the 124-plex SNP typing microarray for forensic testing. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 4: 43-48.
26. Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: Implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* 1999; 20: 1682-1696.
27. Børsting C, Sanchez JJ, Hansen HE, Hansen AJ, Bruun HQ, Morling N. Performance of the SNPforID 52 SNP-plex assay in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet* 2008; 2: 292-300.
28. Pinto N, Magalhães M, Conde-Sousa E, Gomes C, Pereira R, Alves C, Gusmao L, Amorim A. Assessing paternities with inconclusive STR results: The suitability of bi-allelic markers. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 16-21.
29. Schwark T, Meyer P, Harder M, Modrow JH, von Wurmb-Schwark N. The SNPforID Assay as a Supplementary Method in Kinship and Trace Analysis. *Transfus Med Hemother* 2012; 39: 187-193.
30. Magalhães M, Pinto N, Gomes C, Pereira R, Amorim A, Alves C, Gusmao L. When the alleged father is a close relative of the real father: The utility of insertion/deletion polymorphisms. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2011; 3: e9-e10.
31. Pontes ML, Fondevila M, Laréu MV, Medeiros R. SNP Markers as Additional Information to Resolve Complex Kinship Cases. *Transfus Med Hemother* 2015; 42: 385-388.
32. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: CHELEX® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10: 506-513.
33. Egeland T, Mostad PF, Mevag B, Stenersen M: Beyond traditional paternity and identification cases: selecting the most probable pedigree. *Forensic Sci Int* 2000; 110: 47-59.
34. Pontes ML, Pinheiro MF: Autosomal SNPs study of a population sample from North of Portugal and a sample of immigrants from the Eastern Europe living in Portugal. *Legal Medicine* 2014; 16: 118-120.
35. Phillips C, Garcia-Magariños M, Salas A, Carracedo A, Lareu MV. SNPs as Supplements in Simple Kinship Analysis or as Core Markers in Distant Pairwise Relationship Tests: When Do SNPs Add Value or Replace Well-Established and Powerful STR Tests? *Transfus Med Hemother* 2012; 39: 202-210.
36. Ibarra A, Martinez M, Freire-Aradas A, Fondevila M, Carracedo A, Porras L, Gusmao L. Using STR, MiniSTR and SNP markers to solve complex cases of kinship analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2013; 4: e91-e92.
37. Whittle MR, Favaro EC, Sumita DR. Paternity investigation experience with a 40 autosomal SNP panel. *Forensic Sci Int Genet Suppl* 2009; 2: 149-150.
38. Gomes C, Magalhaes M, Alves C, Amorim A, Pinto N, Gusmao L. Comparative evaluation of alternative batteries of genetic markers to complement autosomal STRs in kinship investigations: autosomal indels vs. X-chromosome STRs. *Int J Legal Med* 2012; 126: 5.
39. Sánchez-Diz P, Alves C, Carvalho E, Carvalho M, Espinheira R, García O, Pinheiro MF, Pontes L, Porto MJ, Santapa O, Silva C, Sumita D, Valente S, Whittle M, Yurrebaso I, Carracedo A, Amorim A, Gusmao L; GEP-ISFG (The Spanish and Portuguese

- Working Group of the International Society for Forensic Genetics): Population and segregation data on 17 Y-STRs: results of a GEP-ISFG collaborative study. *Int J Legal Med* 2008; 12: 529-533.
40. Carvalho R, Pinheiro MF, Medeiros R. Localization of candidate genes in a region of high frequency of microvariant alleles for prostate cancer susceptibility: the chromosome region Yp11.2 genetic variation. *DNA Cell Biol* 2010; 29: 3-7.
41. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2014; 12: 190-197.
42. Mingkun Li, Schönberg A, Schaefer M, Schroeder R, Nasidze I, Stoneking M. Detecting Heteroplasmy from High-Throughput Sequencing of Complete Human Mitochondrial DNA Genomes. *Am J Hum Genet* 2010; 87: 237-249.

**Adres do korespondencji**

Lurdes Pontes  
National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, IP,  
North Delegation  
Jardim Carrilho Videira  
4050-167 Porto, Portugal  
e-mail: mlurdes.pontesrebelo@gmail.com

**Address for correspondence**

Lurdes Pontes  
National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, IP,  
North Delegation  
Jardim Carrilho Videira  
4050-167 Porto, Portugal  
e-mail: mlurdes.pontesrebelo@gmail.com

