

RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.
znalec z oboru Kriminalistika, specializace forenzní biologie a genetika

Forenzní DNA servis, s.r.o., Budínova 2, 180 81 Praha 8, DIČ: CZ27227529
Tel/fax: 233 931 123, Mobil: 603 979 915, e-mail: daniel.vanek@DNA.com.cz

Naše č.j.: ZP-037-2015

V Praze dne 7.12.2015
Přílohy: 2
Výtisk č.:

Zadavatel:

Mgr. Robert Cholenský, Ph.D.

**Bolzanova 461/5
618 00 Brno**

Znalecký posudek

z oboru Kriminalistika, specializace forenzní biologie a genetika

Popis:

Požadavkem ze dne 2.10.2015 a doplněním ze dne 10.10.2015 byl níže uvedený znalec přibrán, aby zodpověděl níže uvedené otázky k věci odsouzeného Vlastimila Pechance, nar. 9. 11. 1979, pro účely projednání návrhu na povolení obnovy jeho trestního řízení vedeného Krajským soudem v Hradci Králové pod sp. zn. 6 T 1/2002.

Otázky na znalce (požadavek ze dne 2.10.2015)

1. *Využil Ústav při svém zkoumání všech method a přístrojů, které jsou v současné době dostupné, včetně takových, které jsou k dispozici pouze v zahraničních laboratořích?*
2. *Zejména: Bylo by možné, případně ve spolupráci s externími pracovišti, provést důkladnější analysu biologického materiálu ze stěrů, v nichž Ústav identifikoval pouze směs DNA různých osob, a dosáhnout separace genetické informace na úroveň profilů DNA jednotlivých osob?*
3. *Bylo by možné individualisovat DNA ze zjištěných částic krve?*
4. *Které další postupy měl podle Vašeho odborného názoru Ústav při zpracování posudku použít a jaké výsledky relevantní pro účely předmětného trestního řízení by mohly přinést?*

5. *Je stopa – kapesní zavírací nůž – využitelná pro další znalecké zkoumání? Jaké analýsy by bylo možné a účelné provést?*
6. *Je tímto způsobem využitelný biologický materiál získaný a zpracovaný Ústavem?*
7. *Co dalšího případně pokládá znalec za potřebné k věci uvést?*

Otázky na znalce (požadavek ze dne 10.10.2015)

1a. Uved'te konkrétně, které další podklady by měl Ústav ke svému posudku doložit, tak abyste byl schopen svůj znalecký posudek v objednaném rozsahu dokončit.

2a. Vyjádřete se k tomu, co zástupce Ústavu uvedl při svém výsledku, tj. že některé Ústavem aplikované postupy představují chráněné know-how, s nímž by se neměl nikdo nepovolaný seznámit.

3a. Která pracoviště v České republice jsou schopna laboratorně realizovat metodu Massive Parallel Sequencing a jaké výsledky lze od této metody očekávat? Dá se předpokládat dosažení separace těch směsí DNA, které Kriminalistický ústav Praha nebyl schopen rozdělit? Byla by tato metoda přínosem i z hlediska kvantifikace, tj. stanovení, jaké množství genetického materiálu jednotlivých donorů bylo na daném místě stopy – v daném stěru – zjištěno?

4a. Jaké jsou možnosti spolupráce českých orgánů činných v trestním řízení se zahraničními forensními laboratořemi a ústavy? Bylo by podle Vašeho názoru, zejména ve světle toho, jak analýsu stopy provedl Kriminalistický ústav Praha, účelné, aby soud objednal další znalecké zkoumání v zahraničí?

NÁLEZ – ZODPOVĚZENÍ OTÁZEK

1. *Využil Ústav při svém zkoumání všech method a přístrojů, které jsou v současné době dostupné, včetně takových, které jsou k dispozici pouze v zahraničních laboratořích?*

V současnosti jsou již některými forenzními DNA laboratořemi používány moderní metody, jako je například Masivní paralelní sekvenování, někdy označované i jako sekvenování další generace (Next generation sequencing). V rámci případu ale nebyly v plné šíři využity ani metody standardní. Analýza Y-chromozómu byla provedena pouze u jednoho vzorku a analýza mitochondriální DNA nebyla provedena vůbec.

2. *Zejména: Bylo by možné, případně ve spolupráci s externími pracovišti, provést důkladnější analysu biologického materiálu ze stěrů, v nichž Ústav identifikoval pouze směs DNA různých osob, a dosáhnout separace genetické informace na úroveň profilů DNA jednotlivých osob?*

Ano, například při použití metod Masivního paralelního sekvenování (dále jen MPS) by bylo možné získat informaci o jednotlivých donorech zkoumaného smíšeného biologického materiálu.

3. *Bylo by možné individualisovat DNA ze zjištěných částic krve?*

Ano, při použití metody MPS je za splnění určitých požadavků na kvalitu a kvantitu zkoumané DNA možné získat informaci o jednotlivých donorech zkoumaného smíšeného biologického materiálu. Tak jako u jiných metod forenzní genetiky je však nutné mít k dispozici dostatek DNA (kvantita) o dostatečném stupni degradace/fragmentace (kvalita).

4. *Které další postupy měl podle Vašeho odborného názoru Ústav při zpracování posudku použít a jaké výsledky relevantní pro účely předmětného trestního řízení by mohly přinést?*

Kromě již zmíněné metody MPS měla být u většího počtu vzorků provedena analýza polymorfních oblastí na Y-chromozómu. Vzhledem k tomu, že ve znaleckém posudku č.: KUP-5631-1/ČJ-2015-2302BI nejsou uvedeny důležité informace o způsobu izolace DNA, kvantifikace a míchání PCR reakce, tak není jasné, zda po provedených analýzách zůstala ještě nějaká nespotřebovaná DNA či nikoliv.

5. *Je stopa – kapesní zavírací nůž – využitelná pro další znalecké zkoumání? Jaké analysy by bylo možné a účelné provést?*

Nelze vyloučit, že i po odběru vzorků Kriminalistickým ústavem Praha, zůstal na kapesním zavíracím noži analyzovatelný biologický materiál.

6. *Je tímto způsobem využitelný biologický materiál získaný a zpracovaný Ústavem?*

Ano, pokud KUP nespotřeboval veškerou izolovanou DNA, tak je možné provést další analýzy. Informace o množství nespotřebované DNA ve znaleckém posudku chybí.

7. Co dalšího případně pokládá znalec za potřebné k věci uvést?

V rámci tohoto případu je důležitá problematika primárního a sekundárního přenosu biologického materiálu, stability DNA v biologické stopě, kontaminace, a také vyhodnocení smíšených biologických stop.

A: Primární a sekundární přenos biologického materiálu

Detekce DNA profilu určité osoby na jakémkoli předmětu nemůže být považována za jednoznačný a nezvratitelný důkaz o přímém kontaktu určité osoby s tímto předmětem. Mechanizmy přenosu biologického materiálu jsou většinou popisovány jako primární a sekundární, nebo také přímé či nepřímé¹. Za přímý (primární) považujeme přenos biologického materiálu z určité osoby dotekem (nebo doteky) přímo na předmět (například biologický materiál detekovaný na násadě použité sekery). Za důkaz tohoto přenosu pak můžeme uvést například možnost analyzovat DNA z otisků prstů^{2,3,4,5}, latexových rukavic⁶ nebo textilu⁷. Za nepřímý (sekundární) považujeme přenos, kdy je biologický materiál určité osoby detekován na určitém předmětu, ale tato osoba nikdy s tímto předmětem nepřišla do styku⁸. Pokud například osoba zajišťující stopy na místě činu nejprve manipuluje s obětí a následně ve stejném páru ochranných rukavic zajišťuje stopy a vzorky, tak nelze vyloučit, že biologický materiál oběti nevědomky přenesl například na následně ohledávané oděvní součástky

¹ Meakin G1, Jamieson A. DNA transfer: review and implications for casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Jul;7(4):434-43

² R.A.H. van Oorschot, M.J. Jones, DNA fingerprints from fingerprints, *Nature* 387 (1997) 767

³ D.E.O. Van Hoofstat, D.L.D. DeForce, V. Brochez, I. De Pauw, K. Janssens, M. Mestdagh, R. Millecamps, E. Van Gelde, E.G. Van den Eeckhout, DNA typing of fingerprints and skin debris: sensitivity of capillary electrophoresis in forensic applications using multiplex PCR, in: *Proceedings of the 2nd European Symposium of Human Identification*, Promega Corporation, Innsbruck, Austria, 1998, pp. 131–137

⁴ P. Van Rentergeum, D. Leonard, C. De Greef, Use of latent fingerprints as a source of DNA for genetic identification, in: G.F. Sensabaugh, P.J. Lincoln, B. Olaisen (Eds.), *Progress in Forensic Genetics*, Vol. 8, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 501–503.

⁵ R.A.H. van Oorschot, R.K. Weston, M.K. Jones, Retrieval of DNA from touched objects, in: ANZFSS (Eds.), *Proceedings of the 14th International Symposium on the Forensic Sciences of Australian and New Zealand Forensic Science Society*, Adelaide, 1998

⁶ M. Pizzamiglio, F. Donato, T. Floris, C. Bellino, P. Cappiello, G. Lago, L. Garofano, DNA typing on latex gloves, in: G.F. Sensabaugh, P.J. Lincoln, B. Olaisen (Eds.), *Progress in Forensic Genetics*, Vol. 8, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 504–507

⁷ M.M. Schulz, W. Reichert, A strategy for STR-analysis of cryptic epithelial cells on several textiles in practical case-work, in: G.F. Sensabaugh, P.J. Lincoln, B. Olaisen (Eds.), *Progress in Forensic Genetics*, Vol. 8, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 514 – 516

⁸ C. Ladd, M.S. Adamowicz, M.T. Bourke, C.A. Scherzinger, H.C. Lee, A systematic analysis of secondary DNA transfer, *J. Foren. Sci.* 44 (6) (1999) 1270 – 1272

či jiné předměty. Stejně tak je nutné při vyhodnocování výsledků vyloučit, zda osoba provádějící ohledání místa činu (nebo přítomná na místě činu) sama nekontaminovala objekt(y) následného genetického zkoumání svým vlastním biologickým materiálem. Další možností je sekundární přenos při nevhodném zabalení předmětů zasílaných ke genetickému zkoumání anebo nedetekovaná kontaminace při analýze v DNA laboratoři. Při posuzování přítomnosti biologického materiálu by se u případů, kdy je přítomnost DNA určité osoby prokazována na předmětu, jež byl normálně používán v místě, kde tato určité osoba pracuje či žije, by vždy mělo být znalecem či znaleckou institucí explicitně uvedeno, že k přenosu mohlo dojít i nepřímým způsobem. Každý člověk totiž během dne ztratí velké množství buněk obsahujících genetický materiál. Tento „biologický odpad“ dle doby expozice (doby pobývání určité osoby v tomto prostoru) může kontaminovat většinu předmětů v určeném prostoru.

Zároveň ale platí, že i když dojde ke kontaktu osoby s předmětem, nemusí vždy dojít k přenesení detekovatelného množství biologického materiálu. Jednotlivé osoby totiž můžeme rozdělit dle toho, jak uvolňují a na předmětech zanechávají biologický materiál, na špatné, průměrné a velmi dobré donory biologického materiálu⁹. Množství uvolňovaného buněčného materiálu zcela jistě souvisí s obnovou epidermis, ale důležité jsou i zvyky dané osoby. Faktorem ovlivňujícím množství biologického materiálu přenášeného dotekem bude nejen frekvence mytí rukou, ale třeba i zvyk si rukou otírat ústa, popřípadě časté pročesávání vlasů prsty a podobně. U přenosu biologického materiálu ústy (například polibek pachatele na tělo zneužívané oběti) může být množství přenášeného biologického materiálu ovlivněno krvácením dásní či způsobem ústní hygieny.

Z výše uvedených důvodů je tedy nemožné určit, zda byl biologický materiál detekovaný metodami forenzní genetiky na určitém předmětu přenesen přímým kontaktem (ať už jedním či opakovaným dotekem) nebo nepřímým sekundárním přenosem. Existuje 5 hlavních důvodů, proč nelze jednoznačně určit typ přenosu (přímý/nepřímý):

- 1) Pravděpodobnost přenosu biologického materiálu na předmět závisí kromě typu donora i na textuře povrchu předmětu, vlhkosti či stupni mastnoty vzorku, jež má být na předmět přenesen. Neplatí, že k přenosu biologického materiálu při primárním přenosu musí vždy dojít. Zároveň však není možné považovat negativní nález za vyloučení přítomnosti hledaného biologického materiálu,

⁹ Alex Lowe, Caroline Murray, Jonathan Whitaker, Gillian Tully, Peter Gill (2002) The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Science International, Volume 129, Issue 1, 10 September 2002, Pages 25-34*

protože se může jednat o neschopnost laboratoře buňky nalézt, zajistit či zpracovat. V laboratoři lze analyzovat i jedinou buňku¹⁰.

- 2) Forenzní genetika za dobu od svého vzniku dosáhla velmi výrazného zvýšení citlivosti (snížení limitu) detekce DNA a získání využitelného DNA profilu. Standardně používané komerční forenzní genetické soupravy jsou schopné spolehlivě detekovat množství DNA v řádech desítek pikogramů a tudíž je zvýšeno riziko detekce biologického materiálu ze sekundárního přenosu.
- 3) Při zkoumání biologických stop metodami forenzní biologie a genetiky nelze stanovit dobu, jež uplynula od deponování biologického materiálu na předmět. Doba detekovatelnosti biologického materiálu na určitém předmětu je pak přímo úměrná době a intenzitě působení nepříznivých vnějších vlivů (viz tabulka č.1)
- 4) Nelze vyloučit, že na předmět někdo biologický materiál určité osoby umístil záměrně, aby tak dosáhl spojení této osoby s určitým místem činu nebo objektem použitým k páčání trestné činnosti.
- 5) Byla použita nevhodná technika pro zajištění biologického materiálu z předmětu. Výsledkem může být falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledek analýzy DNA.

B: vnější faktory, jež ovlivňují kvalitu a kvantitu DNA v biologické stopě

Od okamžiku vzniku biologické stopy do doby jejího zpracování v laboratoři působí na DNA celá řada vnějších vlivů. V extrémním případě může dojít až k úplné ztrátě genetické informace a následně falešně negativních výsledků. Hlavní nepříznivé vnější vlivy¹¹ jsou shrnuty v tabulce č.1. Pokud nejsou stopy a vzorky předložené ke zkoumání v laboratoři skladovány ve správném režimu, tak může nepříznivý vliv vnějších vlivů pokračovat až do doby izolace DNA (viz. tabulka č.2 a tabulka č.3)

Vnější vlivy	Popis
Mikrobiální dekompozice	Za vlhka a teplotního optima mohou mikroorganismy zničit téměř jakýkoli biologický vzorek
Vlhko	Při působení vlhka může dojít k odstranění biologického materiálu z povrchu předmětů omytím, vlhkost zároveň podporuje za mikrobiální dekompozici.
Vysoká teplota po dlouhou dobu	Extrémním případem 100% zničení biologického vzorku je kremace. Částečně ohořelé kosti či tkáně

¹⁰ I. Findlay, A. Taylor, P. Quirke, R. Frazier, A. Urquhart, DNA fingerprinting from single cells, Nature 389 (1997) 555–556.

¹¹ Beran M. a kolektiv (2012) Soudně-lékařská identifikace. Nakladatelství Karolinum. ISBN-978-80-246-2106-7

	jsou analyzovatelné
Působení nízkého pH	Nízké hodnoty pH mohou být příčinou degradace DNA.
UV záření, radiace	Působením záření o vyšší energii dochází ke štěpení molekuly DNA
Chemická činidla	Zejména oxidační činidla a dvoj- či trojmocné kationy
Inhibitory	Barviva na předmětech či oděvních součástkách mohou způsobit inhibici PCR reakce při analýze DNA
Enzymy	DNázy a endonukleázy jsou enzymy, které degradují a štěpí DNA. Enzymy pracují pouze v optimální teplotě a ve vlhku
Kontaminace	Viz protikontaminační opatření

Tabulka č. 1 - Hlavní nepříznivé vnější vlivy ovlivňující kvalitu DNA do doby jejího zpracování v laboratoři.

Při transportu vzorků a jejich následném uložení před zpracováním je nutné zamezit působení nepříznivých vnějších vlivů. V případech, kdy není možné vzorek při transportu a uložení zamrazit nebo alespoň chladiť, tak je nutné volit kombinaci vysoušení + normální teplota + ochrana před světlem a zářením.

Typ stopy	mraznička	lednice	kontrolovaná teplota	pokojová teplota
Tekutá krev	NIKDY	NEJLEPŠÍ		
Moč	NEJLEPŠÍ			
Suchý biologický materiál			NEJLEPŠÍ	
Kosti			NEJLEPŠÍ	
Vlasy			NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ
Tampon s biologickým materiálem			NEJLEPŠÍ (vysušený vzorek)	
Nátěr vaginálního výtěru na mikroskopické sklíčko)			NEJLEPŠÍ	
Fekálie	NEJLEPŠÍ			
Ústní stěry			NEJLEPŠÍ	
Vzorek izolované DNA (roztok)	NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ		
vzorek DNA stabilizovaný pomocí DNastable (Biomatrix, USA)			NEJLEPŠÍ	

Tabulka č.2 – Optimální podmínky pro dlouhodobé uložení vzorků biologického materiálu. Upraveno dle knihy: The Biological Evidence preservation Handbook: Best practises for Evidence Handlers (leden 2013). Teplotní a vlhkostní podmínky: mraznička (<-10°C), lednice (2-8°C; <25% vlhkost), kontrolovaná teplota (15-24°C; <60% vlhkost), pokojová teplota (bez kontroly °C a vlhkosti).

Typ stopy	mraznička	lednice	kontrolovaná teplota	pokojová teplota
Tekutá krev	NIKDY	NEJLEPŠÍ	méně než 24h	
Moč	NEJLEPŠÍ	méně než 24h		
Suchý biologický materiál			NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ
Vlhký biologický materiál, jež nelze vysušit	NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ	méně než 24h	
Kosti	PŘIJATELNÉ		PŘIJATELNÉ	PŘIJATELNÉ
Vlasy			NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ
Tampon s biologickým materiálem		NEJLEPŠÍ (vlhký vzorek)	NEJLEPŠÍ (vysušený vzorek)	
Nátěr vaginálního výtěru na mikroskopické sklíčko)			NEJLEPŠÍ	
Fekálie	NEJLEPŠÍ			
Ústní stěry			NEJLEPŠÍ	méně než 24h
Roztok izolované DNA	NEJLEPŠÍ	PŘIJATELNÉ		

Tabulka č.3 – Optimální podmínky pro krátkodobé uložení vzorků biologického materiálu. Upraveno dle knihy: The Biological Evidence preservation Handbook: Best practises for Evidence Handlers (leden 2013). Teplotní a vlhkostní podmínky: mraznička (<-10°C), lednice (2-8°C; <25% vlhkost), kontrolovaná teplota (15-24°C; <60% vlhkost), pokojová teplota (bez kontroly °C a vlhkosti).

HLAVNÍ PROTIKONTAMINAČNÍ OPATŘENÍ PŘI ZAJIŠŤOVÁNÍ VZORKŮ PRO ANALÝZU DNA

Pokud je biologická stopa kontaminována již při zajištění na místě činu či při ohledání v laboratoři, tak je celý následný proces identifikační analýzy DNA nejednoznačný. Při zajišťování vzorků biologického materiálu pro následnou analýzu DNA je nutné dodržovat následující protikontaminační opatření a zásady:

- 1) Osoby provádějící odběr a osoby přítomné odběru (fotograf, vyšetřovatel, svědek,.) MUSÍ vždy používat ochranné prostředky (návrky na boty, jednorázový overal, rouška, kapuce, rukavice).
- 2) Při zajišťování vzorků metodou stěru na tampón či olepem na pásku je nutné použít pouze prostředky certifikované pro forenzní použití. Sterilní¹² či necertifikované prostředky mohou být zdrojem kontaminace.
- 3) Osoby provádějící odběr a osoby přítomné odběru nesmí kýchat nebo kašlat, popřípadě mít povrchová krvácivá zranění.

¹² Sterilní = bez přítomnosti životaschopných mikroorganismů
Strana 8 (celkem 22)

- 4) Pokud je to možné, jsou používány především jednorázové prostředky (například plastové pinzety, jednorázové skalpely a podobně).
- 5) Nástroje, které jsou používány pro odběr více stop, je nutné po odběru každé stopy důkladně očistit. Prostředek použitý k čištění musí být následně důkladně odstraněn z nástroje, aby nedošlo ke zničení odebíraného vzorku (například stopy hypochloridu sodného v čisticích prostředcích fungujících na bázi uvolňování chlóru mohou zničit DNA ve vzorku).
- 6) Při odběru každého dalšího vzorku je nutné použít nový pár rukavic, aby se zamezilo sekundárnímu přenosu biologického materiálu.
- 7) Každá stopa musí být vložena do samostatného obalu. Tím je zamezeno křížové kontaminaci mezi vzorky. Při balení vlhkých vzorků je nutné zabezpečit integritu DNA.
- 8) Je nutné mít k dispozici DNA profil osoby provádějící odběr či přítomné odběru (zejména kriminalističtí technici a personál sérologické a DNA laboratoře).
- 9) Zdrojem kontaminace vzorků mohou být například i psací prostředky použité pro označení obalů. DNA z propisovací tužky či označovače se může přenést na rukavici a následně z rukavice na ohledávaný předmět, ze kterého je zajišťován vzorek pro analýzu DNA. I psací prostředky je nutné důkladně čistit.
- 10) Každý neznámý vzorek biologického materiálu je potencionálně nebezpečný lidskému zdraví, jelikož může obsahovat infekční agens (například HIV, *Hepatitida C*, a podobně).

Prostředky použité pro zajištění stop DNA z místa činu (zejména tampóny a olepovací páska) musí být CERTIFIKOVÁNY PRO FORENZNÍ POUŽITÍ, zejména musí mít deklarovanou nulovou přítomnost lidské DNA (označováno anglickým výrazem *human DNA-free*), nulovou přítomnost enzymů rozkládajících DNA (označováno anglickým výrazem *DNase-free*) a nulovou přítomnost inhibitorů PCR reakce (označováno anglickým výrazem *PCR inhibitor-free*)¹³. V domácí kriminalistické literatuře často narážíme na mylná tvrzení, že prostředky označené slovem STERILNÍ, jsou vhodné i pro zajišťování stop z místa činu¹⁴. Slovo sterilní na odběrových tampónech a jiných medicínálních prostředcích pouze deklaruje, že na výrobku nejsou přítomny životaschopné mikroorganismy. **Sterilní výrobek není v žádném případě vhodný pro zajišťování stop z místa činu, naopak může již z výroby obsahovat lidskou DNA.** Zpracovatel znaleckého posudku nebo subjekt provádějící zajištění biologického materiálu, by měl být schopen prokázat, že použil prostředky certifikované pro forenzní použití. Zcela v rozporu s mezinárodně uznávanými standardními postupy pro zajišťování vzorků na místě činu se pak vyjadřuje například oficiální instruktážní kniha *Praktická kriminalistika* vydaná Kriminalistickým ústavem Praha (Hlaváček, 2006). Zde nalezneme „doporučení“, že k zajišťování stop pro genetické zkoumání používáme bavlněné obvazy nebo tampóny DISPOLAB a k navlhčení je nejvhodnější sterilní voda. Pokud se osoby zajišťující biologické stopy na místě činu řídí těmito pokyny, tak existuje velké riziko kontaminace původní stopy cizorodou DNA. Doporučení v této knize týkající se oblasti forenzní biologie a genetiky v přímém rozporu s požadavky na správnou laboratorní praxi ve forenzních laboratořích¹⁵.

Problematicke uzpusobení výrobního procesu prostředků určených pro forenzní použití se ve svých doporučeních zabývají i zahraniční odborné společnosti¹⁶. V současné době je dostupných několik typů tampónů certifikovaných pro forenzní použití (bez detekovatelného množství lidské DNA). Jedná se například o tampóny 4N6 „flocked swab“ (Copan, Itálie), SecurSwab (BodeTech, USA), Forensix (Prionics, Švýcarsko) a FAB swab (Abacus Diagnostics, USA). Problematickou spotřebního materiálu pro forenzní analýzu DNA se zabývá i nová norma ISO 18385:2015 (Minimalizace rizik kontaminace lidskou DNA u produktů používaných pro zajištění, uložení a analýzu biologického materiálu pro forenzní účely – Požadavky (Minimizing the risk of human DNA contamination in products used to collect, store and analyze biological material for forensic purposes – Requirements)).

¹³ Beran M. a kolektiv (2012) Soudnělékařská identifikace. Nakladatelství Karolinum. ISBN-978-80-246-2106-7

¹⁴ Hlaváček J., Protivínský J. a kol. (2006) Praktická kriminalistika Kriminalistický ústav Praha

¹⁵ Vaněk D. and Drobnič K. (2014) Forensic DNA Typing and the Quality Assurance. Chapter in book Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective, Editors: Dragan Primorac, Moses Shanfield. CRC Press ISBN 9781466580220, p.205-249

¹⁶ www.ENFSI.org

C: způsob vyhodnocování smíšených biologických stop.

Současné amplifikační soupravy výrobců Promega (USA), LifeTechnologies (USA) či Qiagen (Německo) jsou vhodné i pro analýzu forenzních vzorků, a to včetně vzorků, kde je analyzován smíšený biologický materiál. Pokud se nepodaří minoritní frakci ze vzorku se smíšenou DNA více osob detekovat, tak nemůžeme hovořit o chybovosti kitu, ale spíše o nedosažení minimální hranice detekovatelnosti. O chybovosti naopak můžeme hovořit ve spojitosti s nesprávným vyhodnocováním získaných DNA profilů ze smíšených stop. Pokud například expert provádějící vyhodnocení smíšeného DNA profilu nemá dostatečné zkušenosti a nepostupuje podle přesně daných kroků (například standardního operačního protokolu), tak existuje poměrně velká pravděpodobnost, že výsledný výstup z forenzně-genetického zkoumání bude falešně negativní nebo falešně pozitivní. Je nutné si uvědomit, že ve forenzní genetice není žádné tvrzení absolutní, a pokud se veškeré zkoumání a analýza neprovádí dle validovaných vědeckých postupů, mohou být vyprodukovány zavádějící výsledky. Příklad směrnice pro vyhodnocování smíšených stop tvoří přílohu č.1 tohoto znaleckého posudku. Další možností je použít pro vyhodnocení smíšených stop specializovaný software (například GenoProof Mixture, výrobce Qualitype, Německo). I v případě použití software je nutné, aby byl před použitím pro vyhodnocování znaleckého zkoumání řádně validován.

Falešně pozitivní identifikace může být způsobena mnoha faktory¹⁷. Nejčastější příčiny falešně pozitivních výsledků jsou sumarizovány v tabulce č. 4.

Příčina	Popis
kontaminace vzorku při odběru použitím nevhodného sekundárního nosiče	Pokud se pro zajišťování používají pouze STERILNÍ nosiče bez certifikátu pro forenzní použití, tak tyto prostředky mohou být kontaminovány lidskou DNA již z výroby. Použití takového prostředku může mít za následek získání DNA profilu, který může být falešně označen za DNA profil neznámé osoby na místě činu, ale zatím se jedná o DNA profil osoby podílející se na výrobě či distribuci nosičů pro vzorkování (většinou tamponů).
kontaminace vzorku při odběru biologickým materiálem osoby provádějící vzorkování	Pokud nedodržují osoby provádějící vzorkování na místě činu přísná protikontaminační opatření (ochranné overaly, roušky, návleky na boty, kapuce, výměna rukavic před odběrem další stopy, vhodná dekontaminace nástrojů), mohou na zajišťované stopy/vzorky přenést svoji DNA. To může mít za následek získání DNA profilu, který může být falešně označen za DNA profil neznámé osoby na místě činu, ale zatím se jedná o DNA profil osoby podílející se na vzorkování či ohledání místa činu (kriminalistický technik, vyšetřovatel, oznamovatel a podobně).
kontaminace vzorku při zpracování v laboratoři.	Pokud nejsou v laboratoři aplikována přísná protikontaminační opatření, může při zpracování vzorku dojít k sekundární kontaminaci DNA pracovníků laboratoře či z jiných vzorků/stop nebo okolního prostředí. To může mít za následek získání DNA profilu, který může být falešně označen za DNA profil neznámé osoby na místě činu, ale zatím se jedná o DNA profil kontaminující DNA.
záměna vzorku	Pokud dojde v procesu vzorkování na místě činu či zpracování v laboratoři k záměně vzorků, může dojít k falešně pozitivnímu závěru ohledně genetické informace obsažené ve vzorku/stopě. Při vzorkování i uložení vzorku izolované DNA je nutné použít pro označování nezpochybnitelný způsob, například značení čárovými kódy na neodlepitelné nálepce.
špatná věda	Pokud laboratoř používá při zpracování vzorků biologického materiálu nevalidované postupy, může dojít k vyprodukování arteficiálního DNA profilu, který je falešně označen za DNA profil neznámé osoby na místě

¹⁷ Za falešně pozitivní výsledky označujeme takové výstupy z forenzní analýzy DNA, při kterých laboratoř vydá nález, že DNA profil získaný ze stopy/vzorku se shoduje s DNA profilem určitého člověka, ale tato shoda je falešná a došlo k ní díky hrubé laboratorní chybě.

	činu, ale zatím se jedná o DNA profil vzniklý špatným zpracováním (například zvýšením počtu cyklů při namnožování pomocí PCR reakce).
neexistující postupy pro analýzu směsných dna profilů	Pokud nemá laboratoř zavedeny a validovány postupy pro analýzu směsných DNA profilů (materiál 2 a více osob), může tento nálezn uzavřít falešně pozitivním tvrzením o přítomnosti DNA profilu určité osoby ve zpracovávaném vzorku/stopě. Riziko je zvýšeno zejména u vzorků, kde je přítomno jen velmi malé množství biologického materiálu, popřípadě je biologický materiál degradován.
chybné statistické vyhodnocení	Pokud nemá laboratoř zavedeny a validovány postupy pro statistické vyhodnocení shod mezi referenčními DNA profily (osob) a DNA profily ze stop/vzorků zajištěných na místě činu, může tento nálezn uzavřít falešně pozitivním tvrzením o přítomnosti DNA profilu určité osoby ve zpracovávaném vzorku/stopě. Riziko je zvýšeno zejména u vzorků, kde je přítomno jen velmi malé množství biologického materiálu, popřípadě je biologický materiál degradován.
přetížený personál	Pokud jsou osoby pracující v laboratoři vystaveny vnějším tlakům (počet nezpracovaných spisů, nepravidelné dodávky spotřebního materiálu, nevhodné pracovní prostředí), může mnohem častěji dojít k falešně pozitivnímu závěru ohledně přítomnosti genetické informace ve stopě/vzorku.

Tabulka č. 4 - Nejčastější příčiny falešně pozitivních výsledků forenzní analýzy DNA

Průzkumy citované v zahraniční odborné literatuře uvádějí průměrnou chybovost forenzních DNA analýz v rozmezí od 1/100 do 1/10000 (v čitateli je počet chybných analýz, ve jmenovateli celkový počet provedených analýz) v závislosti na kvalitativních a kvantitativních ukazatelích hodnocených DNA laboratořích, a dále na míře implementace systému kontroly kvality do běžného provozu těchto laboratořích.

Jak již bylo řečeno, pokud se v zajištěném vzorku vyskytuje biologický materiál více než jedné osoby, je výstupem z analýzy DNA takzvaný smíšený DNA profil. Pro statistické vyhodnocení síly důkazu je nutné použít principiálně jiné postupy než u statistického vyhodnocování prosté shody 2 úplných profilů.

Evropský konsenzus o principech interpretace DNA směsí je popsán ve vědecké literatuře^{18,19}. Na obrázku č.1 je uveden rozhodovací diagram, který byl připraven dle citovaných doporučení. Tento postup statistického vyhodnocení se musí použít pro všechny DNA profily, kde ve více než 2 lokusech detekujeme více než 2 píky. Pokud je možné ve směsi rozlišit majoritní a minoritní pík(y), můžeme pro majoritní složky vypočítat pravděpodobnost náhodné shody RMP²⁰ a případně i určit pravděpodobnostní poměr²¹. Pokud je u smíšeného DNA profilu detekován stochastický efekt²², tak se statistické vyhodnocení nesmí provádět. Pokud u

¹⁸ Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, et al. (2006) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int* 160:90–101

¹⁹ Schneider P.M., Fimmers R., Keil W., Molsberger G., Patzelt D., et al (2006) Allgemeine Empfehlungen der Spurenkommision zur Bewertung von DNA-Mischspuren, *Rechtsmedizin* 16 (2006) 401–404.

²⁰ Random Match Probability – pravděpodobnost nalezení nepříbuzného jedince se stejným DNA profilem.

²¹ Likelihood ratio (LR) – pravděpodobností poměr při porovnávání hypotéz

²² *Stochastický efekt*: Pokud amplifikujeme příliš malé množství DNA (většinou pod 50 pikogramů), tak může dojít k takzvanému stochastickému efektu. Jedna lidská buňka obsahuje přibližně 6 pikogramů DNA a při PCR amplifikaci vzorků s příliš nízkou koncentrací DNA (<50 pg) existuje šance, že se heterozygotní alely amplifikují s rozdílnou efektivitou a výsledkem pak může být, že původně heterozygotní vzorek je ve zkoumaném STR systému detekován jako homozygotní a výsledný DNA profil

smíšeného profilu není detekován stochastický efekt, píky není možné rozlišit na majoritní a minoritní a není určován počet donorů, tak se provádí statistické vyhodnocení síly důkazu výpočtem kombinované pravděpodobnosti vyloučení CPe (jinak nazývaná RMNE – Random Man Not Excluded). Postup výpočtu je znázorněn v tabulce č. 5.

Výpočet RMP pro majoritní DNA profil ze smíšeného DNA profilu (viz Typ B na obrázku č.1) se provádí tak, že nejprve počítáme pravděpodobnost pro jednotlivé testované STR lokusy a následně se frekvence výskytu pro jednotlivé genotypy vynásobí mezi sebou. Postup výpočtu RMP pro DNA profil je uveden v tabulce č. 6. Je důležité si uvědomit, že výsledná RMP je platná pouze pro nepříbuzné osoby z konkrétní populace. Vzorce pro výpočet se budou lišit, pokud budeme do výpočtů zahrnovat osoby s příbuzenskou vazbou.

Předpokládejme, že DNA profil uvedený v tabulce č. 6 byl získán ze stopy z místa činu a ve všech znacích se shoduje s DNA profilem podezřelého. Hypotézou obžaloby (Hp) je, že podezřelý je donorem biologického materiálu, naproti tomu hypotézou obhajoby (Hd) je, že donorem biologického materiálu je jiná osoba a nikoli podezřelý. Je důležité rozhodnout, která hypotéza je pravděpodobnější. Zadání můžeme vyjádřit matematicky:

$$LR = H_p/H_d, \quad \text{kde}$$

LR = pravděpodobnostní poměr (likelihood ratio)

H_p = hypotéza obžaloby

H_d = hypotéza obhajoby

Hypotézou obžaloby je, že podezřelý je donorem biologického materiálu, tudíž H_p = 1 (100% pravděpodobnost). Hypotézou obhajoby je, že donorem biologického materiálu je někdo jiný, a proto se nám do jmenovatele ve vzorci dostane vypočtená pravděpodobnost z tabulky č. 5. Porovnáním získaného pravděpodobnostního poměru (LR) s tabulkou č. 7 zjistíme, že důkaz proti podezřelému je velmi silný. Závěr ve znaleckém posudku, popisující sílu nalezené shody, by měl být následující:

„Pokud nebereme v úvahu jednovaječná dvojčata nebo blízké příbuzné, tak můžeme na základě statisticky podložených vědeckých závěrů stanovit, že donorem DNA z místa činu je obžalovaný“. Výhodou použití výpočtu LR je i to, že do výpočtů můžeme zahrnout i další ukazatele, například chybovost laboratoří a další faktory ovlivňující „sílu“ důkazu.

tedy neodpovídá DNA profilu donora biologického materiálu. Pro výskyt stochastického efektu jsou extrémně důležité úvodní cykly amplifikačního PCR procesu. Pokud se v úvodních cyklech preferenčně amplifikuje pouze jedna z alel (v rámci heterozygotního systému), tak dochází ke stochastickému efektu.

lokus	alela	frekvence	Σ frekvencí	$PI = \Sigma^2$	$PE = (1-PI)$
D3S1358	14	0,103	0,571	0,326041	0,673959
	16	0,253			
	17	0,215			
TH01	8	0,084	0,566	0,320356	0,679644
	9	0,114			
	9,3	0,368			

CPI	0,104449	CPE	0,458052191
-----	----------	-----	--------------------

Závěr: 45,8% populace by bylo vyloučeno jako donoři biologického materiálu ve směsi

Tabulka č. 5 - výpočet kombinované pravděpodobnosti vyloučení CPe (RMNE) pro smíšené DNA profily, kde není detekován stochastický efekt, není možné píky rozlišit na majoritní a minoritní a není určován počet donorů. Čím více alel je v rámci lokusu zjištěno, tím menší je množství osob, jež mohou být vyloučeny jako donoři biologického materiálu ve stopě. Tabulka ukazuje pouze vzorový výpočet pro 2 lokusy (D3S1358 a TH01), v reálném případě by se musel výpočet rozšířit na všechny STR markery. (PI = pravděpodobnost zahrnutí, PE = pravděpodobnost vyloučení, CPI = kombinovaná pravděpodobnost zahrnutí, CPE = kombinovaná pravděpodobnost vyloučení)

Lokus	Alela 1	Alela 2	Frekvence alely 1 (p)	Frekvence alely 2 (q)	Vzorec	Předpokládaná frekvence výskytu genotypu
D3S1358	15	15	0,22886		p^2	0,0523769
vWA	16	19	0,15423	0,08706	$2pq$	0,0268545
FGA	22	24	0,21393	0,12687	$2pq$	0,0542826
D8S1179	10	15	0,08706	0,11194	$2pq$	0,19491
D21S11	28	30	0,16169	0,21642	$2pq$	0,0699859
D18S51	12	15	0,10448	0,18657	$2pq$	0,0389857
D5S818	13	13	0,15740		p^2	0,0247748
D13S317	8	8	0,13050		p^2	0,0170303
D7S820	10	10	0,27890		p^2	0,0777852
				Kombinovaná frekvence		$1,333 \times 10^{-13}$
				Pravděpodobnost (RMP)		$7,504 \times 10^{-12}$

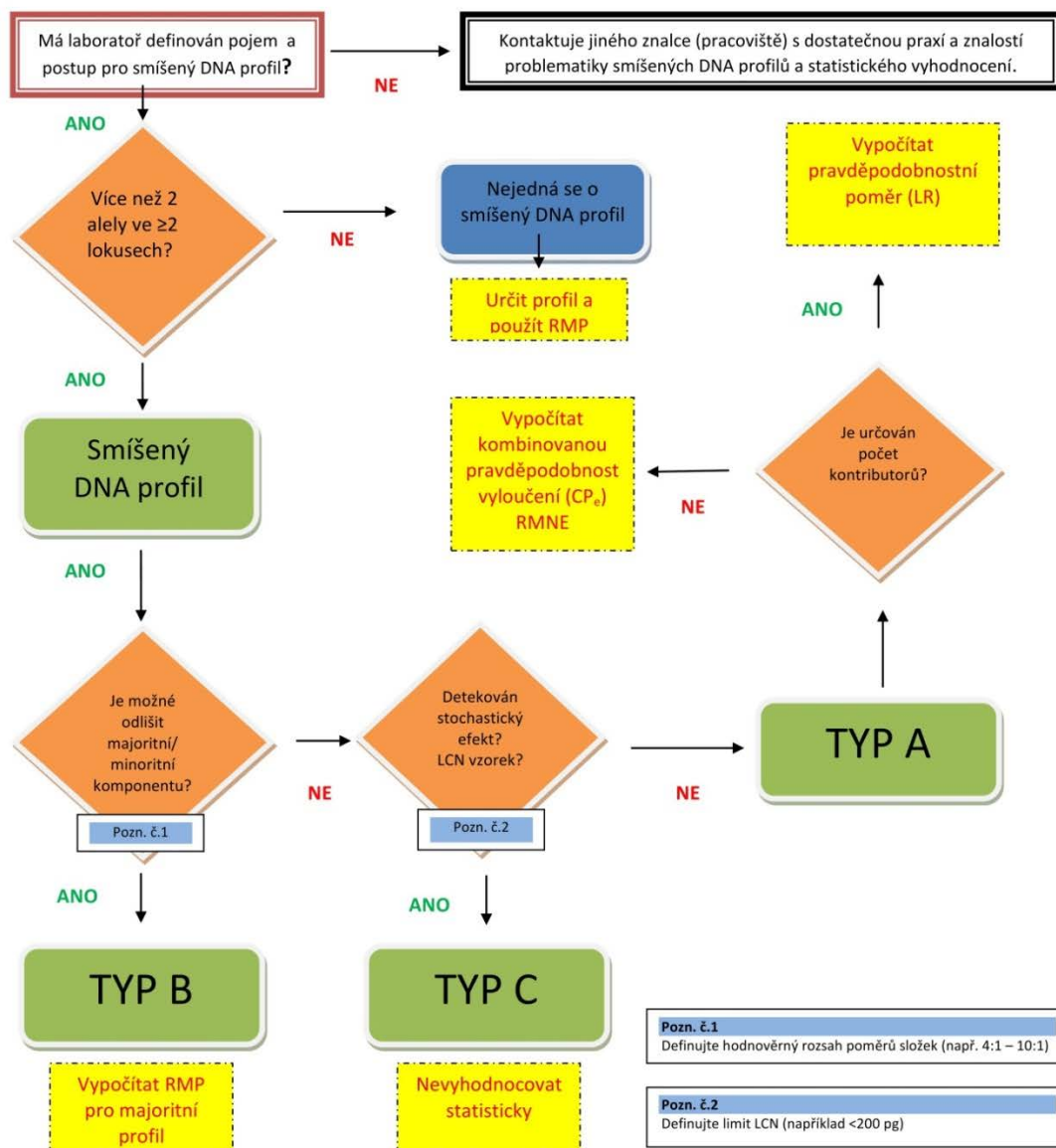
Tabulka č. 6 – Výpočet RMP (pravděpodobnost náhodné shody) pro DNA profil tvořený 9-ti STR. RMP = $7,504 \times 10^{-12}$ říká, že pravděpodobnost hypotézy, že stopu na místě činu zanechala osoba se shodným profilem je 7 504 000 000 000 x pravděpodobnější než hypotéza, že stopa zde byla zanechána jinou nepříbuznou osobou.

Vypočtená pravděpodobnost není pravděpodobností o něčí vině či nevině!! RMP nám pouze říká, jak často by se daný DNA profil mohl vyskytnout mezi nepříbuznými osobami v konkrétní populaci.

Výše uvedené výpočty pro typy vzorků A a B jsou zjednodušené a neřeší problémy typu zahrnutí příbuzných osob, pravděpodobnost laboratorní chyby, možnost kontaminace, počet donorů, příslušnost donorů do různých populací, imbrední faktor, pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku a korelace zjištěného pravděpodobnostního poměru s původními očekáváními.

Pokud je LR ,	pak DNA důkaz poskytuje
1 až 10	omezenou podporu
10 až 100	střední podporu
100 až 1000	středně silnou podporu
1000 až 10 000	silnou podporu
10 000 a větší	velmi silnou podporu

Tabulka č. 7 – Důkazní hodnota vypočteného pravděpodobnostního poměru.



typy smíšených vzorků	Klasifikace smíšených vzorků	Metoda statistického výpočtu
A	není odlišitelný majoritní profil a profil nejeví známky stochastického efektu	CPE /LR(*)
B	je odlišitelný majoritní a minoritní profil a profil nejeví známky stochastického efektu	RMP pro majoritní
C	směsí s nízkou výškou píků a známkami stochastického efektu	NEPOČÍTAT

(*) LR (pouze pokud je brán v potaz počet kontributorů biomateriálu)

Obrázek č. 1 – Rozhodovací diagram pro statistické vyhodnocení síly důkazu u smíšených DNA stop. Upraveno dle Gill, 2006 a Schneider, 2006. LCN= z anglického Low Copy Number. Jedná se o vzorky s podlimitním množstvím DNA vkládané do amplifikační reakce.

Otázky na znalce (požadavek ze dne 10.10.2015)

1a. Uvedte konkrétně, které další podklady by měl Ústav ke svému posudku doložit, tak abyste byl schopen svůj znalecký posudek v objednaném rozsahu dokončit.

Seznam požadovaných dokumentů, dat, záznamů a vzorků, potřebných k přezkoumání provedených analýz k případu ods. Pechanec, je uveden v příloze č.2 tohoto znaleckého posudku.

2a. Vyjádřete se k tomu, co zástupce Ústavu uvedl při svém výsledku, tj. že některé Ústavem aplikované postupy představují chráněné know-how, s nímž by se neměl nikdo nepovolaný seznámit.

Obecně platí to, že znalecký posudek musí být jednoznačný a přezkoumatelný. U akreditovaných pracovišť dle normy ISO 17025 dále platí, že znalecký posudek nebo protokol o zkoušce či obdobný výsledek, obsahuje veškeré naměřené údaje a odkazy na použité metody. Znalecký posudek KUP je v této formě nejednoznačný a neúplný a nesplňuje pravidla kladená na laboratoře akreditované dle normy ISO 17025. Vyjádření o jakémsi chráněném know-how je naprosto nesmyslné, protože proces dokazování (včetně genetické analýzy biologického materiálu), musí být zcela transparentní a nelze žádné informace, tedy ani o použitých metodách, zamlčovat.

3a. Která pracoviště v České republice jsou schopna laboratorně realizovat metodu Massive Parallel Sequencing a jaké výsledky lze od této metody očekávat? Dá se předpokládat dosažení separace těch směsí DNA, které Kriministický ústav Praha nebyl schopen rozdělit? Byla by tato metoda přínosem i z hlediska kvantifikace, tj. stanovení, jaké množství genetického materiálu jednotlivých donorů bylo na daném místě stopy – v daném stěru – zjištěno?

Tato otázka již byla částečně zodpovězena v rámci odpovědí na otázku č.1-3. Stran přehledu českých pracovišť disponujících validovanou metodou MPS nemá níže podepsaný znalec dostatečné informace.

4a. Jaké jsou možnosti spolupráce českých orgánů činných v trestním řízení se zahraničními forensními laboratořemi a ústavy? Bylo by podle Vašeho názoru, zejména ve světle toho, jak analýzu stopy provedl Kriministický ústav Praha, účelné, aby soud objednal další znalecké zkoumání v zahraničí?

Kriministický ústav Praha je členem Evropské sítě forenzních ústavů (European Network of Forensic Science Institutes =ENFSI) od roku 1997 a tudíž může zcela bez problémů využít zkušeností zahraničních pracovišť, kde v rámci forenzní genetiky zavádějí a zavedli nejnovější vědecké poznatky.

Závěr:

Odpovědi na otázky jsou uvedeny v nálezové části znaleckého posudku

Znalecký posudek vyhotovil:

RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

znalec z oboru Kriminalistika, specializace forenzní biologie a genetika

Znalecká doložka:

Znalecký posudek jsem podal jako znalec jmenovaný rozhodnutím Městského soudu v Praze pro základní obor Kriminalistika, specializace Forenzní biologie a genetika.

Znalecký úkon je zapsán pod pořadovým číslem 037/2015.

Znalec byl ve smyslu §106 tr.řádu poučen o významu znaleckého posudku z hlediska obecného zájmu a o trestních následcích křivé výpovědi a vědomě nepravdivého znaleckého posudku.

Podpis znalce:

Vzor směrnice pro vyhodnocování smíšených DNA profilů (mimo LCN)

Autor směrnice: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Oblast použití: Vyhodnocování DNA profilů ze smíšených biologických vzorků

Úvod:

V ČR neexistuje jednotná metodika pro vyhodnocování smíšených DNA profilů vzniklých jako výsledek analýzy forenzních stop. Cílem této směrnice, která vychází z doporučení zahraničních laboratoří, je definovat způsob, pomocí kterého lze minimalizovat falešně negativní nebo falešně pozitivní výstup z forenzně-genetického zkoumání. Je nutné si uvědomit, že ve forenzní genetice není žádné tvrzení absolutní, a pokud se veškeré zkoumání a analýza neprovádí dle vědeckých postupů, mohou být vyprodukovány zavádějící výsledky. **Tato metodika není určena pro LCN vzorky** (z anglického Low Copy Number samples), kde je analyzováno podlimitní množství biologického materiálu.

Copyright:

Část textu a obrázky jsou převzaty z publikace Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, Della Manna A, Gross AM, Guerrieri RA, Luttman JC, McClure DL. (2009) *Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework*. *J Forensic Sci.* ;54(4):810-21 (dále jen Budowle, 2009)

Požadavky na laboratoř:

Laboratoř musí mít definovány empirické parametry (validace) a postupy pro:

- 1) Rozlišení pravých alel od nealelických píků/artefaktů
 - a. PCR proces nikdy není 100% účinný a při <100% PCR dochází ke vzniku nealelických píků (stutter, adenylace). Dalším zdrojem artefaktů jsou nesprávné matrice, tzv. spiky a pull-up píky a artefakty spojené s použitými fluorofory či soupravou (arteficiální píky specifické pro soupravu), popřípadě artefakty způsobené mikrobiální či nehumánní DNA.
- 2) Definice mezních hodnot
 - a. PAT (peak amplitude threshold)
 - b. MIT (match interpretation threshold)
 - c. PHR (peak height ratios) pro heterozygotní alely
 - d. PHR pro určení majoritního/minoritního kontributora ve směsi
 - e. Výšky stutterů pro každou alelu v každém lokusu
- 3) Definice možných tri-alelických profilů
- 4) Standardní operační postup pro určení počtu kontributorů ve smíšeném vzorku
 - a. Například více než 2 alely ve více než 2 lokusech, ale vždy maximálně 4 alely na lokus, bude v posudku interpretováno jako „vzorek DNA ze stopy č. 1 lze interpretovat jako směs nejméně 2 osob“.
 - b. U multiplexových systémů se zahrnutým testováním amelogeninu lze stanovit přítomnost mužské DNA, pokud:
 - i. X a Y jsou nad empiricky stanovenou mezí PAT
 - ii. Pouze Y pík je nad empiricky stanovenou mezí PAT
 - iii. Y je spolehlivě určen Y-specifickou kvantifikací
 - iv. Y je spolehlivě určen amplifikací Y-STR.Vzorek je pak možné v posudku interpretovat jako „vzorek DNA ze stopy č. 1 lze interpretovat jako směs nejméně 2 osob, přičemž test na Y-chromozóm naznačuje, že nejméně jedním z kontributorů je muž“.
- 5) Standardní operační postup, kdy je neznámý vzorek interpretován PŘED POROVNÁNÍM s referenčními vzorky
 - a. Definice (založená na interní validaci), jak je rozlišen majoritní/minoritní kontributor (např. 2x PHR)
- 6) Standardní operační postup pro statistické vyhodnocení smíšených vzorků (majoritní/minoritní vs. nerozlišitelný)

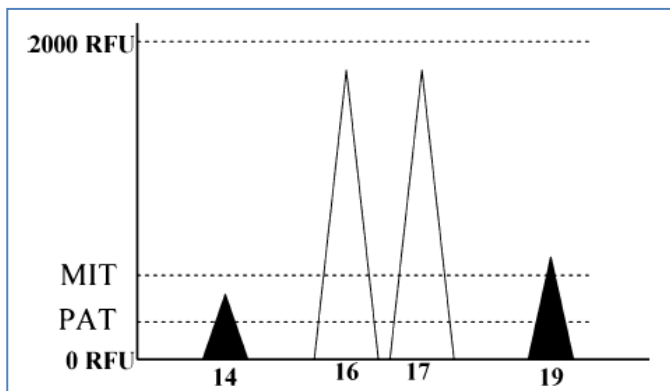
Obecné předpoklady:

Laboratoř musí splňovat tyto obecné předpoklady:

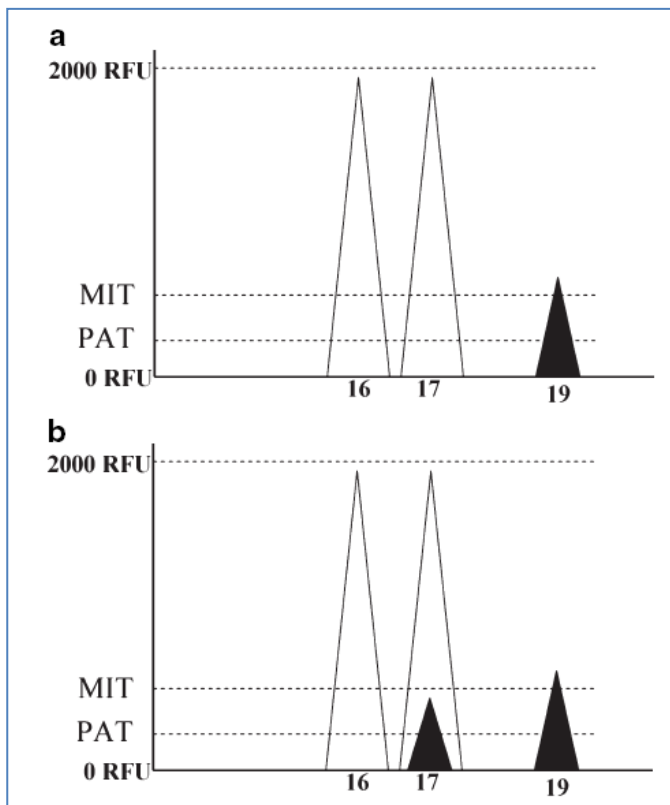
- 1) Zavedený systém kvality (kontrola/kalibrace přístrojů, sledování expirace chemikálií, validace izolace/kvantifikace/amplifikace/kapilární elektroforézy)
- 2) Zavedený systém kvality pro ÚČINNÉ monitorování kontaminace v laboratoři a v používaných chemikáliích a spotřebním materiálu.
- 3) Prokazatelná schopnost správně vyhodnotit smíšené DNA profily (například absolvované GEDNAP profesní testy)
- 4) Definované empirické parametry a postupy (viz 1-3 výše)

Příklady:

Rozdíl mezi hranicemi PAT a MIT (viz obrázek č. 1) je takový, že PAT definuje mez detekce (dokážeme rozlišit pík od šumu) a MIT definuje mez robustní amplifikace DNA. Oblast mezi PAT a MIT je nazývána stochastickou oblastí.



Obrázek č. 1: (převzato z Budowle et al, 2009). Vzorový smíšený profil 2 osob (majoritní a minoritní profil). Donor minoritní složky má jednu alelu mezi mezí PAT a MIT, druhá alela je nad mezí MIT.



Obrázek č. 2: (převzato z Budowle et al, 2009). Vzorový smíšený profil 2 osob (majoritní a minoritní profil). **(a)** Z profilu minoritního kontributora je viditelná pouze 1 alela a ta je nad mezí MIT. **(b)** Je znázorněna hypotéza, že doprovodná heterozygotní alela je maskována alelou z majoritního profilu.

Metodika vyhodnocování smíšených DNA profilů:

- Minoritní alely nad mezí MIT můžeme interpretovat jako skutečné alely a ty mohou být použity pro statistické vyhodnocení.
- Alely detekované ve stochastické oblasti (mezi PAT a MIT) NESMÍ BÝT

POUŽITY pro statistické vyhodnocení.

- o Například na obrázku č. 1 může být kontributorem minoritního profilu osoba 14/19, ale nemůžeme vyloučit možnost, že minoritní profil pochází od 2 osob, kdy například jedna z alel je maskována majoritním profilem a druhá osoba je v tomto lokusu homozygot. Správný postup pro scénář na obrázku č.1 by bylo vyloučit všechny osoby s profilem 19 (-14/16/17) a zahrnout mezi nevyloučené všechny osoby s profilem 14/16/17/19. Vyloučena by tedy byla osoba s profilem 19/21, ale nevyloučena by byla osoba s profilem 19/19 nebo 16/19.

- Pro statistickou interpretaci příkladu na obrázku č. 2 by měly být zvažovány všechny viditelné alely
 - o Na obrázku je pouze jedna alela minoritního profilu a její výška je nad MIT. Kontributorem minoritního profilu tedy může být osoba s profilem 19/19, 16/19 nebo 17/19
 - o Alternativně by pro scénář na obrázku č. 2b mělo být při statistickém vyhodnocení minoritního profilu použito pravidlo $2p$ ($2 \times$ frekvence výskytu alely p v dané populaci)
- Interpretace příkladu na obrázku č. 2 může být závislá na daném lokusu. U lokusů s velkým rozsahem alel (například **FGA**) je tendence preferenční amplifikace kratší alely a nedetekování delší alely (falešný homozygot). Pro tento typ lokusů se NEDOPORUČUJE VYHODNOCOVAT profil minoritního kontributora, popřípadě důkladně validovat MIT pro dlouhé alely tohoto lokusu. Konzervativním přístupem je připustit jak homozygota 19/19 tak heterozygota 19/? (znak „?“ nahrazuje jakoukoli alelu, zejména ty větší než 19).

Seznam požadovaných dokumentů, dat, záznamů a vzorků, potřebných k přezkoumání provedených analýz k případu ods. Pechanec

Poř.č.	Popis požadavku
1	Pokud byly pro zajištění jakéhokoli vzorku biologického materiálu použity odběrové soupravy či jiné přípravky/prostředky (například tampony), tak předat seznam takovýchto prostředků a uvést typ a název výrobku, jméno výrobce, číslo šarže a kopii certifikátu o vhodnosti použitého přípravku pro zajišťování biologických stop, u kterých se předpokládá následná analýza DNA pomocí metod forenzní genetiky.
2	Předat kopii původních laboratorních protokolů o izolaci DNA z předložených stop, věcí a vzorků zpracovávaných v rámci případu.
3	Předat kopii záznamů o chemikáliích a přípravcích použitých při izolaci DNA z předložených stop, věcí a vzorků zpracovávaných v rámci případu. Zejména se jedná o jednoznačnou identifikaci chemikálie či přípravku pomocí katalogového čísla a jména výrobce, datum nákupu, číslo šarže chemikálie či přípravku a datum expirace, popřípadě i příbalový leták.
4	Předat kopie protokolů/operačních postupů/metod, jež byly použity v rámci zpracování vzorků/stop v tomto případě. Mělo by jít zejména o izolaci, kvantifikaci a amplifikaci DNA, dále pak statistické vyhodnocení shod u smíšených biologických stop, stanovování dedukovaného profilu, amplifikace podlimitního množství DNA, skladování izolované DNA po dokončené analýze a podobně.
5	Předat kopii validačních studií pro použité (a výše určené) metody/protokoly/postupy.
6	Sdělít, kolik DNA (koncentrace a objem) zůstalo po analýze uloženo v laboratoři a za jakých podmínek jsou vzorky uloženy.
7	Předat kopii původních laboratorních protokolů o kvantifikaci DNA z předložených stop, věcí a vzorků zpracovávaných v rámci případu.
8	Předat kopii záznamů o chemikáliích a přípravcích použitých při kvantifikaci DNA z předložených stop, věcí a vzorků zpracovávaných v rámci případu. Zejména se jedná o jednoznačnou identifikaci chemikálie či přípravku pomocí katalogového čísla a jména výrobce, datum nákupu, číslo šarže chemikálie či přípravku a datum expirace, popřípadě i příbalový leták.
9	Předat kopii metody/postupu monitorování kontaminace v laboratoři.
10	Předat výsledky monitorování kontaminace v laboratoři v období před a po analýze vzorků k tomuto případu.
11	Sdělít, jaké jsou hodnoty kvantity DNA, pro něž výrobci „garantují získání výsledků“. Přiložte kopii z manuálu či příbalového letáku použitého amplifikačního kitu, kde je uvedeno toto „doporučené“ množství.
12	Předat kopii původních laboratorních protokolů o amplifikaci DNA z předložených stop, věcí a vzorků zpracovávaných v rámci případu.
13	Předat kopii záznamů o chemikáliích a přípravcích použitých při amplifikaci DNA z předložených stop, věcí a vzorků zpracovávaných v rámci případu. Zejména se jedná o jednoznačnou identifikaci chemikálie či přípravku pomocí katalogového čísla a jména výrobce, datum nákupu, číslo šarže chemikálie či přípravku a datum expirace, popřípadě i příbalový leták.
14	Předat kopii původních laboratorních protokolů o elektroforetické separaci amplifikované DNA na sekvenátoru.
15	Kromě požadavku ad 5) předat záznamy a protokoly o provedených interních validacích ověřujících vhodnost zvolených metod a postupů při elektroforetické separaci amplifikované DNA na sekvenátoru a následném vyhodnocení dat získaných při analýze (dynamický rozsah citlivosti, inhibiční efekt, stochastický efekt, laboratorní nastavený detekční limit, analýza stutterů, alelický drop-out, bleed-through, poměr výšek a ploch sesterských píků, omezení metody, efekt změny injekčních parametrů, efekt počtu běhů na kapiláře a podobně)
16	Předat kopii záznamů o údržbě, kalibraci a opravách všech přístrojů a nástrojů použitých při elektroforetické separaci amplifikované DNA na sekvenátoru/sekvenátorech.
17	Jakou hranici (množství DNA zjištěné při kvantifikaci) má Vaše laboratoř určenou jako limit k provedení analýzy DNA? Kdo tuto hranici stanovil a jakým způsobem? Doložte prosím relevantní validační studii.
18	Předat kopii primárních a sekundárních souborů ze sekvenátoru (například <i>fsa</i> soubory) vzniklých při analýze VŠECH vzorků (i těch neuvedených ve výsledcích) zpracovávaných v rámci tohoto případu, včetně negativní a pozitivní kontroly, alelického žebříku ze VŠECH nástřiků vzorků zpracovávaných v rámci tohoto případu a soubor se záznamem o běhu sekvenátoru (log file) pro všechny vzorky a další soubory vzniklé při zpracování (například <i>sample sheet</i> či <i>injection list</i> , analyzovaná data, data projektu a podobně). Musí být předány VŠECHNY soubory potřebné pro opakovanou analýzu dat generovaných na sekvenátoru

	(nezapomeňte na templáty, makra a podobně).
19	Předat kopii záznamů o chemikáliích a přípravcích použitých při elektroforetické separaci amplifikované DNA na sekvenátoru z předložených stop, věcí a vzorků zpracovávaných v rámci případu. Zejména se jedná o jednoznačnou identifikaci chemikálie či přípravku pomocí katalogového čísla a jména výrobce, datum nákupu, číslo šarže chemikálie či přípravku a datum expirace, popřípadě i příbalový leták.
20	Předejte kopii původní tabulky (nebo tabulek) s výsledky ze sekvenátoru (pokud takové záznamy laboratoř provádí), do které byly zapisovány odečty výsledných DNA profilů pro všechny vzorky zpracovávané v rámci případu. Popište nomenklaturu používanou při zápisu alel (malý/velký font, různé barvy, ...)
21	Předat kopii výstupů či záznamů výsledků získaných při porovnávání DNA profilů či haplotypů získaných v rámci případu s Národní DNA databází (CODIS) nebo dalšími databázemi. Přesně specifikujte, kdy bylo provedeno porovnání s databází a kolik záznamů bylo ke dni provedení porovnání v příslušné databázi.
22	Předejte veškerou dokumentaci a záznamy o všech případech záměny vzorků, detekované kontaminace, detekce zvláštních píků v kontrolách nebo referenčních vzorcích, falešně pozitivních či falešně negativních výsledcích, ke kterým došlo ve vaší laboratoři v období předcházejícím zpracování vzorků ve vaší laboratoři (nejméně 2 roky před datem zpracování) až do dnešního dne.
23	Předejte kopii všech záznamů či výsledků o absolvovaných mezilaboratorních porovnávacích zkouškách, profesních testech či jiných objektivních zkouškách zaměřených na ověření správnosti prováděných analýz.
24	Předat dokumentace všech ostatních úkonů spojených s expertizou k tomuto případu a neuvedených výše.