

Spezielle Regel zur Umsetzung der DIN EN ISO/IEC 17025 für forensische DNA-Laboratorien

71 SD 3 010 | Revision: 1.3 | 18. März 2016

Geltungsbereich:

Diese spezielle Regel dient der Umsetzung der DIN EN ISO/IEC 17025 für forensische DNA-Laboratorien. Sie orientiert sich an den bisher publizierten Richtlinien der ISFG (International Society for Forensic Genetics), **den Richtlinien der Gendiagnostik-Kommission (GEKO) zur Klärung der Abstammung**, an den ILAC Guidelines for Forensic Science Laboratories und den Empfehlungen der Spurenkommision für Mischspuren und dem Gendiagnostikgesetz.

Änderungen im Vergleich zur vorhergehenden Fassung sind **gelb** hervorgehoben oder mit einer Markierung am Seitenrand versehen.

Datum der Bestätigung durch den Akkreditierungsbeirat: 17.03.2016

In diesem Dokument wird im Interesse der Lesbarkeit grundsätzlich die männliche Form von Funktionsbezeichnungen verwendet; dies schließt die weibliche Form ein.

Inhaltsverzeichnis

1	Zweck / Geltungsbereich	3
2	Begriffe.....	3
3	Beschreibung	4
	Zu 4 Anforderungen an das Management	4
	Zu 5 Technische Anforderungen	4
	Anhang 1 Mindestanforderungen zur Qualitätssicherung für die forensische DNA-Analyse bei Abstammungsuntersuchungen nach GenDG	9
	Anhang 2 Mindestanforderungen zur Qualitätssicherung für die forensische DNA-Analyse bei biologischen Spuren	12
4	Mitgeltende Unterlagen	16
5	Literatur.....	16

1 Zweck / Geltungsbereich

Diese spezielle Regel dient der Umsetzung der DIN EN ISO/IEC 17025 für forensische DNA-Laboratorien. Sie orientiert sich an den bisher publizierten Richtlinien der ISFG (International Society for Forensic Genetics), **den Richtlinien der Gendiagnostik-Kommission (GEKO) zur Klärung der Abstammung**, an den ILAC Guidelines for Forensic Science Laboratories und den Empfehlungen der Spurenkommision für Mischspuren und dem Gendiagnostikgesetz.

Wenn in dieser Regel das Wort „sollte“ verwendet wird, spiegelt die entsprechende Empfehlung den Stand der Technik wider. Wenn ein Labor von dieser Empfehlung abweicht, muss es die Gleichwertigkeit seiner Vorgehensweise darlegen.

2 Begriffe

Siehe DIN EN ISO/IEC 17025 und Allgemeiner Leitfaden zur Umsetzung der DIN EN ISO/IEC 17025 für forensische Laboratorien.

3 Beschreibung

Anwendungsbereich

Forensische DNA-Untersuchungen lassen sich im Wesentlichen in drei Aufgabenbereiche untergliedern, die Untersuchung von Spurenmaterial und Vergleichspersonen für die Strafverfolgung, die Identifizierung unbekannter Toter sowie die Abstammungsbegutachtung. Da die angewandten Methoden in vielerlei Hinsicht übereinstimmen, soll dieser Leitfaden drei Bereiche abdecken.

Die nachfolgenden Nummerierungen beziehen sich auf die Punkte der DIN EN ISO/IEC 17025.

Zu 4 Anforderungen an das Management

Zu 4.12 Lenkung von Aufzeichnungen

4.12.2 Die Datensicherung und Dokumentation der Befunde kann alternativ zur schriftlichen Form auch EDV-gestützt erfolgen, vorausgesetzt, es werden Sicherungskopien angelegt. Hierzu ist ein Archivierungskonzept im Rahmen des Verfahrens zur Lenkung von Aufzeichnungen (inkl. der Überprüfungen und der Befunde) zu erstellen.

Zu 5 Technische Anforderungen

Zu 5.2 Personal

5.2.1 Der Technische Leiter/die Technische Leiterin des Laboratoriums und die als Gutachter/in tätigen Sachverständigen müssen ein abgeschlossenes Hochschulstudium haben, welches Kenntnisse im Bereich Genetik/Molekularbiologie vermittelt und müssen über einschlägige Erfahrung im Gebiet der Molekularbiologie und der forensischen Genetik verfügen. Eine kontinuierliche Fortbildung kann durch Teilnahme an wissenschaftlichen Fachtagungen und durch eigene wissenschaftliche Arbeit belegt werden.

Bei technischem Personal wird eine für Labortätigkeit qualifizierende Berufsausbildung vorausgesetzt. Durch den Leiter des Laboratoriums muss eine regelmäßige Schulung und Einweisung des Personals gewährleistet werden.

Die Aus- und Weiterbildung des Personals (sowohl wissenschaftlich als auch technisch) muss durch Einarbeitungs- bzw. Schulungspläne belegt werden. Hierbei ist die Kompetenz zur Erstellung und Freigabe von Befundberichten von Gutachtern nachzuweisen. Weiterhin ist das Personal darauf hinzuweisen, dass die durchgeführten Untersuchungen und Daten der Vertraulichkeit unterliegen. Diese Weisung ist in schriftlicher Form zu verfassen und zu dokumentieren.

Zu 5.3 Räumlichkeiten und Umgebungsbedingungen

Die räumlichen Gegebenheiten müssen so beschaffen sein, dass Kontaminationen vermieden werden können. Insbesondere sind gesonderte Bereiche für prä-PCR und post-PCR zu definieren, diese Bereiche müssen eine bauliche Trennung aufweisen. Dem prä-PCR-Bereich sind zuzuordnen: Asservateneingang, Spurenvoruntersuchung (inklusive Vortests), ggf. Fotodokumentation, Extraktion der DNA und Ansetzen der PCR. Darüber hinaus sollten in diesem Bereich die Asservate und Vergleichsproben, die DNA-Extrakte und die Reagenzien für die PCR gelagert werden.

Der post-PCR Bereich umfasst die DNA-Quantifizierung mittels Real time PCR, Amplifikation im PCR-Cycler, Probenaufbereitung für die Elektrophorese und die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die Lagerung bzw. Entsorgung der PCR-Amplifikate muss auch in diesem Bereich erfolgen. Eine Rückführung der Amplifikate in den prä-PCR-Bereich ist auszuschließen.

Für das ordnungsgemäße Arbeiten müssen in den jeweiligen Arbeitsbereichen (prä- und post-PCR) die entsprechend notwendigen Geräte vorhanden sein. Es ist darauf zu achten, dass diese Geräte nur in dem jeweiligen Arbeitsbereich verwendet werden.

Der Zugang zu beiden Bereichen muss geregelt und eingeschränkt sein. Besucher und nicht autorisierte Personen dürfen das Laboratorium nur unter Aufsicht betreten.

Alle im Rahmen der Untersuchung von forensischen Spuren verwendeten Einwegmaterialien sollten möglichst für forensische Anwendungen zertifiziert sein. Darüber hinaus sollte seitens des Herstellers eine produktionstechnisch bedingte Kontamination der Verbrauchsmittel mit menschlicher DNA ausgeschlossen sein. In Zusammenarbeit mit der Industrie wird aktuell ein zertifizierbarer Industriestandard (Prüfsiegel: „DNA-frei“) entwickelt.

Zu 5.4 Prüf- und Kalibrierverfahren und deren Validierung

5.4.1 Alle im Laboratorium angewandten Analyseverfahren (Prüfverfahren) müssen validiert sein. Bei kommerziellen Kits, die nach Herstellerangaben verwendet werden, reicht eine Verifizierung aus. Bei Modifikationen des Herstellerprotokolls (z.B. Veränderung des Volumenbereiches bzw. der Zyklenzahl von PCR-Kits) muss eine Validierung erfolgen und dokumentiert werden. Für alle im Laboratorium angewandten akkreditierten bzw. zu akkreditierenden Methoden müssen schriftliche Arbeitsanweisungen vorhanden sein. Diese müssen so verfasst sein, dass technisches Personal nach entsprechender Einweisung damit umgehen kann. Die Protokolle müssen für alle Mitarbeiter jederzeit verfügbar sein und auf dem neuesten Stand gehalten werden.

Zu 5.5 Einrichtungen

5.5.1 Das Laboratorium muss so ausgestattet sein, dass ordnungsgemäße Analysen möglich sind.

Für die STR-Analyse müssen Geräte vorhanden sein, die DNA-Fragmente, die sich in der Länge von einem Basenpaar unterscheiden, als getrennte Signale auflösen.

Für alle Messgeräte und Apparate müssen Bedienungsanleitungen vorhanden sein; diese sollten für alle Mitarbeiter frei zugänglich und verständlich sein.

Zu 5.6 Messtechnische Rückführung

Bei der elektrophoretischen Auftrennung von PCR-amplifizierten STR-Loci muss die Allelzuordnung durch den Vergleich mit einer allelischen Leiter erfolgen.

Diese Leiter muss aus Allelen mit bekannter Sequenz bestehen, alle häufigen Allele enthalten und unter gleichen Elektrophoresebedingungen aufgetrennt werden. Die Lagerung der allelischen Leitern muss im post-PCR Bereich erfolgen. **Die Fragmentlängenbestimmung und Alleltypisierung/zuordnung muss mittels geeigneter und dafür validierter** Software erfolgen und die erforderliche Auflösung (s. 5.5) gewährleisten.

Zu 5.7 Probenahme

Die Probenentnahme für die Untersuchungen kann entweder durch das Laboratorium selbst erfolgen oder aber durch autorisierte auswärtige Institutionen. Alle Proben müssen eindeutig, vollständig und rückführbar gekennzeichnet sein. Die Asservate (ausgenommen sind Hilfsspurenträger wie Abstrich-tupfer und Zigarettenreste) sind zu fotografieren oder ggf. in anderer geeigneter Form darzustellen. Dabei sind Art, Aussehen und ggf. Zustand der Asservate und Spuren sowie die Lage der Spuren am Asservat zu dokumentieren. Für die interne Probenentnahme müssen im Rahmen einer Arbeitsanweisung die Entnahmetechnik und die Dokumentation geregelt sein. Insbesondere sind zu berücksichtigen: Art, Umfang und Zustand des Materials.

Zu 5.8 Handhabung von Untersuchungsmaterialien

5.8.1/2 Bei Eingang des Prüfgegenstandes oder Probenmaterials sind Unregelmäßigkeiten, wie beschädigte Verpackungen, unzureichende oder fehlerhafte Kennzeichnungen oder sonstige Besonderheiten wie bspw. Schimmelbildung etc. zu dokumentieren.

5.8.4 Die Identität des Probenmaterials und der daraus hergestellten Folgeprodukte muss während des gesamten Untersuchungsganges durch korrekte Kennzeichnung sichergestellt sein. Eine lückenlose Dokumentation aller Zwischenprodukte und Untersuchungsgänge muss gewährleistet sein. Laborinterne Abkürzungen müssen eine eindeutige Identifikation ermöglichen. Das Probenmaterial und die daraus hergestellten Folgeprodukte müssen so gehandhabt und gelagert werden, dass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Kontamination oder Degradationsprozesse vermieden wird.

Sichere Lagerungsbedingungen mit kontrolliertem und eingeschränktem Zugang sind erforderlich. Im Rahmen der Lagerung von Probenmaterial und Folgeprodukten für Abstammungsgutachten gelten die Vorgaben des Gendiagnostikgesetzes. Vergleichsproben für die DAD und die daraus extrahierte DNA sind gemäß STPO nach Abschluss der Untersuchungen zu vernichten; hier erfolgt keine langfristige Lagerung. Die Aufbewahrungsfrist für aus biologischen Spuren extrahierte Rest-DNA ist zu regeln, dabei sind Verjährungsfristen zu beachten.

Extrahierte, nicht verbrauchte DNA ist einzufrieren oder so zu lagern, dass eine Nachuntersuchung zu einem späteren Zeitpunkt möglich ist. Amplifikate sind entweder gekühlt oder tiefgefroren aufzubewahren. Sichere Verschlussverhältnisse sind auch hierbei zu gewährleisten. Die Amplifikate müssen grundsätzlich räumlich getrennt von den übrigen Asservaten gelagert werden (siehe Regelungen zu Prä- und Post-PCR-Bereichen).

Eine Aufbewahrungsfrist von 30 Jahren ist für Abstammungsgutachten zu gewährleisten. Archivierungsfristen für Spurengutachten sind unter Beachtung der Verjährungsfristen bzw. sonstiger gesetzlicher Vorgaben zu regeln.

Zu 5.9 Sicherung der Qualität von Untersuchungsergebnissen

Mit dem Probenmaterial muss verantwortungsbewusst, zielgerichtet und sparsam umgegangen werden, um bei ausreichender Menge unabhängige Doppelbestimmungen bzw. Ergänzungsuntersuchungen zu ermöglichen, ohne den Erfolg der Erstuntersuchung zu gefährden. Bei mangelnder Erfolgssaussicht der Erstuntersuchung ist ggf. auf eine Untersuchung zu verzichten und in Erwägung zu ziehen, das Spurenmaterial für verbesserte Analysemöglichkeiten an anderer Stelle oder zu einem späteren Zeitpunkt vorzuhalten.

Bei allen Messungen und Untersuchungen sind positive und negative Kontrollen, allelische Standards, sowie Kontrollen für die Trennqualität der Elektrophorese parallel mitzuführen.

Bei Abstammungsuntersuchungen müssen Ausschlusskonstellationen durch unabhängige Doppelbestimmungen ausgehend vom Originalprobenmaterial bestätigt werden.

Wenn die Menge an Untersuchungsmaterial es ermöglicht und die Fallkonstellation es erfordert, sollten bei Spurenuntersuchungen mindestens zwei PCR-Analysen durchgeführt werden.

Für die Auswertung und Interpretation/Bewertung der Untersuchungsergebnisse müssen im Rahmen einer Arbeitsanweisung Richtlinien erstellt werden. Dabei müssen eindeutige Bewertungskriterien (wie z. B. Akzeptanz- und Ablehnungskriterien) im Hinblick auf die erzielten Befunde formuliert werden, mit deren Hilfe z.B. Mischungen, Stutter-Bands, Artefakt-Peaks etc. erkannt werden können. Diese Kriterien sollten minimale und maximale Peakhöhen für homo- bzw. heterozygote Befunde umfassen, sowie eine Regelung zur Bewertung der Heterozygotenbalance.

Eine regelmäßige **erfolgreiche** Teilnahme an Ringversuchen im Rahmen der externen Qualitätskontrolle ist notwendig und entsprechend zu dokumentieren.

Des Weiteren müssen Maßnahmen zur Vermeidung und Erkennung von Kontaminationen und Probenvertauschung festgelegt und dokumentiert werden.

Zu 5.10 Ergebnisberichte (und Gutachten)

Im Gutachten müssen alle untersuchten Spuren den einzelnen Asservaten eindeutig zuzuordnen sein. Bei der Ergebnismitteilung sollten alle Informationen über die angewandte Untersuchungsmethode enthalten sein, die für die Interpretation der Befunde nötig ist. Der Verbleib bzw. die Rücksendung der Asservate müssen im Gutachten vermerkt sein.

Anhang 1 Mindestanforderungen zur Qualitätssicherung für die forensische DNA-Analyse bei Abstammungsuntersuchungen nach GenDG

Abstammungsuntersuchungen

Die aktuellen Richtlinien der Gendiagnostik-Kommission zur Klärung der Abstammung finden **uneingeschränkt Anwendung**. Neben den Vorgaben zur Entnahme und der Identitätssicherung müssen Nachweise zur Aus- und regelmäßigen Fortbildung und Kompetenz der sachverständigen Person vorliegen.

Probenahme:

Werden Proben extern von nicht-ärztlichen und nicht-sachverständigen Personen entnommen, muss das Labor eine Anleitung für die Probenahmen und die Identitätssicherung zur Verfügung stellen. Nach Möglichkeit sollten Schulungen dieser Personen hinsichtlich Probenentnahme und Identitätssicherungen durchgeführt werden. Hier sei beispielhaft die Entnahme durch Jugendämter genannt. Eine Selbstentnahme durch die Probanden ist grundsätzlich verboten.

Identitätsdokumentation:

Identitätsbögen sollten bei gerichtlichen Gutachten im Original mitgeschickt werden, obligatorisch ist dies jedoch nicht. Bei privaten Gutachten kann frei entschieden werden, ob der Auftraggeber Original oder Kopie erhält.

Eine Ausweiskopie der untersuchten Person ist Bestandteil der Identitätssicherung. Obligatorisch ist die Unterschrift der Probanden auf dem Identitätsbogen. Ein aktuelles Foto sollte gefertigt werden.

Aufklärung/Einverständnis gemäß GenDG:

Privatgutachten: Aufklärung und Einverständniserklärung obligatorisch

Gerichtsgutachten: Aufklärung obligatorisch

Räumlichkeiten / Umgebungsbedingungen:

Bezüglich der Trennung zwischen prä- und post-PCR werden räumlich und organisatorisch insbesondere in Hinsicht der Kontaminationsvermeidung getrennte Bereiche gefordert.

prä-PCR Bereich in dem mit DNA gearbeitet wird (Extraktion) und in dem PCR-Mastermix angesetzt wird.

Der prä-PCR-Platz an dem der PCR-Mastermix hergestellt wird, muss durch geeignete Maßnahmen vor DNA-Kontaminationen geschützt werden (z.B. getrennte Pipettensätze).

Der post-PCR-Bereich umfasst PCR-Cycler, **rt-PCR-Gerät** und Sequencer.

Vertauschkontrollen / Bestätigungsanalysen:

Im Ausschlussfall sind Putativvater und Kind unter Einbeziehung der Originalprobe (üblicherweise "B"-Probe) erneut zu untersuchen.

Bei Einschluss-Szenarien muss die Vertauschung eines kompletten Trios/Duos ausgeschlossen werden können. Dies kann durch Kontrolleextraktionen oder strukturelle Maßnahmen (z.B. 4-Augen Prinzip beim Probenansatz) geschehen.

Validierungs- und Verifizierungsstudien

Validierungs- und Verifizierungsstudien müssen bei Reagenzien, die neu im Labor eingeführt werden, bzw. bei geänderten Laborprotokollen vorgenommen werden. Bei neuen Kits, die nach Herstellerangaben eingesetzt werden, reicht eine Verifizierungsstudie aus. Werden Modifikationen des vom Hersteller validierten Standardprotokolls vorgenommen, ist eine Validierung erforderlich (s.u.).

Für eine Validierungs- bzw. Verifizierungsstudie müssen Freigabekriterien schriftlich (=Validierungs- bzw. Verifizierungsplan) festgelegt werden. Aus den Unterlagen (=Validierungs- bzw. Verifizierungsbericht) muss hervorgehen, dass diese Kriterien erfüllt sind und dass das Verfahren für die Routine freigegeben wurde. Validierungs- bzw. Verifizierungskriterien sind zum Beispiel bei einem STR-Kit die Sensitivität, die Heterozygotenbalance und die Loci-Balance. Diese Parameter sollen anhand der beobachteten Peak-Höhen ermittelt werden (Mittelwert und Standardabweichung). Die Konkordanzanalyse der erhaltenen Genotypen allein ist in der Regel nicht ausreichend. Validierungs- bzw. Verifizierungsstudien sind auch die Grundlage zur Ermittlung der Freigabekriterien für Homo- und Heterozygotie (drop-out-Grenze); auch dies sollte aus dem Validierungs- bzw. Verifizierungsbericht hervorgehen. Die Reduktion des vom PCR-Kit-Hersteller validierten PCR-Reaktionsvolumens erfordert eine eigenständige Validierung.

Folgenden Umfang sollten Validierungsstudien mindestens haben

- Vergleich von mindestens 10 Proben/Elektropherogrammen nach PCR-Kit-Herstellerbedingungen mit den PCR-Ergebnissen zu den veränderten Konditionen, bzw. den PCR-Ergebnissen des zuvor verwendeten Kits (Vergleichskriterien siehe oben).
- Zusätzlich wird eine DNA-Verdünnungsreihe gefordert, die die drop-out-Grenze bei veränderten Bedingungen validiert. Hier sollten, ausgehend von der üblicherweise eingesetzten DNA-Menge, Verdünnungsschritte um den Faktor 2 bis zur Nachweisgrenze erfolgen (z.B. 1 ng, 500 pg, 250 pg, 125 pg, 60 pg).

Für besondere Bedingungen, z.B. extrem reduziertes Volumen, kann der Auditor (Fachbegutachter) einen höheren Umfang verlangen.

Folgenden Umfang sollten Verifizierungsstudien von Analysen gemäß PCR-Kit-Herstellerangaben haben:

- Analyse von Proben aus zwei DGAB-Ringversuchen (oder adäquate Proben in entsprechender Anzahl - Kriterien siehe oben).
- eine Verdünnungsreihe (z.B. 1 ng, 500 pg, 250 pg, 125 pg, 60 pg) zur Validierung der Nachweisgrenze.

Für Nachfolge-Produkte der kommerziellen Kits ist je nach Ausmaß der durch den Hersteller vorgenommenen Kit-Änderung eine Ergänzung der Verifizierung bzw. Validierung oder eine vollständige Verifizierung/Validierung nötig. Eine vollständige Verifizierung/Validierung ist dann erforderlich, wenn eine maßgebliche Kitänderung durch den Hersteller erfolgt ist (z.B. Standard STR Kit gegen STR Kit mit FAST Protokoll). Eine Ergänzung der Verifizierung/Validierung reicht bei lediglich geringfügigen Kit-Änderungen aus (z.B. Produktupdate, einzelne veränderte Primer).

Für die Verifizierung/Validierung der Nachfolgeprodukte kann auf einen Test gegen das vom Hersteller validierte Standardprotokoll verzichtet werden. In diesen Fällen reicht es aus, wenn der neue Kit gegen die Reaktionsbedingungen des alten Kits getestet wird (z.B. sofortiger Test mit reduziertem PCR-Volumen).

Schulungsmaßnahmen/Kompetenzprüfung

Der Besuch der Tagungen der DGAB und der DGAB-Workshops wird empfohlen.

Für technische Angestellte sind interne Schulungen durchzuführen, die fachspezifische Inhalte umfassen.

Eine Teilnahme an **zwei Ringversuchen pro Jahr** zur DNA-Typisierung sowie **den** Biostatistik-**Ringversuchen** (z.B. DGAB) gemäß GenDG ist obligatorisch.

Bei Verfahren, für die (noch) kein Ringversuch angeboten wurde, ist neben einer Validierung mindestens ein jährlicher Labor-zu-Labor - Vergleich erforderlich.

Im Gutachten sind zumindest die verwendeten PCR-Kits anzugeben. Beim Standardgutachten (Trio-fall, ggf. Duofall) sind fakultativ die Rechenmethode, Fragestellung / Hypothesen anzuführen. Bei komplexen Abstammungsuntersuchungen (z.B. Defizienzfälle) müssen die Hypothesen angegeben werden.

Anhang 2 Mindestanforderungen zur Qualitätssicherung für die forensische DNA-Analyse bei biologischen Spuren

Labore, die sich erstmals für Spurenuntersuchungen akkreditieren wollen, müssen mindestens 50 Gutachten von selbst angelegten Spurenfällen (Testgutachten), die die forensisch relevanten Spurenarten (z.B. Blut, Sperma, Speichel, Hautabrieb) inkl. Vortests umfassen, inkl. biostatistischer Bewertung von (Misch)spuren und Personenabgleichen vorlegen können. Die Testfälle müssen häufige Spurenarten und Asservate (z.B. Abriebspuren, Zigarettenkippen, Kleidung, Getränkedosen etc.) sowie unterschiedliche Spurenanzahlen umfassen, so dass sowohl einfache als auch komplexe Szenarien simuliert werden. Hierbei sind auch DNA-Proben mit sehr geringem DNA-Gehalt („low template DNA“) zu berücksichtigen. Empfohlen wird, die Testgutachten in Zusammenarbeit mit und unter der Kontrolle/Aufsicht von einem auf diesem Gebiet langjährig erfahrenen Gutachter/Labor zu erstellen („Mentorenprogramm“). Das Labor muss die erfolgreiche Teilnahme an mindestens zwei Ringversuchen mit Spuren- und Vergleichsproben, biostatistischer Berechnung sowie Spurencharakterisierung belegen können.

Im Weiteren wird empfohlen, dass der technische Leiter zuvor eine mehrwöchige (4 - 6 Wochen) aktive Hospitation in einem etablierten und akkreditierten Spurenlabor absolviert hat. Fundierte Kenntnisse der Methoden zur Spurenartcharakterisierung und Spurensuche, der Auswertung und Interpretation von DNA-Spurenprofilen, insbesondere von Minimalspuren sowie der biostatistischen Bewertung von Mischspuren inkl. der populationsgenetischen Grundlagen, sowie dazugehöriger Software und Auswertekriterien müssen vorliegen.

Probenvertauschungssicherheit

Die Probenvertauschungssicherheit soll durch geeignete Maßnahmen in der Spuren- und Vergleichsprobenanalyse gewährleistet werden (z.B. 4-Augen-Prinzip, Doppelbestimmungen, Batchkontrollen, Automatisierung).

Räumlichkeiten / Umgebungsbedingungen / Kontaminationsvermeidung:

Asservate und Spuren sind in geeigneter Weise zu dokumentieren (z.B. durch Fotos, Skizzen, Beschreibung).

Gefordert werden geeignete Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung (Kittel, Handschuhe, Mundschutz, Häubchen) für den gesamten Prä-PCR-Bereich (Spurenabnahme, Spurenansatz, DNA-Extraktion, PCR-Ansatz).

Zur **Kontaminationsvermeidung** (d.h. insbesondere die Vermeidung der Verschleppung von amplifizierter DNA in den prä-PCR-Bereich, bzw. in den Master-Mix-Bereich) ist eine strikte räumliche und organisatorische Trennung (z.B. durch getrennte Pipettensätze, Kittel, Handschuhe, angemessene Arbeitsabläufe) des prä-PCR-Bereichs (s.o.) und post-PCR-Bereichs (PCR-Geräte, DNA-Sequenzer, Elektrophorese, etc.) erforderlich.

Für die Bearbeitung von Mt-DNA-Proben müssen die Räumlichkeiten und der Arbeitsprozess der erhöhten Kontaminationsgefahr angepasst sein. Jedes PCR-Produkt muss bei der Sequenzierung in beide Richtungen analysiert werden.

Es muss eine räumliche oder zeitliche Trennung der Bearbeitung von Spuren und Vergleichsproben (Tatverdächtige, Berechtigte, DAD-MHAs) erfolgen und geregelt sein. Gleiches gilt für Opfer- und Täterkleidung aus dem gleichen Fall.

Einzel/Doppel PCR-Ansatz:

Zur Quantifizierung der Human-DNA-Menge einer Spur kann eine einzige QPCR (Realtime-PCR) mit entsprechenden Kontrollen ausreichend sein.

Die Doppel-PCR für STR-PCR-Analysen ist bei Spuren Standard. Eine Einfachanalyse kann unter besonderen Umständen ausreichend sein (z.B. zahlreiche übereinstimmende DNA-Profile innerhalb eines Falles, Massenscreening).

Validierungs- und Verifizierungsstudien

Validierungs- und Verifizierungsstudien müssen bei Reagenzien, die neu im Labor eingeführt werden, bzw. bei geänderten Laborprotokollen vorgenommen werden. Bei neuen Kits, die nach Herstellerangaben eingesetzt werden, reicht eine Verifizierungsstudie. Werden Modifikationen des vom Hersteller validierten Standardprotokolls vorgenommen, ist eine Validierung erforderlich (s.u.).

Für eine Validierungs- bzw. Verifizierungsstudie müssen Freigabekriterien schriftlich (=Validierungs- bzw. Verifizierungsplan) festgelegt werden. Aus den Unterlagen (=Validierungs- bzw. Verifizierungsbericht) muss hervorgehen, dass diese Kriterien erfüllt sind und dass das Verfahren für die Routine freigegeben wurde. Validierungs- bzw. Verifizierungskriterien sind zum Beispiel bei einem STR-Kit die Sensitivität, die Heterozygotenbalance und die Loci-Balance. Diese Parameter sollen anhand der beobachteten Peak-Höhen ermittelt werden (Mittelwert und Standardabweichung). Die Konkordanzanalyse der erhaltenen Genotypen allein ist in der Regel nicht ausreichend. Validierungs- bzw. Verifizierungsstudien sind auch die Grundlage zur Ermittlung der Freigabekriterien für Homo- und Heterozygotie (drop-out-Grenze), auch dies sollte aus dem Validierungs- bzw. Verifizierungsbericht hervorgehen. Die Reduktion des vom PCR-Kit-Hersteller validierten PCR-Reaktionsvolumens erfordert eine eigenständige Validierung.

Folgenden Umfang sollten Validierungsstudien mindestens haben

- 5x Mischungen von 2 bekannten Vergleichspersonenproben in verschiedenen Verhältnissen, z.B. 50:50, 70:30, 90:10, 95:5, 99:1
- eine DNA-Verdünnungsreihe mit mindestens fünf Reduktionsstufen (z.B. 1 ng, 500 pg, 125 pg, 60 pg, 30 pg). Zusätzlich sind mindestens zwei weitere Verdünnungsreihen mit den modifizierten Bedingungen (z.B. reduziertes PCR-Volumen) zur Validierung der drop-out-Grenze durchzuführen.
- 10 x repräsentative Proben, darunter mindestens 5 authentische low template Proben (z.B. Mischspuren-Hautkontaktabriebe).

Für besondere Bedingungen, z.B. extrem reduziertes Volumen, kann der Auditor (bzw. Fachbegutachter) einen höheren Validierungsumfang verlangen.

Folgenden Umfang sollten Verifizierungsstudien von Analysen gemäß PCR-Kit-Herstellerangaben haben:

- Analyse von Proben aus zwei GEDNAP-Ringversuchen (oder adäquate Proben in entsprechender Anzahl)
- 5 Verdünnungen (z.B. 1 ng, 500 pg, 125 pg, 60 pg, 30 pg) zur Validierung der drop-out-Grenze

Für Nachfolge-Produkte der kommerziellen Kits ist je nach Ausmaß der durch den Hersteller vorgenommenen Kit-Änderung eine Ergänzung der Verifizierung bzw. Validierung oder eine vollständige Verifizierung/Validierung nötig. Eine vollständige Verifizierung/Validierung ist dann erforderlich, wenn eine maßgebliche Kitänderung durch den Hersteller erfolgt ist (z.B. Standard STR Kit gegen STR Kit mit FAST Protokoll). Eine Ergänzung der Verifizierung/Validierung reicht bei lediglich geringfügigen Kit-Änderungen aus (z.B. Produktupdate, einzelne veränderte Primer).

Für die Verifizierung/Validierung der Nachfolgeprodukte kann auf einen Test gegen das vom Hersteller validierte Standardprotokoll verzichtet werden. In diesen Fällen reicht es aus, wenn der neue Kit gegen die Reaktionsbedingungen des alten Kits getestet wird (z.B. sofortiger Test mit reduziertem PCR-Volumen).

Validierung der Schwellenwerte bei real-time PCR:

Wenn Schwellenwert-Validierungen mit dem Ziel durchgeführt werden, Proben unterhalb dieses Wertes als negativ mitzuteilen, muss eine Probenzahl untersucht werden, die eine aussagekräftige Statistik vor allem im unteren Grenzbereich zulässt. Hierzu sind mind. 100 Human-DNA-Proben mit DNA-Konzentrationen im unteren Grenzbereich (stochastischer Bereich) zu analysieren. Es sind dabei auch DNA-Verdünnungsreihen von mind. 5 verschiedenen Personen/Spuren mit genau definierten DNA-Konzentrationen im unteren Grenzbereich (z.B. 5 pg, 10 pg, 20 pg, 50 pg, 100 pg) zu analysieren. Die Validierung muss bezogen auf das Kit erfolgen, mit dem aktuell im Labor die DNA-Typisierungsergebnisse erhalten werden.

Schulungsmaßnahmen/Kompetenzprüfung

Der Besuch fachspezifischer Tagungen (z.B. ISFG, GEDNAP) wird empfohlen. Für technische Angestellte sind interne Schulungen durchzuführen, die fachspezifische Inhalte umfassen.

Eine Teilnahme an Ringversuchen zur DNA-Typisierung und zur biostatistischen Berechnung (z.B. GEDNAP) ist **verpflichtend**. Bei Verfahren, für die (noch) kein Ringversuch angeboten wurde, ist neben einer Validierung mindestens ein jährlicher Labor-zu-Labor - Vergleich erforderlich.

Im Laborprotokoll oder Gutachten obligatorisch anzugebende Methodik:

DNA-Extraktionsverfahren, Quantifizierung, PCR-Kits

4 Mitgeltende Unterlagen

Nicht belegt

5 Literatur

- ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- Allgemeiner Leitfaden zur Umsetzung der DIN EN ISO/IEC 17025 für forensische Laboratorien (Deutsche Übersetzung des ILAC Guidelines for Forensic Laboratories)
- Gendiagnostik-Kommission beim Robert Koch-Institut (2011) Richtlinie der Gendiagnostik-Kommission (GEKO) zu den Anforderungen an die Inhalte der Aufklärung gemäß § 23 Abs. 2 Nr. 3 GenDG bei genetischen Untersuchungen zur Klärung der Abstammung. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 2011; 54 (11): 1242-1247. (URL: http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/GendiagnostikKommission/Richtlinien/RL-AufklaerungAbstammung.pdf?__blob=publicationFile, zugegriffen am 29.09.2015).
- Gendiagnostik-Kommission beim Robert Koch-Institut (2012) Richtlinie der Gendiagnostik-Kommission (GEKO) für die Anforderungen an die Durchführung genetischer Analysen zur Klärung der Abstammung und an die Qualifikation von ärztlichen und nichtärztlichen Sachverständigen gemäß § 23 Abs. 2 Nr. 4 und Nr. 2b GenDG. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 2013; 56 (1): 169–175. (URL: http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/GendiagnostikKommission/Richtlinien/RL_Qualifikation_Abstammungsbegutachtung.pdf?__blob=publicationFile, zugegriffen am 29.09.2015).
- Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, Carracedo A, Guidet F, Luque JA, Lessig R, Mayr WR, Pascali VL, Prinz M, Schneider PM, Morling N. (2007) ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. Forensic Sci Int Genet. 1: 223-231
- Morling N, Allen RW, Carracedo A, Geada H, Guidet F, Hallenberg C, Martin W, Mayr WR, Olaisen B, Pascali VL, Schneider PM. (2002) Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics. Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. Forensic Sci Int. 129: 148-157
- Allgemeine Empfehlungen der Spurenkommission zur Bewertung von DNA-Mischspuren, Rechtsmedizin (2006) 16: 401-404

- Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten – Novellierung 2002. Deutsches Ärzteblatt 99. Jahrgang, Heft 10, Seiten 665-667
- Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA, de Knijff P, Kayser M, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Olaisen B, Pascali V, Prinz M, Roewer L, Schneider PM, Sajantila A, Tyler-Smith A (2001) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. Int J Leg Med 114, 305-309
- Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider PM, Tully G, Wilson M (2000) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Int J Legal Med 113: 193-196
- Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B. (1997)
- DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. Int J Legal Med 110: 175-176
- Editorial (1993): Statement by DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics concerning the National Academy of Sciences report on DNA Technology in Forensic Science in the USA. Forensic Sci Int 59: 1-2.
- Editorial (1992) DNA recommendations - 1992 report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. Int J Legal Med 105: 63-64
- Editorial (1992): Second DNA recommendations. 1991 report concerning recommendations of the DNA commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of DNA polymorphisms. Int J Legal Med 104:361-364
- Editorial (1992) Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. Forensic Sci Int. Jul; 55(1):1-3.
- Editorial (1989): Recommendations of the Society for Forensic Haemogenetics concerning DNA polymorphisms. Forensic Sci. Int. 1989, 43:109-111
- EU-Ratsbeschluss vom 30. November 2009: „European Union Council Framework Decision 2009 on Accreditation of forensic service providers carrying out laboratory activities“ (Document 15905/09) <http://register.consilium.europa.eu/pdf/en/09/st15/st15905.en09.pdf>