

Uso da biologia molecular nas ciência forense

Use of molecular biology in forensic science

Maria Lucia Sala^a, Erik Cendel Saenz Tejada^b

a: Graduada em Biomedicina no Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Biólogo, Universidad Nacional Federico Villareal/Peru, Doutor em Bioquímica Instituto de Química da USP, Brasil

RESUMO

As ferramentas de biologia molecular aumentaram a capacidade do cientista forense de caracterizar evidências biológicas a ponto de ser possível analisar amostras minúsculas e atingir altos níveis de individualização. Neste estudo de caso, descreveu-se as principais evidências biológicas forenses que estão sendo ou provavelmente serão preenchidas por ferramentas de biologia molecular. Os dados coletados do estudo apontam resultados como as lacunas de conhecimento e novas direções foram identificadas onde a biologia molecular provavelmente guiará o campo da ciência forense. Identificamos algumas dessas áreas onde é necessário mais desenvolvimento: melhorar os limites atuais de tipagem de amostras de baixa quantidade e qualidade; melhorar a eficiência da recuperação e extração de amostras; converter STRs atuais em mini-STRs; selecionar e validar novos mini-STRs; selecionar e validar uma variedade de SNPs para diferentes aplicações; intensificação da multiplexação; desenvolvimento de automação para alto rendimento; desenvolvimento de sistemas especialistas para interpretação de dados; desenvolver capacidades de sequenciamento para triagem de genomas de microrganismos; e testes de campo. Concluimos que o futuro da biologia molecular para a ciência forense é empolgante e dinâmico. Ainda há muito a ser conquistado e os desenvolvimentos da biologia molecular serão essenciais para auxiliar na resolução de crimes e na identificação de desaparecidos.

Descritores: ciência forense, biologia molecular, perícia microbiana

ABSTRACT

Molecular biology tools have increased the forensic scientist's ability to characterize biological evidence to the point where it is possible to analyze tiny samples and achieve high levels of individualization. In this case study, we describe key forensic biological evidence that is being or is likely to be filled in by molecular biology tools. Data collected from the study point to results such as knowledge gaps and new directions were identified where molecular biology is likely to guide the field of forensic science. We identified some of these areas where further development is needed: improving current typing limits for low quantity and quality samples; improve the efficiency of sample recovery and extraction; convert current STRs into mini-STRs; select and validate new mini-STRs; select and validate a variety of SNPs for different applications; multiplexing enhancement; development of automation for high throughput; development of expert systems for data interpretation; develop sequencing capabilities for screening microorganisms genomes; and field tests. We conclude that the future of molecular biology for forensic science is exciting and dynamic. There is still much to be achieved and the developments in molecular biology will be essential to help solve crimes and identify missing people.

Descriptors: forensic science, molecular biology, microbial expertise

INTRODUÇÃO

A ciência forense adotou o uso de ferramentas de biologia molecular de DNA para fins de diagnóstico mais do que qualquer outro campo científico. A disciplina foi impulsionada pela necessidade de técnicas de teste de identidade humana de alta resolução. Nos últimos 20 a 25 anos, a ciência forense desenvolveu e implementou várias tecnologias robustas e confiáveis de tipagem de DNA¹⁻².

Os sucessos permitiram a tipagem confiável de quantidades extremamente mínimas de DNA, com um poder de resolução tal que, em muitos casos, o número de contribuintes de amostras de evidências pode ser reduzido a alguns indivíduos, se não apenas uma fonte. Além disso, as ferramentas de biologia molecular forense são muito confiáveis devido aos requisitos de validação bem definidos³⁻⁴.

Dada a maturidade do campo forense, pode-se supor que mudanças drásticas na tecnologia não serão buscadas e apenas refinamentos serão adotados. Há menos demandas a serem atendidas tecnologicamente; na verdade, a capacidade de digitar rotineiramente amostras como uma bituca de cigarro ou um único fio de cabelo excedeu as expectativas da maioria dos cientistas que começaram a usar ferramentas de biologia molecular para caracterizar evidências biológicas forenses³⁻⁴.

Em vez de usar a análise de polimorfismo de comprimento de restrição por métodos de hibridização baseados em Southern blot, os cientistas no campo agora estão usando rotineiramente métodos baseados em PCR juntamente com tecnologias automatizadas de detecção fluorescente⁵. O uso de bancos de dados de amostras de DNA ofensivo e forense contribui para a relutância em mudar. Esses bancos de dados foram desenvolvidos para ajudar a investigar crimes futuros e foram padronizados em um conjunto básico de loci de repetição em tandem curta (STR) ou loci de microssatélites⁵⁻⁶.

Devido ao tamanho desses bancos de dados [por exemplo, há mais de 6 milhões de perfis de referência no banco de dados do Sistema de Índice de DNA combinado (CODIS) dos Estados Unidos, há um movimento substancial para manter apenas o repertório atual de marcadores genéticos centrais⁶. Além disso, devido ao gasto substancial de recursos para validar sistemas analíticos de biologia molecular, para equipar um laboratório e para educar e formar profissionais proficientes; assim como os esforços empreendidos para obter admissibilidade no tribunal, os cientistas forenses tendem a não mudar rapidamente as metodologias sólidas⁷.

Pode-se prever, portanto, que provavelmente não haverá mudanças dramáticas nas ferramentas de biologia molecular usadas na ciência forense. Tal visão, no entanto, seria míope porque existem várias áreas onde a biologia molecular poderia oferecer melhorias para

as capacidades do cientista forense. De fato, cabe ao cientista forense estar vigilante e adotar novas tecnologias que beneficiem a sociedade por sua capacidade de analisar amostras mais desafiadoras em um esforço para continuar a inocentar inocentes, aprimorar as habilidades para solucionar crimes e identificar pessoas desaparecidas ⁷.

Com o sucesso da análise, há motivação para tentar analisar amostras mais difíceis, como amostras de traços denominadas DNA de toque ou baixo número de cópias (LCN). Os bancos de dados de DNA podem não ter sido totalmente explorados e podem fornecer pistas para novas questões investigativas. Além disso, o campo recentemente desenvolvido de análise forense microbiana explorará tecnologias de alta resolução e alto rendimento além daquelas necessárias para a identificação humana ⁸.

Portanto, o futuro da biologia molecular na ciência forense ainda promete ser dinâmico. Prever o futuro nunca é exato e as tecnologias de salto fundamentais não são óbvias. Trinta anos atrás, poucos teriam previsto o método de PCR e o impacto que teve na biologia molecular ⁸.

Neste estudo descreveu-se as principais evidências biológicas forenses que estão sendo ou provavelmente serão preenchidas por ferramentas de biologia molecular.

MÉTODO

O método utilizado descreve as principais evidências biológicas forenses com base em artigos relacionados ao tema. Sendo utilizado para pesquisa no idioma inglês, foram também utilizados unitermos como Ciência forense, Biologia molecular, Perícia microbiana. Os critérios de inclusão para a seleção de artigos científicos foram: título, resumo, desenvolvimento, análise forense microbiana e sequenciamento de alto rendimento, automação e teste de campo, com preferência para datas recentes.

DESENVOLVIMENTO

Análise forense microbiana e sequenciamento de alto rendimento

A ameaça do uso terrorista ou criminoso de microrganismos e suas toxinas é uma grande preocupação para a biodefesa e a biossegurança em todo o mundo (64,65). O ataque de cartas com antraz de 2001 demonstrou a vulnerabilidade do público a tais ataques e a incapacidade do governo dos EUA de investigar forensemente as evidências para fins de atribuição ⁹.

Isso resultou no nascimento do campo da perícia microbiana. A análise forense microbiana é uma subdisciplina em evolução da ciência forense para analisar evidências de um ato de bioterrorismo, biocrime, fraude ou uma liberação inadvertida para fins de atribuição ⁹.

De muitas maneiras, a perícia microbiana não é um campo novo; suas bases e práticas são derivadas de abordagens semelhantes estabelecidas em saúde pública e epidemiologia. A diferença entre forense microbiana e epidemiologia é que a primeira deseja individualizar ainda mais uma amostra. No entanto, as análises forenses microbianas devem abranger o manuseio de amostras, coleta, preservação, seleção de métodos, análise de casos, interpretação de resultados, validação e garantia de qualidade ¹⁰.

Genética molecular, genômica e informática serão centrais para identificação de espécies/estirpes, determinação de virulência, caracterização de patogenicidade e atribuição de fonte. O máximo em atribuição de fonte é ser capaz de individualizar uma amostra de forma que ela possa ser rastreada até uma fonte única. Isso é improvável com os recursos atuais e pode não ser possível em muitos casos devido à natureza das amostras microbiológicas. As investigações epidemiológicas tendem a se concentrar na resolução de espécies e níveis de cepas, que são informações úteis para uma investigação forense microbiana ¹⁰.

No entanto, a ciência forense se esforça para individualizar as amostras: para o ataque de letras de antraz, uma técnica de análise de repetição em tandem de número variável multi-locus (VNTR) foi usada para identificar a bactéria *Bacillus anthracis* como aquela da cepa Ames. Embora os dados da cepa tenham direcionado adequadamente a investigação para fontes laboratoriais, a diferenciação de amostras de laboratório estreitamente relacionadas da mesma cepa foi muito mais desafiadora. Para casos futuros, a tecnologia é necessária para facilitar a identificação desses SNPs únicos, duplicações, exclusões, inserções ou rearranjos – se existirem, que individualizarão melhor as amostras e ajudarão a focar uma investigação¹¹.

Ao contrário da identificação humana, onde um conjunto central padronizado de loci pode ser usado para diferenciar indivíduos, o(s) marcador(es) microbiano(s) forense(s) para individualização será(ão) desconhecido(s) e específico(s) do caso. O sequenciamento de todo o genoma é o método preferido para descobrir a variação genética de valor forense ¹¹⁻¹².

A abordagem mais eficaz para a descoberta abrangente de variação genética, que foi usada nas investigações de cartas de antraz ¹², foi por sequenciamento shotgun de alto rendimento explorando o sequenciamento de Sanger ¹³. Embora considerado o padrão ouro da tecnologia de sequenciamento, esse método é trabalhoso, caro, tem cobertura relativamente baixa e apresenta problemas de viés de amostra. Se o resequenciamento de todo o genoma fosse desejado para um repositório de amostras (de algumas a milhares), o custo seria proibitivo. Portanto, são necessários avanços na tecnologia de sequenciamento que aumentem a precisão e a velocidade, reduzam os custos e maximizem a eficiência da análise forense. O resequenciamento de hibridização [como a tecnologia de chip desenvolvida pela Affymetrix

(Santa Clara, CA, EUA)] permite que um número extremamente grande de sondagens seja realizado simultaneamente e forneceria resultados rápidos para a digitação ¹⁴.

Mas, a tecnologia de chip de hibridização pode não ter a sensibilidade de detecção necessária para aplicações forenses. A espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF), que explora a massa absoluta de uma molécula de ácido nucleico como uma propriedade intrínseca, oferece vantagens sobre as abordagens de hibridização e eletroforese: MALDI-TOF não é sujeito aos caprichos de anomalias eletroforéticas e estrutura secundária de DNA, e não requer moléculas de marcação para detecção. No entanto, não pode ser usado para sequenciar genomas inteiros ¹⁵.

No entanto, as abordagens de molécula única podem ter problemas de amostragem que precisarão ser abordados e as tecnologias atuais, estando mais na fase de prova de conceito, estão longe de serem robustas. É difícil prever quais tecnologias serão selecionadas para análise forense microbiana, mas o sequenciamento de baixo custo, alta cobertura, baixo erro e alto rendimento de genomas de microrganismos inteiros será uma necessidade para apoiar o desenvolvimento dos ensaios de atribuição forense microbiana mais eficazes ¹⁵.

Automação

As demandas de geração, entrada e manutenção de perfis de DNA em um banco de dados nacional de DNA impulsionaram o desenvolvimento da automação. O número de amostras de referência de criminosos condenados, detidos e pessoas desaparecidas continua a aumentar, e a carga é tal que essas amostras não podem continuar a ser digitadas e revisadas manualmente. Robótica e produtos químicos modificados mais adequados para processos automatizados foram desenvolvidos para aumentar o rendimento e os esforços continuarão a melhorar a eficiência da automação ¹⁶⁻¹⁷.

A automação oferece controle de qualidade, resultados consistentes e gerenciamento de dados com menores custos operacionais. Ao remover o componente humano do processo, os resultados tendem a ser mais consistentes e de alta qualidade. O erro é reduzido principalmente ao minimizar a chance de troca de amostra e contaminação residual. Os desenvolvimentos de software permitem o rastreamento do manuseio de amostras ao longo do processo. Volumes de reagentes mais baixos se traduzem em menos consumíveis e menos desperdício. A maior parte da automação concentrou-se na extração de DNA de amostras de referência padrão e algumas estenderam a aplicação a amostras de casos como ossos, cabelos, dentes, pontas de cigarro e esperma. As plataformas robóticas variam e incluem a estação de trabalho robótica Tecan Genesis RSP 150/8 e as estações de manuseio

de líquidos *Tecan Freedom EVO* (Tecan, *Mannedorf*, Suíça), a estação de trabalho de automação *Biomek 2000* (*Beckman Coulter*, *Fullerton*, CA, EUA), o *Plato 3000* sistema robótico (*Rosys/Anthos AG*, *Hombrechtikon*, Suíça) e a estação de trabalho *BioRobot EZ1 System* e *BioRobot 8000* (*Qiagen*, *Dusseldorf*, Alemanha), para citar alguns ¹⁶⁻¹⁸.

O desenvolvimento e implementação de estações de trabalho robóticas requerem químicas alternativas para extração. Algumas partes de uma extração manual não são facilmente acomodadas por um sistema robótico, como extração por solvente orgânico, centrifugação e fervura. Químicas de extração em fase sólida, como o DNA IQ (Promega, Madison, WI, EUA) (92) e o *Qiagen EZ1*, *QIASymphony Investigator Kit* e *QIAamp Investigator BioRobot Kit* (*Qiagen*) foram adotados para facilitar a automação da extração ¹⁶⁻¹⁹⁻²⁰.

É importante quantificar o DNA e normalizar a quantidade que é usada na PCR para obter resultados de tipagem mais consistentes. Greenspoon e cols ¹⁹ usaram a mesma plataforma robótica (a estação de trabalho de automação *Biomek 2000*) para extração, quantificação de DNA e configuração de PCR, automatizando três partes do processo antes da etapa de PCR. Além disso, os extratos de DNA restantes são transferidos diretamente para tubos de armazenamento para arquivamento de longo prazo. A automação foi e continuará a ser desenvolvida para os protocolos encontrados no laboratório forense. No entanto, esses sistemas robóticos são abordagens de macroescala que ainda precisam capitalizar os benefícios potenciais das tecnologias de microescala (consulte a seção “Testes de campo”). A análise forense do DNA mitocondrial (mtDNA) geralmente fornece resultados para amostras em que as análises de marcadores autossômicos nucleares são difíceis ou impossíveis (como ossos velhos, dentes e fios de cabelo) ⁷.

A tipagem geralmente envolve a amplificação por PCR de duas regiões curtas do mtDNA chamadas regiões hipervariáveis 1 e 2 (HV1 e HV2), seguidas pelo sequenciamento direto dos produtos de PCR pelo sequenciamento de Sanger. Este processo é trabalhoso, demorado e caro. Além disso, a análise de dados pode ser confundida por artefatos de sequência, anomalias eletroforéticas, presença de heteroplasmia (ou seja, a presença de mais de uma variante do genoma mitocondrial em um indivíduo) e capacidade limitada de quantificar os componentes de uma amostra mista. Recentemente, a PCR multiplex seguida por espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por eletrospray (ESI-TOF-MS) demonstrou ser aplicável para tipagem das regiões hipervariáveis do mtDNA humano, expandindo o potencial de discriminação de um ensaio além do direcionamento específico de SNP ²¹.

Além disso, amostras heteroplásmicas podem ser analisadas e a quantidade relativa dos componentes de amostras mistas pode ser determinada (Figura 2). O T5000 Biosensor (*Ibis*

Biosciences Inc., Carlsbad, CA, EUA) combina estações de trabalho robóticas para PCR e limpeza de amostras (ou seja, dessalinização) com espectrometria de massa, de modo que a tipagem de mtDNA pode ser realizada com pelo menos 10 vezes aumento no rendimento e uma redução de 5 vezes no custo do reagente, sem perda de sensibilidade e pouca ou nenhuma perda de informação em comparação com o sequenciamento tradicional. Esta plataforma é promissora para acomodar facilmente outros ensaios de marcadores genéticos²².

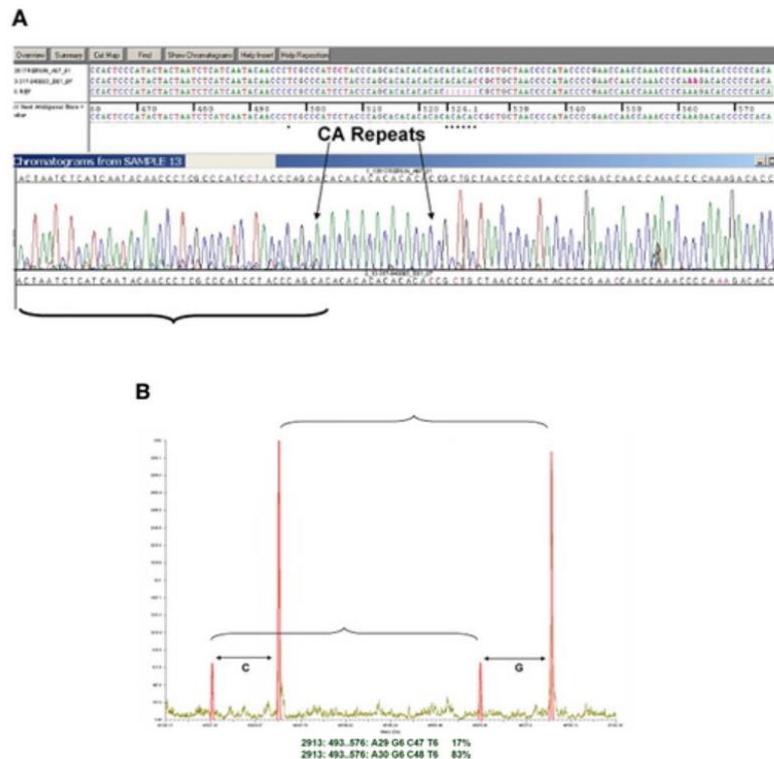


Figura 2. Uma sequência direta por sequenciamento de Sanger exibindo a fita reversa das duas fitas do amplicon de DNA mitocondrial

(A) A região hipervariável 3 da região não codificante do genoma mitocondrial humano contém uma região de repetição de dinucleotídeo CA. A heteroplasma, provavelmente devido ao deslizamento, é o resultado de duas espécies de DNA mitocondrial que diferem no número de repetições CA. A sequência a jusante da região heteroplásmica CA não é interpretável (colchete) para o componente menor. (B) A análise baseada em espectrometria de massa do amplicon detecta ambas as espécies que diferem por uma repetição CA e pode medir com precisão e simultaneamente a abundância relativa dos componentes. A composição de base e as quantidades relativas para ambas as espécies são exibidas. Figura gentilmente cedida por L. McCurdy, FBI Laboratory, Quantico, VA, EUA.

Teste de Campo

Existe algum interesse na capacidade de realizar diagnósticos de DNA na cena do crime. Para a forense microbiana e saúde pública, a necessidade é fundamental para poder determinar a presença de microrganismos que são prejudiciais aos seres humanos. Uma cena de biocrime exige que os investigadores usem equipamentos de proteção, dificultando o trabalho por períodos prolongados. Se a cena puder ser determinada primeiro como segura (como no caso

de uma farsa, por exemplo), esse requisito oneroso para coleta de amostras pode ser omitido. A instrumentação para detecção de patógenos deve ser portátil, não apenas transportável. A capacidade de diagnóstico deve ter um alto grau de sensibilidade de detecção e ser capaz de detectar uma ampla gama de patógenos nocivos conhecidos, bem como os genes que conferem patogenicidade, caso a engenharia genética tenha sido usada para modificar um microrganismo inofensivo. A microfluídica é atraente porque permite que as análises de biologia molecular sejam realizadas em plataformas miniaturizadas que integram todos os aspectos da análise, desde a preparação da amostra até a tipagem do ácido nucleico [por exemplo, o conceito *lab-on a chip*] ²³⁻²⁴.

Os benefícios potenciais adicionais da microfluídica incluem consumo reduzido de amostras e reagentes (diminuindo o custo), menos desperdício, melhor termodinâmica durante a PCR (que possivelmente poderia reduzir os efeitos estocásticos com modelo limitado) e menos contaminação (sendo um sistema fechado integrado). É concebível que a taxa de transferência aumentaria diminuindo o tempo de análise e explorando o processamento paralelo. Os analistas também seriam liberados de alguns processos manuais que ainda estão sobrecarregados com manipulações macrofluídicas. O desenvolvimento nesta área é exemplificado pelos esforços de pesquisa no laboratório Landers (Universidade de Virgínia, Charlottesville, VA, EUA), que demonstrou que uma ampla gama de amostras e até extração diferencial (ou seja, isolar o DNA do esperma do DNA de outras células tipos) podem ser acomodados em um formato microfluídico. Assim, a macroescala de amostras e a microescala de requisitos de análise de extração podem ser superadas. Além disso, eles desenvolveram um sistema integrado que permite que todo o processo, desde a extração da amostra até a eletroforese, seja realizado nele ²³⁻²⁴⁻²⁵⁻²⁶ (Figura 3).

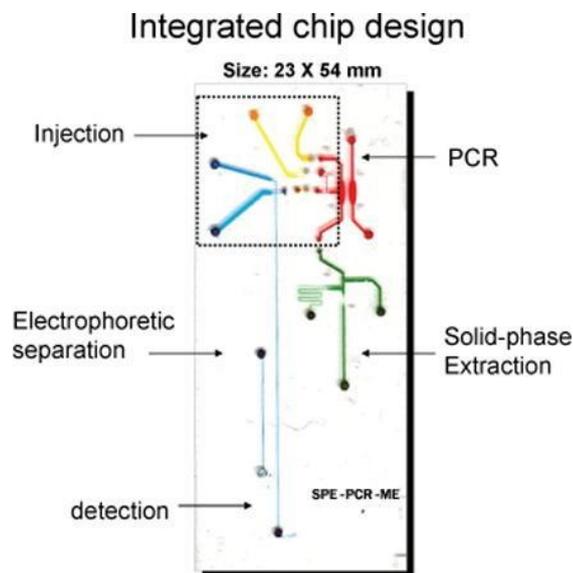


Figura 3. Projeto de um chip integrado para todo o processo de análise de DNA

Existem defensores de um dispositivo microfluídico de teste de campo portátil para realizar a digitação de DNA de identificação humana na cena do crime para identificar rapidamente os suspeitos. Presumivelmente, isso seria gerando um perfil e pesquisando imediatamente um banco de dados de DNA para desenvolver uma pista investigativa. Certamente não seria usado para eliminar suspeitos remanescentes: mesmo que o perpetrador permanecesse na cena do crime, a obtenção de uma amostra de referência exigiria causa provável e, portanto, não é passível de resposta rápida. Uma preocupação significativa seria a possível contaminação de evidências por amostras de referência em um ambiente controlado abaixo do ideal ²⁵.

A cena do crime é um ambiente caótico e é importante o controle da cena, e esforços devem ser direcionados para a coleta adequada de evidências e para minimizar sua contaminação. Se a tipagem de DNA fosse realizada na cena do crime, profissionais qualificados teriam que ser mobilizados, uma vez que é necessária perícia para tipagem de DNA e interpretação dos perfis de DNA gerados. Essa implantação reduziria o rendimento de um laboratório já lotado: os cientistas estariam ocupados indo e voltando das cenas do crime e só poderiam trabalhar em um caso por vez, e não haveria pessoal qualificado suficiente para analisar o DNA em várias cenas de crime simultâneas. Uma solução é que os cientistas permaneçam remotos e os perfis sejam transmitidos eletronicamente ²⁵.

Esta abordagem ainda não aborda a necessidade de profissionais devidamente treinados para processar as amostras e realizar a parte analítica do ensaio. Novamente, a preparação da amostra inicial é talvez o maior obstáculo a ser superado, uma vez que as amostras da cena do crime se apresentam de inúmeras maneiras e essas macro amostras podem não ser prontamente passíveis de processamento microfluídico ²⁴⁻²⁶.

No entanto, um microdispositivo pode ser útil na cena do crime para coleta e armazenamento de amostras. Raramente o tempo para mover uma amostra da cena do crime para o laboratório é um impedimento. No entanto, o atendimento continua a aumentar enquanto a mão de obra não, concomitantemente. Os sistemas automatizados totalmente integrados prometem aumentar o rendimento, liberando o analista de vários aspectos manuais do processo para que ele possa se concentrar em outros processos mais exigentes. A automação é essencial para atender à crescente demanda por análise de casos e para gerar e inserir amostras em bancos de dados nacionais de DNA ²⁴⁻²⁶.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como as lacunas de conhecimento e novas direções foram identificadas onde a biologia molecular provavelmente guiará o campo da ciência forense. Identificamos algumas dessas áreas onde é necessário mais desenvolvimento: melhorar os limites atuais de tipagem de amostras de baixa quantidade e qualidade; melhorar a eficiência da recuperação e extração de amostras; converter STRs atuais em mini-STRs; selecionar e validar novos mini-STRs⁷; selecionar e validar uma variedade de SNPs para diferentes aplicações; intensificação da multiplexação; desenvolvimento de automação para alto rendimento; desenvolvimento de sistemas especialistas para interpretação de dados; desenvolver capacidades de sequenciamento para triagem de genomas de microrganismos; e testes de campo.

Concluimos que o futuro da biologia molecular para a ciência forense é empolgante e dinâmico. Ainda há muito a ser conquistado e os desenvolvimentos da biologia molecular serão essenciais para auxiliar na resolução de crimes e na identificação de desaparecidos.

REFERÊNCIAS

1. Budowle B, Eisenberg A.J. Forensic Genetics. Emery and Rimoins Principles and Practice of Medical Genetics, Elsevier, Philadelphia, 5th ed, Vol. 1, p. 501–517, 2016.
2. Budowle B, Van Daal A. Forensically relevant SNP classes. *BioTechniques*, 2016.
3. Budowle B, Deadman HA, Murch RS, Baechtel FS. An introduction to the methods of DNA analysis under investigation in the FBI Laboratory. *Crime Lab. Dig.*, 2010.
4. Budowle B, van Daal A. Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions. *Biotechniques*. 2009 .
5. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Revised Validation Guidelines. *Forensic Sci. Commun*, 2014.
6. Martin PD, Schmitter H, Schneider PM. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci. Int.*, 2014.
7. Budowle B, Allard BMW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2015.
8. Findlay IR, Frazier A, Taylor, Urquhart A. Single cell DNA fingerprinting for forensic applications. *Nature*, 2010.
9. Budowle B, Schutzer SE, Einseln A, Kelley LC, Walsh AC, Smith JAL, Marrone BL, Robertson J, Campos J. Building microbial forensics as a response to bioterrorism. *Science*, 2013.
10. Morse S A, Khan AS. Epidemiologic investigation for public health, biodefense, and forensic microbiology, Budowle, and S. Schutzer (Eds.), *Microbial Forensics*, 2014.
11. Budowle B, Johnson MD, Fraser CM, Leighton TJ, Murch RS, Chakraborty R. Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit. Rev. Microbiol*, 2014.

12. Read, T D, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, 2014.
13. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010.
14. Drmanac S, Kita D, Labat I, Hauser B, Schmidt C, Burczak JD, Drmanac R. Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics. *Nat. Biotechnol.*, 2010.
15. Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold C, Schmidt O, van den Boom D, Cantor CR, Shah HN, Gharbia SE. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013.
16. Anslinger K, Bayer B, Rolf B, Keil W, Eisenmenger W. Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory. *Leg. Med.*, 2015.
17. Tereba A, Flanagan L, Mandrekar P, Olson R. A new, rapid method to separate sperm and epithelial cells. *Profiles in DNA*, 2013.
18. Parson W, Steinlechner M. Efficient DNA database laboratory strategy for high through-put STR typing of reference samples. *Forensic Sci. Int.*, 2013.
19. Greenspoon SA, Sykes KL, Ban JD, Pollard A, Baisden M, Farr M, Graham N, Collins BL, et al. Automated PCR setup for forensic casework samples using the Normalization Wizard and PCR Setup robotic methods. *Forensic Sci. Int.*, 2014.
20. Hanselle T, Otte M, Schnibbe T, Smythe E, Krieg-Schneider F. Isolation of genomic DNA from buccal swabs for forensic analysis, using fully automated silica-membrane purification technology. *Leg. Med.*, 2013.
21. Hall TA, Budowle B, Jiang Y, Blyn L, Eshoo M, Sannes-Lowery KA, Sampath R, Drader JJ, et al.. Base composition analysis of human mitochondrial DNA using electrospray ionization mass spectrometry: a novel tool for the identification and differentiation of humans. *Anal. Biochem.*, 2014.
22. Ecker DJ, Sampath R, Massire C, Blyn LB, Hall TA, Eshoo MW, Hofstadler SA. Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017.
23. Horsman KM, Bienvenue JM, Blasier KR, Landers JP. Forensic DNA analysis on microfluidic devices: a review. *J. Forensic Sci.*, 2016.
24. Easley CJ, Karlinsey JM, Bienvenue JM, Legendre LA, Roper MG, Feldman SH, Hughes MA, Hewlett EL, et al. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014.
25. Norris JV, Manning K, Linke SJ, Ferrance JP, Landers JP. Expedited, chemically enhanced sperm cell recovery from cotton swabs for rape kit analysis. *J. Forensic Sci.* 2016.
26. Wen J, Legendre LA, Bienvenue JM, Landers JP. Purification of nucleic acids in microfluidic devices. *Anal. Chem.*, 2016.

CONTATO

Maria Lucia Sala: luciasala2014@gmail.com