

IMPORTANȚA TESTELOR ADN PENTRU IDENTIFICAREA PERSOANELOR

Drd. Mihai Țăulescu
Universitatea de Medicină și Farmacie Timișoara

Until now, through, the application of DNA technology to forensic problems have been solved more than 50,000 cases worldwide. In forensic science, DNA analysis has become the new form of scientific evidence and has come under public scrutiny and the demand to show competence. More and more courts admit the DNA based evidence. There are two main applications of DNA analysis in forensic medicine: criminal investigation and paternity tests. In this article we present background information about the application of DNA analysis to paternity tests, as well as mathematical models commonly applied to its evaluation¹.

Introducere

Până acum două decenii cercetarea genetică a diferitelor cazuri specifice medicinei legale s-a făcut prin analiza markerilor serologici clasici. Pentru aceasta s-au folosit grupele sanguine, sistemul HLA, proteinele polimorfe și enzimele, cercetate prin metode imunologice sau electroforetice. Acești markeri genetici nu au dat niciodată rezultate suficiente de concludente, mai ales în cazurile în care probele analizate erau în cantități minime sau erau degradate, fapt des întâlnit în medicina legală. În plus, în afara analizei sângelui, celelalte probe, cum ar fi părul, saliva sau sperma, nu puteau fi analizate decât limitat. După o perioadă inițială de dispute (și inexactități științifice) (Lewin, 1989; Norman, 1989), amprentarea ADN a devenit bine implementată în științele medico-legale (Lander și Budowle, 1994; Roberts, 1992; Benecke, 1995). Descoperirea polimorfismului în segmentele repetitive ale ADN, de către Jeffrey și col., în anul 1985, a avut un impact major asupra geneticii din medicina judiciară. În ultimii 15 ani au fost descoperite sisteme de tipizare ADN foarte robuste și cu un mare potențial informativ. Aceasta a crescut la maximum posibilitatea individualizării oricărui material biologic de origine umană.

Toate genele umane sunt codificate de aproximativ 10-20% din genomul uman. Astfel, cea mai mare parte (80-90%) a genomului uman conține regiuni "non-codificante", care nu conțin informație genetică cu semnificație directă pentru sinteza proteinelor. Variabilitatea genetică este relativ limitată în ADN codificant, cu excepția regiunilor HLA. Aceasta se datorează faptului că genele care se exprimă sunt supuse presiunii selecției pe parcursul evoluției, în sensul că trebuie să-și mențină funcțiile specifice. Spre deosebire de acestea, părțile "non-codificante" ale genomului nu pot fi controlate de presiunea selecției, astfel că mutațiile din aceste regiuni sunt reținute și transmise la descendenți, provocând o semnificativă creștere a variabilității genetice. De aceea, aceste regiuni sunt foarte utile pentru investigațiile din genetica medico-legală, având o valoare informativă mare (Schneider, 1997).

¹ Până în prezent, aplicațiile tehnologiei de analiză moleculară a ADN în problemele medico-legale de identificare de persoană, au rezolvat un număr de peste 50.000 de cazuri în toată lumea. În acest domeniu, analiza ADN a devenit o nouă formă de probare științifică și majoritatea organelor juridice acceptă astăzi ca elemente probatorii analizele ADN. Există două aplicații generale ale analizelor ADN în medicina legală: investigațiile criminalistice și testele de paternitate. În lucrare se prezintă informațiile de bază privind aplicațiile analizelor ADN în aceste domenii, precum și modul de interpretare matematică a rezultatelor, ca urmare a experienței acumulate în 5 ani de activitate a autorilor.

O proporție importantă din ADN “non-codificant” (30%) conține secvențe repetitive, care pot fi incluse în două clase: secvențe repetitive în tandem (“tandemly repetitive sequences”) și elemente dispersate (“interspersed elements”). Majoritatea sistemelor de tipizare ADN aflate în uz curent se bazează pe analiza locilor cu secvențe repetitive în tandem. Asemenea secvențe se află în ADN satelit, iar din punctul de vedere al geneticii medico-legale, cele mai interesante sunt regiunile de ADN repetitiv mai scurte decât cele întâlnite în ADN satelit. Aceste regiuni pot fi clasificate în “minisateliți” și “microsateliți”, sau repetiții scurte în tandem (“short tandem repeat” - STR) (Litt și Lutz, 1989). Minisateliții, denumiți și loci VNTR (“variable number of tandem repeats”) (Nacamura și col., 1988) sunt formați din 15-50 bp lungime, care se repetă în tandem pe lungimi de 500 bp-20 kb. STR sunt mult mai scurte. Unitatea repetitivă variază între 1 și 6 bp, care se repetă pe o lungime de 50 bp, până la 500 bp. În plus, minisateliții și STR diferă prin distribuția lor în genomul uman și, probabil, prin funcțiile lor biologice. Astfel, minisateliții sunt mai frecvent întâlniți în regiunile subtelomerice, pe când STR sunt larg răspândiți în întregul genom uman cu o frecvență de 1 locus pentru fiecare 6-10 kb (Beckman și Weber, 1992). Originea variabilității acestor regiuni pare să fie și ea diferită. Variabilitatea microsateliților își are originea din crossing-over inegal și uneori din conversia genelor (Jeffreys și col., 1994), iar cea a STR, în erorile de replicație (“replication slippage”) (Di Rienzo și col., 1994). Variabilitatea genetică dintre indivizi, cu privire la VNTR și STR, se bazează pe numărul diferit al elementelor repetitive, însă are la bază și diferențele privind însăși secvența ADN, deoarece repetițiile pot avea mici diferențe în secvența lor²

Metode de analiză ADN

Prima metodă care a fost aplicată în analizele ADN pentru medicina legală a fost metoda polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (RFLP), în care ADN este digerat cu endonucleaze de restricție, fragmentele sunt separate prin electroforeză pe gel de agaroză, transferate pe o membrană de nylon și detectate prin hibridizare cu probe radioactive sau chemiluminescente. Prin tehnologia RFLP sunt studiate două tipuri de polimorfisme ADN: modificări de baze unice și loci VNTR minisatelitici. Analiza polimorfismului bazelor unice are o valoare limitată pentru identificările ADN deoarece există un număr limitat de alele cu asemenea modificări și un număr mic de loci. De la mijlocul anilor 1980 însă, cea mai comună metodă utilizată în analizele ADN a devenit analiza RFLP a locilor minisatelitici VNTR. Acești loci diferă în lungime datorită numărului variabil de segmente repetitive de la nivelul locusului. Ei conțin secvențe repetitive care variază ca lungime între 15 și 70 baze.

Standardizarea sistemelor de testare în medicina legală a determinat utilizarea în Statele Unite a enzimei de restricție *HaeIII* și în Europa a enzimei *HinfI*. Această tehnică prezintă dezavantajul că necesită o cantitate relativ mare de ADN, este foarte laborioasă, durează mult și în unele situații utilizează pentru determinare preparate radioactive. Reacția

² Levin, R. *Science* 244, 1033 (1989); Norman, C. *Science* 246, 1556 (1989); Lander, E.S., Bodowle, B. *Nature* 371, 735 (1994); Roberts, L. *Science* 257, 732 (1992); Benecke, M. *Die Zeit* 20, 43 (1995); Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. *Nature*, 314,67 (1985); Schneider, P.M. *Forensic Sci.Int.* 88, 17 (1997); Litt, M., Lutz, J.A. *Am.J.Hum.Genet.* 44, 397 (1989); Nakamura, Y., Carlson, M., Krapcho, K., Kanamori, M., White, R. *Am.J.Hum.Genet.* 43, 854 (1988); Beckman, J.S., Weber, J.L. *Genomics* 12, 627 (1992); Jeffreys, A.J., Tamaki, K., MacLeod, A., Moncton, D.G., Neil, D.L., Armour, J.A.L. *Nature Genetics* 6, 136 (1994); Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91, 3166 (1994)

de polimerizare în lanț (PCR) a depășit toate dificultățile tehnice inițiale și a determinat creșterea spectaculoasă a utilității amprentării ADN în științele medico-legale. Majoritatea sistemelor de tipizare ADN bazate pe PCR permit identificarea alelelor ca entități discrete, evitându-se astfel problemele statistice care apar la compararea benzilor electroforetice, iar standardizarea a devenit mult mai simplă. Pe lângă creșterea sensibilității inerente oricărei tehnici PCR, devine mult mai probabil succesul analizei materialului vechi și degradat, deoarece mărimea mică a porțiunilor polimorfe de ADN analizat este foarte susceptibilă efectuării reacției PCR. După ce, prin PCR, a devenit posibilă generarea unui număr mare de copii ale segmentului ADN de interes, au apărut o serie de metode pentru detecția variației segmentelor amplificate. Deoarece se pot produce cel puțin 10^6 copii de secvență de interes, este posibil să se utilizeze pentru detecție, metode care nu folosesc izotopii.

Pentru aceasta au fost aplicate mai multe metode. Prima dintre acestea a utilizat probe de oligonucleotide specifice de secvență (SSO). Kitul AmpliType PM PCR (Perkin-Elmer, Foster City, Ca) este unul din cele mai folosite în laboratoarele de profil. Cu acest kit se amplifică în sistem multiplex locii HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 și GC. Sistemul a fost validat pentru analizele medico-legale și este încă larg utilizat, deși multe laboratoare preferă astăzi sistemele STR mult mai informative, precum și alte strategii pentru analiza variantelor HLA. Analiza secvențelor cu repetiții scurte în tandem (STR) prin utilizarea reacției PCR este astăzi metoda preferată pentru identificarea medico-legală. STR-urile dinucleotidice sunt cele mai comune STR-uri din genomul uman, ele fiind markerii genetici cei mai utilizați pentru analizele de linkage. Totuși, nu aceștia sunt cei utilizați în medicina medico-legală din cauză că aceste STR sunt afectate în cursul amplificării prin erori de replicare (“strand slippage”), ceea ce produce benzi artefactuale în electroforeză. Spre deosebire de acestea, repetițiile tetra și pentanucleotidice sunt mult mai puțin supuse acestor artefacte de replicare și de aceea sunt mult mai potrivite pentru studiile de amprentare ADN.

Datorită structurii lor, STR variază prin faptul că pot fi extrem de complexe, până la extrem de simple. STR complexe prezintă avantajul hipervariabilității. STR simple au avantajul unei foarte simple standardizări și al scăzutei rate mutaționale.

Pe lângă caracteristicile menționate, selectarea STR ideale pentru scopurile medico-legale include analiza minuțioasă a bezilor artefactuale pe care le pot genera, precum și robustețea și mărimea lor. În general, dimensiunile scurte sunt preferabile deoarece mărimea produsului amplificat este critică la probele degradate în care fregmentele mici pot fi amplificate, iar cele mai mari, nu.

Un alt avantaj important îl constituie posibilitatea amplificării simultane a mai multor loci STR printr-o singură reacție de tip multiplex. Acesta, cuplat cu detecția directă a produșilor de amplificare pe gel de poliacrilamidă, face posibilă automatizarea amprentării ADN pe baza STR.

STR au fost pentru prima dată analizate prin folosirea sistemelor manuale de electroforeză. Pentru standardizare sunt recomandabile gelurile de poliacrilamidă denaturante pentru că prin folosirea lor pot fi detectați și produși de amplificare generați de erori de replicare. Domeniul a fost revoluționat prin introducerea tehnicilor bazate pe evidențierea fluorescentă și prin utilizarea secvențiatoarelor ADN. Folosirea secvențiatoarelor permite folosirea unor reacții multiplex mari (cu peste 10 sisteme STR). Pentru tipizarea STR este esențială utilizarea “ladder”-ilor alelici cu secvența de referință. În general, acești “ladder” alelici cuprind toate alelele unui sistem, deși, uneori, pot apare și alele intermediare la STR-urile mai simple. Pentru distingerea acestor alele intermediare există ghiduri de interpretare și astfel ele pot fi ușor implementate la sercvențiatoarele automate.

Există mai multe multiplexe disponibile comercial. Unul din cele mai cunoscute este sistemul SGM Plus (Perkin-Elmer), care cuprinde 10 loci: HUMFIBRA/FGA, HUMVWFA, HUMTH01, D18S51, D21S11, D6S477, D8S1179, D16S539, D19S433 și amelogenina. Multiplexele produse de Promega (Madison, WI) sunt foarte utilizate mai ales în laboratoarele care folosesc sistemele electroforetice manuale și platforme de secvențiere monocromatice. Deși au fost descrise sisteme de analiză STR foarte robuste, necesitatea standardizării a determinat concentrarea preocupării majorității laboratoarelor asupra sistemelor STR clasice. Ca exemplu, "Interpol Working Party on DNA Profiling", recomandă pentru Europa, următorul set standard de 7 loci: VWFA31/A, TH01, D21S11, FGA, D8S1179, D3S1358, D18S51 și amelogenina.

În general, puterea de discriminare combinată a STR este enormă, iar probabilitatea ca doi indivizi neînruți să fie identici este mai mică de 10^{-10} , pentru majoritatea multiplexelor existente. Amprele ADN clasice se pot obține din cel puțin 5-10 μ g de ADN nedegradat. De aceea, tehnologia clasică nu poate fi utilizată pentru analiza petelor care conțin cantități de ADN mult mai mici și/sau ADN degradat. De exemplu, 1 ml de ejaculat conține 150-300 μ g ADN, pe când dintr-un tampon vaginal recoltat post-coitum se pot extrage doar 0,01-3 ng de ADN. Un fir de păr smuls cu tot cu rădăcina conține până la 30 ng de ADN genomic, pe când un fir de păr fără bulb conține maximum 0,1 ng ADN. ADN degradat conține fragmente moleculare scurte. De aceea tipizarea ADN trebuie să utilizeze tehnici care permit detecția unor loci repetitivi scurți și, în același timp, să ofere informațiile necesare. Acești loci (STR) au fost descoperiți acum aproximativ 20 de ani, deci mai târziu decât debutul amprentării ADN.

Genomul fiecărei persoane conține sute de loci STR (numărul exact nu este încă cunoscut). S-a observat că fiecare locus are un număr limitat de alele posibile, în general de la cinci, la zece allele. Fiecare individ poate fi heterozigot sau homozigot pentru fiecare locus STR. Compararea allelelor unui individ cu allelele obținute dintr-o pată de sânge de la locul unei crime sau cu ale unui copil, permite determinarea identității sau paternității. Locii STR sunt astăzi mijlocul primordial de analiză a petelor și de investigații criminalistice în lume. În Statele Unite, unde până în 1997 erau utilizați cu anumite restricții, cazul O.J. Simpson a demonstrat în mod impresionant utilitatea STR pentru tipizarea unor cantități mici de ADN. Pentru a evidenția STR este necesar ca acești loci să fie amplificați prin PCR. Astăzi pot fi amplificați simultan până la 16 loci STR folosindu-se primeri care detectează specific un anumit locus. După separarea electroforetică a produșilor PCR, vizualizarea se face prin colorație argentică sau prin detecția fluorescentă semiautomatizată.

Concluzii

În SUA, există două reguli majore care decid dacă o descoperire științifică poate fi admisă ca probă juridică: testul să fie "general acceptat", și metodologia să fie standardizată. Pentru prima condiție, teoria și metodologia utilizată trebuie să fie general acceptată în comunitatea științifică. Cât de dificil se poate aplica această condiție este ilustrat de celebrul caz "Kelly contra stat", când pentru prima dată a fost admisă ca probă analiza ADN. A fost nevoie ca la întrebarea "Nu este tehnologia folosirii testului ADN prea nouă pentru a putea fi acceptată de comunitatea științifică?", să răspundă cinci experți. A doua condiție, standardizarea determinării, implică o mult mai largă rețea de specialiști care să decidă dacă metodologia propusă are suficientă validitate științifică.

Consiliul European, Comitetul de Miniștri, cu prilejul reuniunii 470, în februarie 1992, a publicat Recomandarea nr. 92 cu privire la utilizarea analizelor ADN în rețeaua sistemului judiciar. Astăzi, după ce sistemul CODIS a fost elaborat și standardizat în SUA, a fost extins și în alte jurisdicții. Cei 13 loci CODIS au fost introduși și în "Forensic Science Service" din Marea Britanie, pentru baza de date națională și pentru INTERPOL, precum și în majoritatea țărilor din Uniunea Europeană.