

## РЕЗУЛЬТАТ УСТАНОВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО РОДСТВА

На основании частного заказа, в ООО «НПФ «ХЕЛИКС» проведено установление биологического родства.

### ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### МАТЕРИАЛЫ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ НА ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследовались биологические образцы, предоставленные следующими лицами:

##### **Ребенок 1**

##### **ФИО1**

Дата рождения:

Вид биоматериала: волосы

Код образца:

Шифр образца:

##### **Предполагаемая бабушка 1**

##### **ФИО2**

Дата рождения:

Вид биоматериала: волосы

Код образца:

Шифр образца:

#### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – УСТАНОВИТЬ:

Какова вероятность того, что биологический сын донора образца с маркировкой: «**ФИО2**», является биологическим отцом донора образца с маркировкой: «**ФИО1**»?

### ИССЛЕДОВАНИЕ

#### Обзор

В основе молекулярно-генетического метода исследования лежит идентификация аллелей ряда полиморфных локусов, уникально наследуемых ребенком от биологических родителей. Исследованию подвергается дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), выделенная из биологического материала, полученного от обследуемых лиц. У каждого человека клетки биологического материала (кровь, слюна, кости, кожа, мышцы, зубы, сперма, луковицы волос и др.) содержат абсолютно одинаковую ДНК. Она остается постоянной на протяжении всей жизни, не подвергаясь изменениям. Поэтому результаты молекулярно-генетического исследования не зависят от того, какой именно биологический материал исследуется в конкретном случае.

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) происходит высоко специфичная амплификация (увеличение количества копий в миллионы раз) определенных фрагментов ДНК, содержащих аллели исследуемых локусов. Это позволяет провести электрофоретическое разделение амплифицированных фрагментов и идентифицировать аллели полиморфных локусов, соответствующие этим фрагментам ДНК.

Выявленные аллели исследованных локусов обозначаются в соответствии со стандартной международной номенклатурой, что позволяет при необходимости проводить межлабораторные сравнения полученных результатов.

Результаты исследования интерпретируются в соответствии с тем фактом, что в момент зачатия ребенка происходит слияние яйцеклетки матери и сперматозоида биологического отца, содержащих гаплоидные наборы хромосом (по 23 хромосомы). После оплодотворения эти два гаплоидных набора хромосом формируют диплоидный набор хромосом ребенка (23 пары хромосом). Таким образом, половину генетического материала ребенок получает от матери и другую половину от биологического отца. Отсюда следует, что в геноме ребенка могут присутствовать только такие аллели полиморфных локусов, которые обнаруживаются у матери и биологического отца. Сравнение генотипов ребенка и матери позволяет установить, какие именно аллели унаследованы ребенком от биологического отца (определить “отцовский набор аллелей” у ребенка).

Вывод об исключении отцовства делается, если в генотипах ребенка и предполагаемого отца отсутствуют совпадающие аллели даже по отдельным локусам. При наличии совпадающих аллелей по всем исследованным локусам у ребенка и предполагаемого отца делается вывод о возможности получения ребенком наследственного материала от обследуемого: «не исключение» отцовства. Иными словами, в исследовании выносятся на разрешение следующий вопрос: *присутствует ли в геноме предполагаемого отца генетический материал, который был передан ребенку биологическим отцом?*

Результаты исследования логически неопровержимы лишь в случаях исключения отцовства. В случаях же «не исключения», поскольку генотипы по исследованным локусам не являются уникальными для каждого человека (например, у однояйцевых близнецов генотипы по всем локусам идентичны), информативность проведенного исследования оценивается средствами теории вероятности и математической статистики на основании данных о встречаемости аллелей в популяции. Любой случай «не исключения» отцовства, независимо от количества исследованных локусов, не является логически неопровержимым: формально всегда существует вероятность *случайного* совпадения аллелей в сравниваемых образцах ДНК.

### **Установление отцовства**

ДНК-тест на отцовство позволяет установить, может ли мужчина являться биологическим отцом конкретного ребенка или нет. Возможны два варианта интерпретации результата исследования: (1) исключение отцовства и (2) неисклечение отцовства. Вероятность при неисклечении отцовства в среднем 99,9999% (точность 100% при неисклечении отцовства теоретически не достижима). Существует два типа исследования на отцовство - дуэт и трио. При дуэте анализируются биологические образцы ребёнка и предполагаемого отца. При трио – биологические образцы ребёнка, предполагаемого отца и биологической матери. Важно! Исследование в формате дуэт может проводиться исключительно при невозможности взять биологический материал у биологической матери ребенка.

Уровень доказательности экспертного исследования в случае неисклечения отцовства должен составлять следующие значения:

- для полного трио (мать - ребенок - предполагаемый отец) при условии, что истинность другого родителя считается бесспорной - не ниже 1000 (рассчитываемый как индекс отцовства PI);



*- для дуэта (ребенок - предполагаемый отец) в отсутствие другого родителя - не ниже 400 (рассчитываемый как индекс отцовства PI) (приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 12.05.2010 года № 346н).*

#### **Установление материнства**

ДНК-исследование на материнство позволяет установить, может ли женщина являться биологической матерью конкретного ребенка или нет. Возможны два варианта интерпретации результата исследования: (1) исключение материнства и (2) неисключение материнства. Вероятность при неисключении материнства в среднем 99,9999% (точность 100% при неисключении материнства теоретически не достижима). Существует два типа исследования на материнство - дуэт и трио. При дуэте анализируются биологические образцы ребёнка и предполагаемой матери. При трио – биологические образцы ребёнка, предполагаемой матери и биологического отца. Важно! Исследование в формате дуэт может проводиться исключительно при невозможности взять биологический материал у биологического отца ребенка.

Уровень доказательности экспертного исследования в случае неисключения материнства должен составлять следующие значения:

*- для полного трио (отец - ребенок – предполагаемая мать) при условии, что истинность другого родителя считается бесспорной - не ниже 1000 (рассчитываемый как индекс материнства PI);*

*- для дуэта (ребенок – предполагаемая мать) в отсутствие другого родителя - не ниже 400 (рассчитываемый как индекс материнства PI) (приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 12.05.2010 года № 346н).*

#### **Близнецовый тест**

Это исследование позволяет установить, являются ли близнецы однойцевыми или разнояцевыми. Возможны два варианта интерпретации результата исследования: (1) участники могут являться однойцевыми близнецами и (2) участники являются разнояцевыми близнецами. Точность анализа при подтверждении однойцевости - 99.9999% и выше, при исключении – 100%. Для анализа необходимы образцы ДНК двух близнецов.

#### **Сиблинговый тест**

Это исследование проводится исключительно при невозможности анализа биологического материала предполагаемого родителя ребенка. Тест на основании анализа аутосомных маркеров позволяет определить вероятность того, что два человека имеют одного или обоих общих родителей (т.е. являются полусиблингами или полными сиблингами). Существуют три разновидности сиблингового теста: 1) полносиблиновый тест, при котором априори известно о том, что у участников один общий родитель, и необходимо установить вероятность того, что участники имеют второго общего родителя); 2) полносиблиновый тест, при котором необходимо установить вероятность того, что участники являются полными сиблингами, а не неродственными друг другу людьми; 3) полусиблинговый тест, при котором необходимо установить вероятность того, что у участников один общий родитель. Возможны три варианта интерпретации результата анализа: (1) участники могут являться полными (или полу-) сиблингами, (2) сиблинговое родство маловероятно, (3) неопределенный результат (когда генетические данные не позволяют сделать выводы о возможности того или иного родства).



Величина условной вероятности сиблингового родства рассчитывается на основе индекса родства (отношение правдоподобия сравниваемых гипотез LR). Установлены следующие стандарты интерпретации результатов исследования (Standards for Relationship Testing Laboratories, 13th edition (The AABB Standards Program Committee, 2018)):

Индекс родства  $<0.1$  – родство

маловероятно Индекс родства  $>10$  –

родство вероятно

Индекс родства от 0.1 до 10 – неопределенный результат

Для анализа необходимы образцы ДНК ребенка, его предполагаемого сиблинга, и их бесспорных родителей.

Важно! Одновременное исследование дополнительных биологических родственников предполагаемого родителя ребенка существенно повышает точность анализа.

### ***Авнуклярный тест***

Это исследование проводится исключительно при невозможности анализа биологического материала предполагаемого родителя ребенка. Тест на основании анализа ауtosомных маркеров позволяет дать заключение о вероятности родства между ребенком и предполагаемым дядей (предполагаемой тетей). Возможны три варианта интерпретации результата исследования: (1) родство вероятно, (2) родство маловероятно (3) неопределенный результат (когда генетические данные не позволяют сделать выводы о возможности того или иного родства).

Величина условной вероятности авнуклярного родства рассчитывается на основе индекса родства (отношение правдоподобия сравниваемых гипотез LR). Установлены следующие стандарты интерпретации результатов исследования (Standards for Relationship Testing Laboratories, 13th edition (The AABB Standards Program Committee, 2018)):

Индекс родства  $<0.1$  – родство

маловероятно Индекс родства  $>10$  –

родство вероятно

Индекс родства от 0.1 до 10 – неопределенный результат

Для анализа необходимы образцы ДНК двух людей, находящихся в предполагаемом родстве, а также биологического родителя ребенка.

Важно! Одновременное исследование дополнительных биологических родственников предполагаемого родителя ребенка существенно повышает точность анализа.

### ***Дедушка/бабушка – внук/внучка***

Это исследование проводится исключительно при невозможности анализа биологического материала предполагаемого родителя ребенка. Тест на основании анализа ауtosомных маркеров позволяет дать заключение о наличии родства между ребенком и предполагаемым дедушкой и/или бабушкой. Существует два типа анализов на такой вид



родства - (1) внук (внучка) и бабушка (дедушка) и (2) внук (внучка), бабушка и дедушка. Одновременное исследование образцов бабушки и дедушки значительно повышает точность исследования и в определенных случаях позволяет полностью исключить родство (что невозможно в случаях, когда для анализа предоставлен только образец от бабушки или от дедушки). Возможны четыре варианта интерпретации результата исследования: (1) родство вероятно, (2) родство маловероятно (3) неопределенный результат (когда генетические данные не позволяют сделать выводы о возможности того или иного родства) и (4) родство полностью исключено (только для случаев, когда участвуют и бабушка, и дедушка).

Величина условной вероятности родства рассчитывается на основе индекса родства (отношение правдоподобия сравниваемых гипотез LR). Установлены следующие стандарты интерпретации результатов исследования с участием только одного биологического родителя предполагаемого родителя ребенка (Standards for Relationship Testing Laboratories, 13th edition (The AABB Standards Program Committee, 2018)):

Индекс родства  $<0.1$  – родство

маловероятно Индекс родства  $>10$  –

родство вероятно

Индекс родства от 0.1 до 10 – неопределенный результат

Для анализа необходимы образцы ребенка и бабушки (дедушки), или же ребёнка, бабушки и дедушки, а также биологического родителя ребенка.

#### ***Исследование Y-хромосомы***

Это исследование позволяет определить, состоят ли двое мужчин в близком патрилинейном родстве (полусиблинговом, либо полносиблинговом, родстве на уровне дедушка - внук, либо дядя - племянник). Заключение даётся на основании исследования маркеров Y-хромосомы, которая передаётся исключительно по мужской линии от отца к сыну. При помощи этого исследования можно подтвердить или опровергнуть, являются ли двое мужчин членами одной семьи (при условии того, что у них один предполагаемый мужской прародитель). Также это исследование можно использовать для установления отцовства в отношении мальчиков при отсутствии ДНК отца, когда есть возможность исследовать образцы дедушки по отцовской линии или родного брата отца. Для исследования необходимы образцы ДНК двух мужчин, которые предположительно могут принадлежать одной и той же мужской линии.

#### ***Исследование X-хромосомы***

Это исследование имеет ограниченное применение, но иногда позволяет установить родственные отношения тогда, когда другие виды исследования дают неопределенный результат. Он особенно информативен в случаях, когда ребёнок девочка (девочки получают X-хромосому от отца), предполагаемый отец не доступен для анализа, но есть биологическая мать предполагаемого отца или предполагаемая сестра ребенка по отцу. В отличие от исследования аутомомных маркеров, анализ X-хромосомы в приведенной выше конфигурации участников позволяет исключить родство. При неисклучении родства рассчитываются индекс и вероятность родства. Для исследования необходимы образцы ребёнка (девочки) и ее родственника женского пола (биологическая мать предполагаемого отца или сестра ребенка по отцу) по отцовской линии. Важно! Одновременное



исследование биологической матери ребёнка и (в случае теста на полусиблинговое родство) биологической матери предполагаемой сестры ребенка существенно повышает точность анализа.

### ***Исследование митохондриальной ДНК***

Это исследование позволяет определить, имеют ли участники единого матрилинейного предка. Заключение даётся на основании исследования гипервариабельных регионов митохондриальной ДНК, которая передаётся детям обоих полов исключительно от матери.

### **ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК**

Выделение ДНК из образцов биологического материала проводили комплектом реагентов для выделения ДНК (ExtraPhen), производства НПФ «АТГ-Биотех».

Для мониторинга возможной контаминации при выделении ДНК использовался отрицательный контроль выделения (КВ).

### **АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ (ПДАФ) ХРОМОСОМНОЙ ДНК**

Типирование полиморфных STR-локусов хромосомной ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции с использованием энзиматической амплификации 12-локусной панели X хромосомы и локусов Amelogenin и D21S11 Investigator® Argus X-12 QS (Qiagen, Германия) руководствуясь Методическими указаниями №98/253 «Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства» (утверждены Минздравом РФ 19.01.1999 г.) и инструкциями фирмы-изготовителя.

Для оценки специфичности реакции амплификации использовали препарат контрольной ДНК (положительный контроль, К+) с известными генотипическими признаками и препарат, не содержащий ДНК (отрицательный контроль, К-).

Продукты полимеразной цепной реакции фракционировали электрофоретически с использованием системы капиллярного электрофореза 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Полученные электрофореграммы анализировали с использованием программного обеспечения GeneMapper® ID-X v1.5 (Applied Biosystems, США) и устанавливали индивидуальные генотипические комбинации аллельных вариантов (профили ПДАФ) типизируемых STR-локусов. Сравнивали индивидуальные генотипические комбинации аллельных вариантов (профили ПДАФ) указанных STR-локусов объектов.

Вероятно – статистическая обработка проводилась с использованием частот гаплотипов (K. Rebała, S.A. Kotova, V.I. Rybakova et al, Variation of X-chromosomal microsatellites in Belarus within the context of their genetic diversity in Europe, Forensic Sci. Int. Genet. 16 (2015) 105– 111), и программного пакета FamLinkX v. 2.6 (Kling D., et al. 2014. Int J Legal Med. DOI 10.1007/s00414-014-1117-7).



## РЕЗУЛЬТАТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица №1

Выявленные профили ПДАФ X-хромосомы

Лocus	Ребенок 1	Предполагаемая бабушка 1
	ФИО1	ФИО2
AMEL	X	X
DXS10103	18, 19	19, 20
DXS8378	11, 12	11, 12
DXS10101	29, 29.2	29, 31.2
DXS10134	35, 38	38, 39.3
DXS10074	8, 17	8, 17
DXS7132	14	12, 14
DXS10135	28, 29	26, 28
DXS7423	14, 15	15
DXS10146	28, 29	29, 39.2
DXS10079	18, 19	18, 20
HPRTB	11, 12	12, 13
DXS10148	26.1, 27.1	26.1

Amel - определение генетической половой принадлежности: XX – женский пол, XY - мужской пол

В рамках проведенных исследований, основываясь на генетических данных, полученных при анализе индивидуализирующих маркеров X-хромосомы, биологическое отцовство сына донора образца **ФИО2** в отношении донора образца **ФИО1** не может быть исключено, т.к. у них обнаружено совпадение одного или обоих аллелей по всем 12 исследованным X-STR-локусам. Комбинированный индекс родства (Combined Grandparentage Index, CGPI) составляет  $1.109 \times 10^4$  и указывает на то, что полученные при исследовании индивидуализирующих маркеров X-хромосомы данные в  $1.208 \times 10^4$  раз более вероятны, если донор образца **ФИО2** является биологической патрилинейной бабушкой донора образца **ФИО1**, а не случайно взятой женщиной. Считая априорную вероятность родства равной 50%, апостериорная вероятность родства по результатам настоящего исследования ПДАФ-профилей маркеров X-хромосомы составляет 99.9909%.

**ВЫВОДЫ**

Вероятность того, что биологический сын донора образца с маркировкой: «ФИО2», является биологическим отцом донора образца с маркировкой: «ФИО1», в рамках проведенного исследования и в объеме предоставленных материалов, составляет 99.9909%.