



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: буккальный эпителий

Код образца:

Шифр образца:

Предполагаемый дедушка 1

ФИО2

Дата рождения:

Вид биоматериала: буккальный эпителий

Код образца:

Шифр образца:

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – УСТАНОВИТЬ:

1. Исключается или не исключается биологическое отцовство биологического сына донора образца с маркировкой: «**ФИО2**», в отношении донора образца с маркировкой: «**ФИО1**»?
2. Если отцовство биологического сына донора образца с маркировкой: «**ФИО2**», в отношении донора образца с маркировкой: «**ФИО1**», не исключается, то какова вероятность того, что полученный результат не является следствием случайного совпадения индивидуализирующих признаков неродственных лиц (при условии, что другие варианты патрилинейного родства не рассматриваются)?

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 однойцевых 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) неисклечение материнства. Вероятность при неисклечении материнства в среднем 99,9999% (точность 100% при неисклечении 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 неисклечения 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 однойяйцевыми или разнояйцевыми. Возможны два варианта интерпретации результата исследования: (1)

участники могут являться однойцевыми близнецами и (2) участники являются разнойцевыми 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) полносиблинговый 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 беспорных родителей.

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

Авункулярный тест

Это исследование проводится исключительно при невозможности анализа биологического материала предполагаемого родителя ребенка. Тест на основании анализа аутосомных 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 авункулярного 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 аутосомных 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 неопределённый 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 аутомсомных 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 реагентом «ДНК - экспресс» (НПФ «Литех», Россия).

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 25 локусной панели VeriFiler™ Express PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific, США), 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.

Для расчета вероятности патрилинейного родства использована консервативная оценка частоты гаплотипа Y-хромосомы по международной базе данных US Y-STR Database (<https://www.usystrdatabase.org/>).

РЕЗУЛЬТАТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица №1

Выявленные профили ПДАФ Y-хромосомы

Маркер	Ребенок 1	Предполагаемый дедушка 1	совпадение / несовпадение
	ФИО1	ФИО2	
DYS576	17	17	совпадение
DYS389 I	13	13	совпадение
DYS635	23	23	совпадение
DYS389 II	30	30	совпадение
DYS627	17	17	совпадение
DYS460	11	11	совпадение
DYS458	15	15	совпадение
DYS19	15	15	совпадение
Y GATA H4	13	13	совпадение
DYS448	20	20	совпадение
DYS391	11	11	совпадение
DYS456	15	15	совпадение
DYS390	25	25	совпадение
DYS438	11	11	совпадение
DYS392	11	11	совпадение
DYS518	39	39	совпадение
DYS570	19	20	несовпадение*
DYS437	14	14	совпадение
DYS385 a/b	12, 13	12, 13	совпадение
DYS449	31	31	совпадение
DYS393	13	13	совпадение
DYS439	11	11	совпадение
DYS481	23	23	совпадение
DYF387S1	37, 39	37, 39	совпадение
DYS533	12	12	совпадение

* предполагаемая мутация

Полученные данные указывают, что между Y-STR профилями донора образца **Ребенок 1** и донора образца **Предполагаемый дедушка 1** наблюдается совпадение по всем, кроме одного, исследованным Y-STR маркерам, что свидетельствует о том, что донор образца **Предполагаемый дедушка 1** может являться биологическим дедушкой донора образца **Ребенок 1** по отцовской линии. Несовпадение по маркеру DYS570 может быть обусловлено мутацией, т.к. данный маркер относится к быстро мутирующим Y-STR маркерам (Ballantyne K.N. et al. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. Am. J. Hum. Genet. 2010; 87: 341–353).

Выводы

1. Биологическое отцовство биологического сына донора образца с маркировкой:
«**ФИО2**», в отношении донора образца с маркировкой:
«**ФИО1**», в рамках проведенного исследования, не исключается.
2. Вероятность биологического отцовства биологического сына донора образца с маркировкой: «**ФИО2**», в отношении донора образца с маркировкой: «**ФИО1**» (при условии, что другие варианты патрилинейного родства не рассматриваются), по результатам настоящего исследования составляет 99.7955%.