

***Universitatea de Medicina si Farmacie
„Carol Davila” Bucuresti***

*Teza de Doctorat
- Rezumat -*

***Studiul comparativ privind aportul
introducerii cercetarii ADN in expertiza
filiatiei fata de metodele utilizate pana
in prezent in tara noastra***

*Conducator stiintific
Prof. Univ. Dr. Vladimir Belis*

*Doctorand
Corina Stefanescu*

Bucuresti 2007

CUPRINS

I. CONSIDERATII TEORETICE PRELIMINARE

A. REGLEMENTAREA JURIDICA A FILIATIEI

A.1. Date teoretice preliminare: definitia filiatiei, clasificarea filiatiei, stabilirea filiatiei

A.2. Prevederile Codului Familiei referitoare la filatie

B. TEMEIURILE JURIDICE ALE EXPERTIZEI MEDICO-LEGALE A FILIATIEI

B.1. Consideratii generale privind expertiza si constatarea medico-legala

B.2. Expertiza medico-legala - Forma expertizei juridice – expertiza filiatiei in contextul altor expertize si constatari medico-legale - baza juridica, cadrul organizatoric, metodologia expertizei, expertii medico-legali

C. BAZELE GENETICE ALE EXPERTIZEI MEDICO-LEGALE A FILIATIEI

C.1. Bazele celulare ale ereditatii. Cromozomi. Gene

C.2. ADN nuclear - suportul material al ereditatii - structura, organizare, functii, nomenclatura

C.3. Legile clasice ale transmiterii caracterelor ereditare

C.4. Determinismul genetic al caracterelor ereditare

C.5. Variabilitatea genetica

C.6. Genetica populatiilor. Echilibrul Hardy Weinberg (EHW)

D. MARKERII GENETICI FOLOSITI IN EXPERTIZA MEDICO-LEGALA A FILIATIEI

D.1. Metode de cercetare indirecta - Sistemele eritrocitare, serice, enzimatice, gustator-negustator, secretor-nesecretor, HLA

D.2. Metode de cercetare directa – testarea ADN - Polimorfismul ADN nuclear necodant, markerii ADN utilizati in cercetarea filiatiei, tehnici de analiza moleculara utilizate curent in genetica judiciara

E. INTERPRETAREA PROBABILISTICA A REZULTATELOR TESTELOR ADN IN CAZURILE DE FILIATIE

F. CAZURI SPECIALE DE INVESTIGARE A FILIATIEI PRIN TESTE GENETICE

G. NOI MARKERI ADN FOLOSITI IN GENETICA MEDICO-LEGALA

G.1. Markerii cromozomului Y

G.2. Markerii cromozomului X

G.3. ADN mitocondrial (ADNmt)

H. STANDARDELE DE ANALIZA IN INVESTIGATIILE GENETICE DE STABILIRE A FILIATIEI

I. PERSPECTIVE LEGATE DE TESTAREA ADN A PATERNITATII

II. CONTRIBUTII PERSONALE

A. STUDIUL METODELOR DE LABORATOR UTILIZATE IN INVESTIGAREA MEDICO-LEGALA A FILIATIEI

A.1. Baza teoretica cunoscuta si acceptata

A.2. Tehnici curente de serotipare

A.3. Valoarea si limitele diferitelor metode de laborator serologice

A.4. Dinamica investigatiilor de filatie corelata cu metodele de testare pe plan national si in lume

A.5. Studiul statistic al cazurilor investigate prin tehnici genetice in INML Bucuresti intre anii 2004-2006

A.6. CONCLUZII

B. STUDIUL COMPARATIV AL TEHNICILOR DE GENOTIPARE UTILIZATE IN INVESTIGAREA FILIATIEI IN LABORATORUL DE GENETICA AL INML INTRE 1999-2006

B.1. Baza teoretica cunoscuta si acceptata

B.2. Obiectivele studiului

B.3. Cazuistica studiata

B.4. CONCLUZII

C. STUDIUL COMPARATIV AL TEHNICILOR DE GENOTIPARE SI TIPURILOR DE MARKERI ADN UTILIZATI IN INVESTIGAREA UNOR RELATII DE INRUDIRE COMPLEXE

C.1. Baza teoretica cunoscuta si acceptata

C.2. Obiectivele studiului

C.3. Studii de caz

C.4. CONCLUZII

III. CONSIDERATII GENERALE

IV. CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE (in ordinea aparitiei in text)

I. CONSIDERATII TEORETICE PRELIMINARE

A. REGLEMENTAREA JURIDICA A FILIATIEI

Investigarea filiatiei biologice a reprezentat una din cele mai mari provocari ale medicinei legale din cele mai vechi timpuri. Transmiterea caracterelor de la o generatie la alta a fundamentat primele cercetari genetice si a fost una din problemele in solutionarea carora medicina legala a fost chemata sa furnizeze dovezi inca de la inceputul civilizatie umane. Stabilirea filiatiei fata de mama si fata de tata au facut insa obiectul unor prevederi speciale ale diferitelor sisteme judiciare in toate timpurile deoarece insasi familia si proprietatea s-au bazat pe filiatie. Abia in ultimii ani insa, in conditiile in care amprenta genetica a fost in mod definitiv acceptata de sistemul juridic ca o proba medicala irefutabila, excluderea unui barbat intr-un proces de paternitate a putut sa fie pronuntata cu certitudine.

A.1. Date teoretice preliminare: definitia filiatiei, clasificarea filiatiei, stabilirea filiatiei. In cel mai larg sens juridic, filiatia reprezinta legatura de sange care exista intre un descendent si ascendenti sai (stramosi). In sens restrans, notiunea de filiatie reprezinta raportul de descendentia dintre un copil si fiecare dintre parintii sai. [2]. Filiatia este legatura biologica care apare generata de actul nasterii. Filiatia este clasificata in imediata (copil – parinti), indirecta si indepartata (in familie, rude de gradul doi). [3]. Legatura directa dintre mama si copil poarta frecvent numele de maternitate iar cea dintre copil si tatal sau poarta numele de paternitate. Filiatia genereaza raporturi juridice si este bine reglementata din punct de vedere juridic. [4]

A.2. Prevederile Codului Familiei referitoare la filiatie. Stabilirea filiatiei copilului fata de parinti a fost reglementata prin Codul Familiei inca din anul 1954. Codul Familiei [5] reprezinta izvorul principal al dreptului familiei, si este considerat o ramura de drept independent. Principiile de baza ale Codului familiei sunt desprinse din legea fundamentala a Romaniei: Constitutia Romaniei. In Constitutie sunt mentionate egalitatea sexelor precum si faptul ca statul ocroteste casatoria si familia si apara interesele mamei si ale copilului [6]. **Filiatia fata de mama** se stabileste din punct de vedere juridic prin certificatul constatator al nasterii. Stabilirea filiatiei fata de mama presupune doua conditii: (a) Nasterea din partea unei femei a unui copil; b) Identitatea copilului nascut de femeie cu copilul care se prevaleaza a fi descendentul femeii respective. Cat timp exista o concordanta intre actul de nastere al copilului si starea civila pe care o foloseste aceasta, se presupune ca ne aflam in fata unei realitati pe care nu o poate contesta nimeni, nici chiar copilul (art. 75 din C.F.). **Filiatia fata de tata**, in virtutea fidelitatii conjugale, rezulta din prezumtia de paternitate [4,7]. In anumite imprejurari, intre notiunea de tata biologic (tata real, genetic) si cea de tata juridic exista o discordanta in sensul ca, juridic, copilul este descendentul unui parinte iar biologic este descendentul altuia. Lipsa de coincidenta a filiatiei biologice cu cea legala duce la un conflict de filiatie. Astfel, cercetarea filiatiei se va face ori de cate ori tatal este necunoscut (ca in caz de "plurium concubitus") [8] sau cand acesta nu-si recunoaste copilul (copii ilegitari) si mai rar in caz de tagada a paternitatii, cand, intr-un cuplu legitim, tatal contesta paternitatea unui copil legitim. [2] Prevederile Codului Familiei [5] privind filiatia fata de tata sunt cuprinse in articolele 53-61.

Expertiza medico-legala a filiatiei poate fi solicitata in unele cazuri penale: pruncucidere, infanticid, viol, incest, care au avut ca urmare nasterea unui copil.

B. TEMEIURILE JURIDICE ALE EXPERTIZEI MEDICO-LEGALE A FILIATIEI

Caracterul interdisciplinar al medicinei legale nu este subliniat numai de relatiile cu toate specialitatile medicale ci si de relatiile ei cu unele ramuri ale dreptului [3]. Relatiile medicinei legale cu dreptul penal sunt deja bine cunoscute si o rediscutare a lor nu isi gaseste locul in aceasta lucrare. Legatura stransa dintre medicina legala si dreptul civil si cel al familiei trebuie insa bine retinuta deoarece medicina legala este singura care poate aduce probe definitive care pot influenta procesul civil. Raporturile cu dreptul familiei se refera la probarea conditiilor medicale cerute de casatorie, motivele medicale ce justifica desfacerea ei, cercetarea paternitatii, etc.

Expertiza medico-legala a filiatiei (EMLF) face parte din expertizele medico-legale care pot fi solicitate in cursul unui proces civil si/sau penal sau pot fi solicitate de catre parti in mod direct. In toate aceste situatii, EMLF trebuie sa respecte cadrul procedural stabilit de lege.

C. BAZELE GENETICE ALE EXPERTIZEI MEDICO-LEGALE A FILIATIEI

C.1. Bazele celulare ale ereditatii. Cromozomi. Gene. Fiecare individ are un program genetic propriu, unic, fiind astfel o entitate singulara si irepetabila in timp si spatiu.

In celula somatica umana se gasesc 23 perechi de cromozomi ($2N$ =garnitura diploida), 23 mosteniti de la mama, 23 de la tata. Dintre acestia, 44 de cromozomi (22 de perechi) se numesc **cromozomi autozomi**, intrucat codifica majoritatea caracteristicilor individuale, dar nu si pe cele legate de sex. Cromozomii autozomi din aceeasi pereche sunt omologi, dar nu identici. Ceilalti 2 cromozomi, se numesc **cromozomi sexuali** (XY) si au rol important in determinarea sexului genetic si a altor caracteristici legate de sex. Celulele sexuale contin numai 23 cromozomi si se numesc celule haploide (N =garnitura haploida). In procesul fecundatiei cei doi gameti participa cu un numar inumatatit de cromozomi, fenomen posibil, datorat diviziunii meiotice: 22 autozomi + 1 cromozom sexual X sau Y (spermatozoidul = 22 autozomi + Y sau X; ovulul = 22 autozomi + X), [33, 34].

Cromozomii sunt formati din material genetic codant si material genetic non-codant (genic si extragenic). Fiecare cromozom are un numar specific de gene. In acceptul clasic mendelian, *genele* reprezinta unitati de baza cu functie ereditara. In prezent **gena** este definita ca *unitatea genomica transcriptionala care codifica direct molecule de ARN matur, asigurand materializarea informatiei codificate sub forma unor proteine unice sau multiple*.

Genele situate pe acelasi locus ai unei perechi de cromozomi omologi se numesc *alele genice*. Astfel, fiecare gena are doua alele, una situata pe cromozomul de origine paterna, si o alela situata pe cromozomul de origine materna. Daca alelele de origine materna, respectiv cele de origine paterna sunt diferite ca structura, individul este *heterozigot*, iar daca cele doua alele sunt identice ca structura individul este *homozigot*. Orice individ este homozigot pentru unele gene si heterozigot pentru altele. In timpul meiozei, alelele se separa o data cu cromozomii pe care se afla, incat gametii, fiind celule haploide, vor avea o singura alela din fiecare pereche.

Totalitatea genelor dintr-un organism constituie **genotipul**. Genotipul unei celule diploide este format din doua seturi complementare, unul patern si celalalt matern [37].

Fenotipul reprezinta expresia vizibila a genotipului, corespunzand trasaturilor vizibile ale tuturor caracterelor. Intre genotip si fenotip exista o relatie cauzala, in sensul ca manifestarea fenotipica este conditionata de relatia dintre genele sale. Fenotipul poate prezenta modificari ale unora dintre trasaturilor sale in cursul vietii unui individ.

Relatiile dintre alelele unei gene pot fi de *dominanta*, *recesivitate* sau *codominanta*. Dominanta consta in manifestarea vizibila (fenotipica) la un progen a unei singure trasaturi de caracter din cele doua trasaturi diferite de la parinti. Alela genica raspunzatoare de acest efect se numeste *alela dominanta*, iar alela complementara ei, al carei efect nu este vizibil, fiind estompat de alela dominanta, se numeste *alela recesiva*.

Expresia fenotipica (biochimica, imunologica ssau morfologica) a unei gene se numeste **marker genetic**. Caracterele biochimice si imunologice sunt determinate de regula de o singura gena, in timp ce caracterele morfologice sunt poligenice.

Pentru ca un **marker genetic** sa fie folosit in expertiza medico-legala a filiatiei este necesar ca acesta sa indeplineasca urmatoarele conditii: (1) sa fie prezent de la nastere; (2) transmiterea lui ereditara sa se faca dupa legi bine stabilite; (3) sa fie stabil in timpul vietii (4) sa nu fie influentat de factori de mediu, varsta, patologie, etc. [37].

C.2. ADN nuclear - suportul material al ereditatii. In nucleul celulelor, informatia genetica este concentrata la nivelul moleculei de ADN. Acizii nucleici sunt macromolecule informationale ce permit stocarea, transmiterea si exprimarea informatiei genetice. Informatia genetica se refera la biosinteza

proteinelor si este continuta in molecula de ADN ce reprezinta baza chimica a ereditatii [35, 39]. ADN are in structura sa o unitate invariabila, complexul glucidofosforic, si o unitati variabile, bazele azotate: *purinice*, adenina (A) si guanina (G), si *pirimidinice*, timina (T) si citozina (C). Continutul informational rezulta din modul in care sunt ordonate cele 4 tipuri de nucleotide, adica din *secventa* sau ordinea in care se succed “literele” in lungul lantului de ADN. Nucleotidele se leaga intre ele formand *lanturi de polinucleotide* prin intermediul unei enzime **ADN-polimeraza**. La randul lor, cele doua catene ADN sunt legate intre ele prin intermediul unor legaturi de hidrogen, legaturi covalente slabe. Conexiunea se face intre bazele azotate si este o conexiune specifica, bazata pe *complementaritate stricta*, in sensul ca adenina se leaga numai cu timina, iar guanina numai cu citozina. Legatura dintre cele doua catene se realizeaza prin puncti de hidrogen intre perechi de baze situate la acelasi nivel in cele doua catene: doua puncti de hidrogen intre adenina si timina si trei puncti intre guanina si citozina. Faptul ca la acelasi nivel aditionarea radicalului fosforic la dezoxiriboza este diferita (intr-o catena la pozitia 3', iar in catena complementara la pozitia 5') a dus la concluzia ca cele doua catene sunt indreptate in directii opuse. Prin urmare cele doua catene complementare au o orientare spatiala inversa sau *antiparalela*, fiind orientate in directii opuse (sens si antisens)

ADN nuclear este oragnizat in gene si secvente inrudite cu genele in proportie de 20-30%, din care ADN codant genic <10% si ADN non-codant (introni, pseudogenele) >90%. Restul ADN nuclear este reprezentat de secvente repetitive unice sau cu un numar mic de repetitii (70-80%) moderat si inalt repetitive (20-30%), din care: repetitii intercalate in genom (40% - Alu repetitiile), repetitii grupate in tandemuri (60% - macrosateliti, minisateliti, microsateliti. ADN nuclear indeplineste doua mari functii: replicarea si transcriptia. Procesul de biosinteza a ADN este un proces de mare complexitate, care necesita [38]: ADN matrita (template); prezenta celor patru dezoxiribonucleozid-trifosfati (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); prezenta ionilor de magneziu; un sistem multienzimatic.

C.3. Legile clasice ale transmiterii caracterelor ereditare. Bazele stiintifice care stau la baza expertizelor medico-legale genetice sunt legile genetice de transmitere ereditara a caracterelor - Legile lui Mendel: 1. *Legea puritatii gametilor (legea segregarii caracterelor)*; 2. *Legea asortarii (segregarii independente a caracterelor)*

C.4. Determinismul genetic al caracterelor ereditare. Intre genotip si fenotip exista o relatie cauzala, in sensul ca manifestarea fenotipica este conditionata de relatia dintre genele sale. Fenotipul poate prezenta modificari ale unora dintre trasaturile sale in cursul vietii individului. Interrelatiile alelice se manifesta prin dominanta-recesivitate si prin codominanta.

C.5. Variabilitatea genetica. Variabilitatea genetica reprezinta diferenta care apare intre un individ si populatia in mijlocul careia traieste si care este datorata fondului genetic individual si mai putin mediului inconjurator. Variabilitatea genetica reprezinta mai mult posibilitatea unui individ de a se adapta printr-o suita de modificari si variatii genetice. Lipsa variabilitatii induce o populatie stagnanta, rigida [50]

C.6. Genetica populatiilor. Echilibrul Hardy Weinberg (EHW). O populatie genetica, definita printr-un nummar minim de 500 de indivizi, are o mare stabilitate de-a lungul generatiilor. Indivizii unei astfel de populatii au sanse egale de imperechere, astfel incat variatiile caracterelor genetice care apar sunt considerate neglijabile. Proprietatea de stabilitate (constanta) caracteristica populatiilor mari nu se mai mentine in cazul populatiilor mici: indivizii devin din ce in ce mai uniformi din punct de vedere genetic ca rezultat al cosangvinizarii si creste frecventa formelor homozigote in dauna celor heterozigote. La homozigozitate totala a populatiilor mici si izolate (subpopulatii) nu se ajunge practic niciodata deoarece factorii mutageni naturali produc schimbari in substratul genetic al acestor linii cosangvinizate [39]. In 1908, independent unul de celalalt, matematicianul englez G.H. Hardy si fizicianul german W. Weinberg semnalau ca exista o relatie intre frecventa genelor si a genotipurilor in cadrul populatiilor: frecventa genotipurilor la descendentii este conditionata de frecventa genelor la formele parentale. Astfel a luat nastere una din legile fundamentale ale geneticii populatiilor – **legea Hardy-Weinberg (formula H-W, echilibrul H-W)**. Echilibrul Hardy Weinberg descrie comportamentul unor alele intr-o populatie si stabileste o legatura previzibila intre frecventa alelelor si genotip analizand un singur locus.

D. MARKERII GENETICI FOLOSITI IN EXPERTIZA MEDICO-LEGALA A FILIATIEI

D.1. Metode de cercetare indirecta. Principalele elemente de analiza genetica sunt: sistemele eritrocitare (sistemul ABO), sistemele serice, sistemele enzimactice, sistemul limfocitar HLA, sistemul secretor - nesecretor, sistemul gustator - negustator, expertiza antropologica, etc. Distributia acestori markeri intr-o populatie nu este egala, dar exista date populationale care permit efectuarea unui calcul de probabilitate legat de un anumit caracter.

Sistemul limfocitar HLA. Sistemul imunitar al organismului uman recunoaste orice agresiune din mediul extern sau intern prin intermediul moleculelor HLA (Human Leucocyte Antigen). Reprezinta un sistem de molecule proteice situate pe suprafata tuturor celulelor nucleate si face parte din complexul major de histocompatibilitate. Antigenii se leaga de moleculele HLA si ulterior initiaza raspunsul imunitar. Antigenele HLA se pot evidentia din saptamana a sasea de viata embrionara si raman stabile pe tot parcursul vietii unui individ [59]. Majoritatea indivizilor umani sunt heterozigoti pentru sistemul HLA de clasa I si II. S-a demonstrat prin studii efectuate pe populatii izolate si cu grad crescut de cosanguinitate ca are loc o selectie preferentiala a heterozigotilor, in defavoarea homozigotilor.

Sistemul HLA este codificat de gene situate pe bratul scurt al cromozomului 6, unde ocupa o regiune de cca 4Mb. Fiecare locus poate fi ocupat de mai multe alele. La nivelul acestui cromozom genele HLA- A, B, C si D au localizari clar stabilite. Regiunile HLA-A, B si C, care codifica pentru moleculele de clasa I sunt situate catre extremele cromozomului si sunt foarte polimorfe. (HLA-A si HLA-B cu 23 si respectiv 49 de haplotipuri). Regiunea HLA - D este situata central si codifica moleculele de clasa II-a si are trei loci denumiti DP, DQ si DR [60]. Antigenele HLA se transmit genetic urmand legile de transmitere mendeliene pe sistem codominant. La nivelul anilor '80 a fost singurul sistem de markeri genetici care aveau un asemenea polimorfism intr-un model genetic asa de bine definit

Studiul antigenelor HLA-A, B si C (clasa I) necesita limfocite T din sangele periferic, iar pentru evidentierea antigenelor HLA-DR, DP si DQ (clasa II) se folosesc doar limfocite B din sangele periferic [61]. Tipizarea HLA poate fi realizata in principal prin doua metode: **tipare serologica** si **tipare moleculara**.

D.2 Metode de cercetare directa – testarea ADN

D.2.1 Polimorfismul ADN nuclear necodant. Din totalul cantitatii de ADN nuclear, genele reprezinta doar 3%, restul fiind reprezentat in majoritate de secventele de ADN non-codant ce se repeta de un numar mare de ori (ADN non-codant de tip repetitiv). Dintre tipurile de material genetic necodant de tip repetitiv, secventele ADN inalt repetitive constituie obiectul investigatiilor care conduc la identificarea persoanelor si stabilirea relatiilor de descendentă biologica.

Secventele de ADN inalt repetitive sunt structurate in tandemuri repetitive, si cunoscute sunt sub numele de: • *microsateliti* – succesiuni de 1-5 nucleotide repetate de cateva sute de ori; • *minisateliti* – succesiuni de aproximativ 15 nucleotide repetate de sute sau mii de ori; • *macrosateliti* – unitati repetitive mari de mii de nucleotide. Structura lor particulara fiecarei persoane se datoreaza numarului diferit de unitati repetitive ce compun un tandem repetitiv situat pe un anumit locus cromozomial.[64]

Generarea polimorfismelor repetitive in genomul uman. Polimorfismul datorat variatiilor numarului de elemente din compunerea unui sir repetitiv este generat prin intermediul proceselor mutationale de tip **slippage strand mispairing** ce au loc in timpul replicarii moleculei de ADN [65, 66]. Mecanismul consta in aluncarea unei catene pe deasupra celeilalte (*slippage*), urmata de imperechere nespecifica si formarea unei bucle (*slippage-loop*). Daca aceasta structura nou formata nu este corectata, are drept consecinta **deletia sau insertia unor unitati repetitive** (*“model mutational in trepte”- stepwise mutation model*) (Eissen J.A. 1999, citat de [47]).

Caracteristici generale ale polimorfismelor ADN repetitive. Diferentele interindividuale in structura ADN necodant sunt considerate ca reprezentand *polimorfisme ADN*. Secventele polimorfe repetitive,

asemeni genelor, ocupa in genom pozitii fixe denumite *loci*. Polimorfismul creat de aceste elemente repetitive poarta denumirea generica de *polimorfism prin numarul variabil al tandemurilor repetitive* (VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*).

Clasificarea sistemelor STR. International Society of Forensic Genetics a propus urmatoarele criterii de clasificare a sistemelor de markeri STR utilizate in mod curent in practica medico-legala [73]. Clasificarea tine cont de variabilitatea secventelor repetitive: • **STR simple** - constand intr-o secventa repetitiva regulata (ex.: markerul HUM FES/FPS) • **STR cu microvariatii simple** - variantele tin de modificarea secventei repetitive (ex.: markerii HUM TH01, F13A01). • **STR microvariatii compuse** - variatiile a doua sau mai multe secvente repetitive se datoreaza prezentei unor structuri aditionale si/sau variatii ale lungimii (ex.: markerii HUMVWAF31) • **STR compuse cu repetitii complexe** (ex.: D21S11) • **STR hipervariabile** : HumACTBP2 (SE33)

Validarea sistemelor de markeri ADN in practica medico-legala. Utilitatea unui marker STR pentru investigatiile medico-legale se apreciaza dupa urmatoarele criterii [75, 76]: • **specificitate de specie**: sistemele STR CSF1PO, TPOX, TH01, FES/FPS, F13A1, VWA, etc. prezinta spre exemplu inalta specificitate pentru specia umana; nu se obtin produse PCR in urma amplificarii sistemelor STR enumerate pentru alte specii decat specia umana, exceptand primatele (cimpanzei); • **sensitivitate**: sistemul STR-PCR trebuie sa fie suficient de robust incat mixturi de ADN din diferite surse si in proportii de 1:10 sa fie genotipate corect, cu evidentierea integrala a tuturor alelelor; in caz de esec al amplificarii, este cercetat curent fenomenul *alelelor nule* ce reprezinta alele ale moleculei de ADN investigat care nu amplifica datorita unor polimorfisme ale situsurilor de legare a amorsoanelor PCR si solutia evidentierii acestor alele o reprezinta redefinirea structurala a amorsoanelor cu evitarea situsurilor de legare polimorfe; • **reproductibilitate**: alelele cu aceeasi structura sa fie detectata corespunzator indiferent de metoda de vizualizare a produsilor de reactie intrebuintata; • **contaminare bacteriana**: sistemele STR HUMTH01, TPOX, CSF1PO au fost testate extensiv pe ADN apartinand microorganismelor care pot contamina in mod uzual probele biologice, insa nici un produs PCR nu a fost obtinut in urma amplificarii la peste 30 de microorganisme. Nu acelasi lucru a fost obtinut si pentru alte sisteme de markeri. De exemplu, pentru locusul D1S80, apartinand sistemelor VNTR, s-au obtinut produse de amplificare pornind de la ADN bacterian, iar respectivii produse PCR au prezentat dimensiuni asemanatoare dimensiunilor alelelor locusului D1S80 uman; • **indexul discriminatoriu**: obligatoriu < 1%; pentru locii STR curent utilizati in cercetarea filiatiei, ID este cuprins in general intre 0,82-0,99; combinatia a 7 sisteme STR conduce la un ID de aproximativ 1:100.000.000 ; • **rata mutatiilor cat mai scazuta** : de regula mai putin de 0,001 –0,0001. [39]

Valoarea microsatelitilor STR in investigatiile medico-legale

Avantajele utilizarii markerilor STR: 1. Necesita pentru analiza cantitati extrem de mici de material genetic, incluzand aici si ADN degradat: genotiparea STR permite utilizarea de ADN degradat in comparatie cu alti markeri ADN, datorita abundentei microsatelitilor in moleculele de ADN aflate in stadii avansate de degradare. 2. Genotiparea STR se poate face si pe ADN obtinut si prin tehnici de purificare rapida. 3. Amplificarea genica este mai usor si mai sigur de realizat pentru unitati repetitive din genom avand lungimea secventei de 3-6 perechi de baze (STRs). (a) sensibilitatea si randamentul reactiei PCR foarte bune [77]; (c) ampliconii locilor STR au lungimi mai mici de 400 pb, deci mult mai mici in comparatie cu materialul genic detectat prin analiza VNTR. 4. Amplificarea este mult simplificata prin efectuarea unei amplificari simultane pentru mai multi loci STR - reactii de amplificare de tip multiplex (*PCR multiplex*), precum si posibilitatea analizei simultane si automate a produsilor de reactie prin *electroforeza multiplex*. 5. STR sunt markeri moleculari polimorfi, au o distributie de tip discontinua (discreta) a ordinului lor de marime , lucru ce permite alcatuirea unor scale cu etaloane de marime (alelic ladder). Compararea produsilor de reactie cu aceasta scara alelica etalon permite detectarea rapida a alelelor. Nivelul de precizie cu care sunt definite alelele markerilor STR nu este comparabil cu al niciunui alt sistem de markeri genetici - alelele locilor STR pot fi detectate cu o deviere standard apreciata intre 0,5pb [51]. 6. Rezultatele pot fi inregistrate in format digital, permitand

alcatuirea unei baze de date si comparea directa cu alte rezultate continute in bazele de date ADN. 7. Eficienta aplicarii sistemelor STR in investigarea paternitatii se exprima prin probabilitatea generala de excludere (General Exclusion Chance). Utilizarea combinata a unui set de minimum 6 markeri STR conduce la valori ale GEC de peste 99,99% [78].

Dezavantajele utilizarii markerilor STR. 1. Microsatelitii STR au un polimorfism mai mic decat al minisatelitilor VNTR de tip unilocus si pe deasupra prezinta si un grad inalt de homozigotate - puterea de discriminare a markerilor STR se bazeaza pe capacitatea acestora de a fi analizati simultan, in combinatii de 3 pana la 16 loci STR prin *reactii PCR multiplex*. De regula, pentru compararea a doua probe ADN se impune studiul a minimum 6 loci STR. 2. Analiza STR face frecvent obiectul contaminarilor cu ADN uman, bacterian sau viral din mediu, in etapele de pregatire a probelor de ADN, la manipularea primerilor de reactie, la pregatirea reactiei de amplificare sau in etapa de analiza a produsilor de reactie. 3. Dezavantajul major al sistemelor STR tine de incidenta evenimentelor mutationale ; discriminarea intre un fenomen mutational si o excludere devine un aspect critic cazurile de paternitate ; riscul raportarii unor pseudo-excluderi datorate in fapt unor fenomene mutationale trebuie avut permanent in vedere si foarte bine evaluat [78].

D2.2. Markerii ADN utilizati in cercetarea filiatiei

a) **Minisatelitii VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats). VNTR unilocus sunt caracterizati printr-un grad inalt de polimorfism si heterozigotate, si de aceea poseda o inalta putere discriminatorie in analizele de paternitate.

b) **Microsatelitii STR (Short Tandem Repeats)**. Secventele de ADN repetitiv de tip STR, spre deosebire de minisateliti (VNTR), sunt de dimensiuni mult mai mici, lucru care le recomanda pentru analiza PCR. Microsatelitii de tip STR unilocus au un grad mai scazut de polimorfism si heterozigotate, de unde rezulta si informativitatea lor mai scazuta. Dintre sutele de tipuri de STR identificate in genomul uman, pentru practica medico-legala sunt utilizate doar sistemele STR cu: - localizare unica; - formate din tetra- si pentarepetii ; - potential mare de discriminare ; - minimum de artefacte genetice (microvariante); - minimum de artefacte de amplificare (stutter bands, shadow bands) [72, 76].

D.2.3. Tehnici de analiza moleculara utilizate curent in genetica judiciara. Tehnicile de analiza ADN de laborator parcurg in mod obligatoriu urmatoarele etape: • Prelevarea probelor biologice • Izolarea si purificarea ADN din probele biologice • Amplificarea specifica a unor regiuni genomice hipervariabile ale moleculei de ADN • Vizualizarea produsilor reactiei PCR prin separarea electroforetica Analiza statistica a rezultatelor si inscrierea lor intr-o baza de date.

Izolarea si purificarea ADN din probele biologice In procesul izolarii ADN, obiectivul initial il reprezinta indepartarea treptata a tuturor impuritatilor de natura proteica, ionica sau polizaharidica ce ar putea prejudicia analiza. Exista **metode de extractie "clasice"**, unele extrem de laborioase prin care se obtine ADN pur si exista metode mai recent elaborate, unele foarte rapide si pretabile la procese de automatizare (metode denumite "**quick and easy**"). Prin acest ultim tip de metode se obtine ADN de puritate medie, dar care se preteaza la analiza ulterioara prin tehnica PCR. [85]

Tehnici de genotipare Pentru genotiparea ADN in scop de identificare se utilizeaza in mod curent tehnica PCR. Analiza polimorfismului lungimii fragmentelor de restrictie RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) desi a fost prima tehnica pe care Jeffreys si echipa sa au folosit-o de in genotiparile ADN medico-legale, nu mai este de uz curent. Se incearca tot mai frecvent in ultima vreme a se renunta la tehnicile laborioase, consumatoare de timp. De aceea se opteaza din ce in ce mai mult la analiza PCR sau la alte procedee lucru automatizate [88].

Avantajele si dezavantajele PCR. *Avantajele metodei PCR:* 1. *sensitivitatea* - caracterizata prin capacitatea reactiei de a amplifica chiar si ADN provenit de la o singura celula; reactia se produce de regula cu randament optim pentru cantitati de ADN de ordinul nanogramelor/ μ l; 2. *selectivitatea* – amplificarea PCR este selectiva intrucat numai secventele ADN flancate de amorsele de reactie pot fi amplificate ; restul genomului nu amplifica; 3. *reproductibilitatea* – exista posibilitatea de a repeta testul

din aceeași probă biologică în același laborator sau în laboratoare diferite; 4. *rapiditatea* – maximum 3 ore prin protocoalele de lucru uzuale PCR; 5. *reactia este independentă de starea materialului biologic* – chiar și materialul biologic conținând ADN degradat poate fi amplificat; fragmentele de ADN amplificate sunt de dimensiuni mai mici decât cele analizate prin metoda RFLPs, deci pentru reacție este suficient de informativ și ADN cu un grad înalt de degradare (fragmentat datorită proceselor autolitice); eficiența amplificării este invers proporțională cu lungimea segmentului de amplificat, astfel încât pentru majoritatea reacțiilor PCR se folosesc segmente de ADN tinta mai mici de 2kb. Dezavantajele reacției PCR: 1. *usurinta cu care se produce contaminarea*, iar cea mai uzuală contaminare o constituie chiar produsii de amplificare rezultați din reacțiile anterioare; 2. *sinteza in vitro a ADN este un proces greșit de erori*; rata erorilor asociate cu activitatea Taq-polimerazei este estimată a fi de 0,25%, respectiv o lipsă de incorporare de circa 400 de baze în 30 de cicluri; *generarea în exces de produși de amplificare* - poate uneori inhiba reacțiile din ultimele cicluri ale PCR [39, 74].

E. INTERPRETAREA PROBABILISTICĂ A REZULTATELOR TESTELOR ADN ÎN CAZURILE DE FILIAȚIE

În materie de analiză a probelor biologice în cazurile de paternitate, legătura dintre un copil și prezumtivul tată, nu poate fi făcută fără a se recurge la *date* și *calcule biostatistice*. O probă științifică de tipul unui test ADN trebuie prezentată în instanță de o manieră probabilistică. Expertul științific prelucrează și exprimă probabilistic rezultatele unei investigații ADN pentru a evidenția *forta probantă* (în sensul strict juridic, termenul de forta probantă a unui mijloc de probă desemnează valoarea acelei probe ca element de convingere) a respectivei analize. Termenul de forta probantă are în acest context sensul de eficacitate, aptitudinea testării ADN de a demonstra ceva obiectiv.

Rezultatul probelor științifice de tipul testelor ADN poate fi uneori eronat, acest lucru putând fi neintentionat, datorită unui mod prea simplist de abordare, sau intenționat, datorită unui mod prea sofisticat de prelucrare și argumentare, elaborat de această manieră pentru a permite în final manipularea concluziilor. Încercările de schimbare a rezultatelor reale ale unui test ADN poate veni deopotrivă din partea acuzării sau a apărării. Fără cunoștințe solide în materie de probabilități aplicate la identificările de persoane, este o sarcină extrem de dificilă pentru un judecător să înțeleagă care din argumentele prezentate în instanță sunt corecte și care sunt concepute eronat. De aceea, atunci când expertul științific are sarcina să facă o interpretare biostatistică, este obligatoriu ca el să apeleze la un model de analiză care permită prelucrarea corectă a informațiilor și formularea cât mai clară a concluziilor [94].

Evaluarea rezultatelor unei investigații ADN pentru cercetarea filiației se face prin studiul comparativ al profilelor ADN aparținând persoanelor testate, în care se urmărește dacă au fost respectate legile clasice ale transmiterii caracterelor ereditare.

Atunci când într-o investigație de paternitate, cu mama copilului prezumată ca fiind certă, profilul ADN al copilului evidențiază pe lângă alelele maternelor, o serie de alele ce se regăsesc în profilul barbatului prezumat tată biologic, se poate vorbi de o *confirmare a paternității*.

Rezultatele genotipării trio-ului (mama-copil-prezumtiv tată) sunt introduse în *formula lui Bayes* împreună cu frecvența caracterelor genetice în populația generală (frecvența alelelor). Aplicarea formulei conduce la obținerea *indicelui de paternitate* (PI) și a *probabilității de paternitate* (PP). Probabilitatea de paternitate reprezintă în fapt opinia expertului formulată în termeni statistici cu privire la posibilitatea existenței unei relații de înrudire biologică între copil și barbatul investigat [39].

Formula lui Essen-Møller datează din anul 1938, este o formulă prin care se calculează probabilitatea de filiație folosind teorema Bayes și este reprezentată de un raport (Y/X) între: Y - frecvența barbatilor din populație care posedă aceleași caractere ereditare cu ale barbatului prezumat a fi tată; X - frecvența tatilor adevărați (având caractere ereditare comune cu ale copilului) în aceeași populație.

Acest raport crește sau scade în funcție de rezultatele testelor biologice. În formula sa, Essen-Møller pornea de la ipoteza că probabilitatea ca barbatul indicat ca fiind tată biologic era egală cu probabilitatea ca un alt barbat din populația generală, luat la întâmplare, să fie tată biologic [39]. Gurtler

este cel care a denumit raportul X/Y “*index de paternitate*”. Formula propusa de Gurtler a fost acceptata mai intai in tarile scandinave, insa dupa aceea indexul de paternitate a reprezentat baza evaluarilor statistice a grupelor de sange in filiatie in majoritatea statelor din lume. **Indexul de paternitate (IP)** indica probabilitatea cu care rezultatele obtinute in urma testarii genetice sunt rezultatul unei inrudiri sau al unei simple coincidente. Pentru o baterie de sisteme statistic independente, IP final se obtine prin produsul indicilor de paternitate calculat pentru fiecare sistem [97, 98].

Calculul statistic pentru cazurile de paternitate in care mama lipseste. Cercetarea paternitatii este posibila si in conditiile in care nu se cunoaste profilul genetic al mamei, caz in care analiza porneste tot de la premisa ca un tata biologic transmite obligatoriu copilului jumatate dintre caracterele sale genetice [99]. Daca pentru setul de markeri ADN investigat alelele copilului se regasesc in profilul ADN al barbatului, relatia de inrudire este posibila si se formuleaza o concluzie de confirmare a paternitatii exprimata in termeni de probabilitate. In cazul testarii cuplurilor formate din copil si prezumptiv tata este necesara uneori utilizarea mai multor markeri ADN [100]. Daca se observa ca pentru unii markeri, niciuna dintre cele doua alele specifice evidentiata in profilul ADN al copilului nu se regasesc in profilul barbatului prezumat a fi tatal biologic, atunci respectivul barbat se exclude de la paternitatea copilului. Calculul urmareste in astfel de cazuri exclusiv genotipurile detectate la copil si la prezumptivul tata. Metoda corecta de calcul statistic ia in considerare variantele probabile de transmitere a alelelor pentru locii unde cei doi subiecti, copilul si prezumptivul tata, au in comun una sau ambele alele.

Excluderea de la paternitate. Se formuleaza atunci cand apar neconcordanțe între caracterele genetice evidentiata in profilul ADN al unui copil si cele evidentiata in profilul barbatului investigat in calitate de prezumptiv tata biologic. Concluzia de non-paternitate sau de excludere de la paternitate are valoare absoluta si nu necesita o exprimare statistica. Trebuie obligatoriu sa se prezinte in aceste cazuri criteriile care au stat la baza formularii concluziilor, specificand numarul si tipul de neconcordanțelor evidentiata (neconcordanțe pentru minimum 3 loci din bateria de markeri ADN investigati - “regula celor minime 3 excluderi”). Pana nu demult, “regula de aur a celor 2 excluderi” statea la baza formularii concluziilor de non-paternitate (descoperirea a doua neconcordanțe între profilul tatalui prezumat si cel al copilului, la nivelul a cel puțin 2 loci ADN). Studiarea amanuntita a fenomenelor mutationale ale markerilor ADN de tip STR si VNTR a demonstrat practic faptul ca regula trebuie schimbata, adica o concluzie de non-paternitate necesita evidentiarea unui numar mai mare de neconcordanțe între profilele studiate [99].

Daca se observa o nepotrivire la nivelul unui singur marker din intregul set de markeri ADN investigati, este necesara repetarea testarii pentru a se depista eventualele erori de tehnica. Daca neconcordanța unica persista si dupa largirea investigatiei prin testarea unor markeri ADN suplimentari – in sensul ca nu sunt observate noi nepotriviri, atunci se poate diagnostica cu un grad inalt de certitudine ca este vorba de un **fenomen mutational** la nivelul markerului respectiv. Concluzia expertului va fi de confirmare a paternitatii cu includerea in calculul de probabilitate a ratei mutatiei detectate. Rata mutatiilor raportata pentru markerii ADN poate fi consultata in bazele de date, situandu-se in general pentru markerii STR in jurul valorii de 10^{-3} – 10^{-4} . [102] In aceste cazuri problematice, **calcularea indexului de paternitate pentru mutatii** este primordial.

In cadrul fenomenelor mutationale, un caz deosebit il reprezinta **alelele nule**. Mutatiile survin in astfel de cazuri la nivelul situsurilor de legare a primerilor PCR si prin urmare, alela corespunzatoare situsului de legare mutant nu poate fi evidentiata. In cazul in care se banuieste o astfel de situatie, se pot utiliza primeri ce ocolesc situsul de legare mutant sau tehnici de secventiere, si atunci alela nula poate fi evidentiata. Profilul aparent homozigot datorat unei alele nule se modifica intr-unul de tip heterozigot (Fig.E-1). Testele genetice de paternitate din cazurile prezentei alelelor nule pot conduce la false concluzii de excludere de la paternitate. Existenta unei alele nule se intuieste, este suspicionata, atunci cand pentru un singur locus din toata bateria investigata, profilul homozigot al copilului nu are un corespondent in cel evidentiata la barbatul testat [39].

F. CAZURI SPECIALE DE INVESTIGARE A FILIATIEI PRIN TESTE GENETICE

Testarea ADN prenatala (inainte de nasterea copilului) Prelevarea probelor de tesut fetal se poate realiza in urmatoarele moduri [19, 103]: • prin prelevarea de vilozitati coriale, care au acelasi bagaj genetic ca si oul fertilizat, test ce poate fi facut mai devreme in timpul sarcinii, in saptamanile 10-13, dar nu fara acordul prealabil al unui medic; • prin amniocenteza - test care se poate realiza in semestrul II de sarcina, intre saptamanile 14-20, dar prelevarea de lichid amniotic poate fi periculoasa pentru copil si pentru mama care poate ulterior prezenta sangerari vaginale, pierdere de lichid amniotic, crampe abdominale); • prin vid-extractie in cazul in care femeia opteaza pentru avort. Profilul obtinut din materialul fetal sau mixturi de material fetal cu tesuturi placentare este ulterior comparat cu profilul matern si al prezumtivului tata biologic. Sa nu uitam ca testarea paternitatii pe probe de lichid amniotic are insa riscuri medicale binecunoscute si cei mai multi medici prefera sa nu recurga la aceasta manevra decat in caz de necesitate (diagnostic al unor maladii genetice cu risc malformativ). Medicii recomanda ca etapa de diagnostic prenatal al paternitatii, daca nu poate fi evitata, sa fie atunci precedata obligatoriu de o etapa clinica, de sfat genetic si consult medico-legal [39].

G. NOI MARKERI ADN FOLOSITI IN GENETICA MEDICO-LEGALA

Analiza microsatelitilor autozomali reprezinta coloana vertebrala a oricarei investigatii de genetica judiciara. Exista insa in prezent posibilitatea de a extinde investigatiile care vizeaza stabilirea unor relatii de inrudire prin testarea markerilor STR specifici cromozomilor sexuali si mitocondriali. Toate aceste categorii de markeri au intrat de curand in practica curenta a laboratoarelor de profil din intreaga lume si ele reprezinta un imens castig pentru documentarea cazurilor dificile si formularea concluziilor. Studiul regiunilor hipervariabile mitocondriale si a markerilor cromozomiali X serveste indeosebi la identificarea relatiilor de inrudire pe linie materna, in timp ce markerii specifici cromozomului Y sunt utili pentru stabilirea relatiilor de pe linie paterna.

G.1. Markerii cromozomului Y. La nivel molecular, cu precadere pe bratul lung al cromozomului Y, exista o multitudine de secvente polimorfe, organizate in siruri de tandemuri repetitive. Pentru investigatiile criminale si cercetarea paternitatii sunt studiate cu precadere polimorfismele rezultate prin evenimente mutationale relativ frecvente, de tipul minisatelitilor si microsatelitilor (STR), in timp ce restul polimorfismelor sunt utile studiilor populationale, de evolutionism genetic si diagnosticului unor infertilitati masculine [108, 110]. Spre deosebire de markerii STR autozomali, markerii de tip STR-Y se caracterizeaza prin transmiterea lor dupa modelul uniparental. Sunt foarte utili pentru a compara populatii strans inrudite. Un studiu european la care au participat laboratoare de genetica din mai multe tari a evidentiat faptul ca profilele cromozomiale Y definite printr-un set de 7 loci STR au capacitatea de a discrimina majoritatea indivizilor de sex masculin dintr-o populatie [113]. Studiarea polimorfismelor STR-Y in investigarea relatiilor de descendenta biologica este deosebit de importanta datorita modului de transmitere exclusiv pe linie paterna a acestor markeri. In ultimii ani, o multitudine de laboratoare au inclus in testele ADN de paternitate analiza markerilor STR-Y in cazurile cu progeneri de sex masculin, dar si in cazurile in care tatal prezumtiv nu este disponibil pentru testare fiind decedat, disparut, etc. dar exista rude ale acestuia pe linie masculina: bunic patern, unchi patern, frate patern, un alt fiu legitim pe linie paterna, veri pe linie paterna, etc. Orice barbat inrudit pe linie masculina cu tatal prezumtiv, poate lua parte la testare, furnizand informatii asupra constitutiei moleculare a cromozomului Y patern si permitand astfel cresterea gradului de concludenta al unei investigatii. Aceste cazuri deficitare necesita insa pentru obtinerea unor rezultate corecte utilizarea unui set larg de circa 12-16 markeri STR-Y [114].

G.2. Markerii cromozomului X. Polimorfismele cromozomiale X reprezinta una dintre cele mai noi categorii de markeri moleculari disponibile pentru testarile medico-legale, teste de inrudire si identificare de persoane. Datorita modului particular de transmitere al caracterelor genetice specifice cromozomului X, genotiparea markerilor X-STR este utila atunci cand sunt disponibile pentru testare surori vitrege sau bunica materna. [116]. Introducerea acestor markeri in practica ultimilor 2-3 ani s-a bucurat de un real succes. In timp ce tatii transmit cromozomul X fiicelor lor ca haplotip, mamele transmit materialul lor

genetic X in grupe de linkage, rezultate in urma fenomenelor de recombinare meiotica (crossing-over). Utilizarea markerilor X-STR presupune o buna cunoastere a mecanismelor de linkage ce opereaza dintre diferitele grupe de microsateliti localizati pe cromozomul X. Se cunosc putine date in prezent referitoare la rata mutatiilor pe microsatelitii X-STR. Se recomanda ca raportarea fenomenelor mutationale sa se realizeze dupa studierea a minimum 50 meioze, separate in meioze maternelne si paternale.

G.3. ADN mitocondrial (ADNmt). Mitocondria, care are in mod normal localizare citoplasmatica si rolul de a furniza celulei energie, contine o cantitate mica de informatie genetica. Mitocondria are un material genetic propriu, distinct ca organizare si functie fata de genomul nuclear. Fiecare celula contine in medie 500 de mitocondrii, fiecare din ele continand intre 2 pana la 10 molecule de ADN mitocondrial (ADNmt) [127]. ADNmt uman este o molecula de mici dimensiuni, cu structura circulara dublucatenara, compacta, continand 37 de gene implicate in procesele de fosforilare oxidativa. ADNmt este caracterizat printr-o deosebita economie in organizare, comparativ cu ADN nuclear, putand fi impartit arbitrar in doua regiuni: codanta si necodanta. *Regiunea necodanta* a ADNmt, denumita si regiune de control, se caracterizeaza printr-o serie de variatii structurale intre indivizii umani, denumite *polimorfisme ADNmt*, deosebit de utile in identificari de persoane [128]. ADNmt are doua mari caracteristici: o transmitere ereditara *exclusiv pe linie materna* si lipsa de participare la procesele de recombinare in timpul replicarii celulare. Genomul mitocondrial poate fi considerat un haplotip. Polimorfismele prin *substitutia* sau *insertia* unui nucleotid sunt cel mai frecvent intalnite in cazul ADNmt. Regiunea HVI prezinta mai multe situsuri polimorfe comparativ cu HV2 sau HV3: in medie 4 - 5, fata de numai 3-4 la nivelul HV2 sau 2-3 la nivelul HV3. De aceea, analiza regiunii HVI este mai discriminativa comparativ cu HV2 si HV3 [131]. S-au descris o serie de loci unde polimorfismele mitocondriale, in special cele de lungime, sunt frecvent raportate: HV2- 304. 309. 315. S-a ajuns la un acord unanim ca aceste polimorfisme sa nu fie utilizate in interpretarea probelor pentru confirmarea identitatii unor indivizi sau excluderea acestora [132].

ADNmt nu poate fi utilizat ca unic element de identificare genetica al unei persoane, deoarece indivizi aparent neinruditi, pot avea acelasi ADNmt printr-o descendenta comuna pe linie materna, situata undeva in trecut, uneori la distanta de cateva generatii. Analiza ADNmt poate reprezenta insa unica solutie in cazurile unde genotiparea nucleara nu este posibila (probe biologice foarte degradate sau in cantitati extrem de mici). Analiza ADNmt este extrem de utila si pentru identificari din catastrofe, unde de regula nu este posibila obtinerea unor probe biologice de referinta pentru genotipare, dar unde rudele pe linie materna pot servi ca element de referinta [135].

H. STANDARDELE DE ANALIZA IN INVESTIGATIILE GENETICE DE STABILIRE A FILIATIEI

Datorita internationalizarii ariilor testarilor genetice, a aparut si necesitatea imperioasa a formularii unor recomandari la nivel international, care sa reglementeze standardele de analiza ADN in cazurile judiciare sau de filiatie. Societatea Internationala de Genetica Judiciara (ISFG) a stabilit o Comisie de testare a paternitatii (PTC) cu scopul de a formula criterii internationale valabile pentru investigatiile de paternitate. S-a stabilit ca aceste studii sa se realizeze conform standardelor ISO 17025 (2002 Elsevier Science Ireland Ltd.). Calitatea testelor de paternitate variaza in functie de numerosi factori, cum ar fi: managementul fiecarui laborator, personalul si gradul acestuia de pregatire, calitatea sistemelor, performanta tehnica, dar si modalitatile de inregistrare, stocare si prezentare/raportare a datelor. Fiecare laborator trebuie sa indeplineasca anumite standarde de calitate, acestea fiind cuprinse in ISO 17025: 1999 standard "Reguli generale pentru competenta testelor si calibrarea laboratoarelor".

Cerintele ISO 17025 sunt formulate in termeni generali, iar o anexa a documentului cuprinde norme de aplicare specifice pe domenii de activitate. Comisia pentru Testarea Paternitatii a identificat in documentul ISO 17025:1999 ariile care necesitau explicatii suplimentare si a elaborat o serie de recomandari specifice, menite sa clarifice aspectele legate de testarile ADN de paternitate. Principalele recomandari se refera la [39, 145]: calificarea expertilor stiintifici; validarea metodelor de testare si

stabilirea sistemelor genetice; asigurarea efectuării de teste de confirmare sau de solicitare a unei opinii independente cu privire la o testare atunci când este cazul; măsurile de siguranță referitoare la prevenția contaminărilor cu produși PCR: obligativitatea separării ariilor de lucru, a definirii circuitului probelor și a procedurilor de monitorizare a contaminărilor [139]; participarea obligatorie a laboratorului, la minimum 2 programe de verificare a performanțelor de lucru în fiecare an: consemnarea calificativelor obținute, a observațiilor; prelucrarea, comunicarea și transferul datelor, operațiuni ce trebuie verificate de o manieră sistematică: calculele manuale sau asistate de calculator se efectuează obligatoriu în duplicat, fiind supervizate de expertul științific și/sau conducătorul laboratorului [138]; definirea procedurilor de prelevare și conservare a probelor biologice, de utilizare a reactivilor și altor materiale necesare [144]; formularea concluziilor de probabilitate cu ajutorul indexului de paternitate (paternity index-PI), pornind de la principiul de calcul al ratei de probabilitate (likelihood ratio-LR) [146].

I. PERSPECTIVE LEGATE DE TESTAREA ADN A PATERNITĂȚII

Prin accesul larg și nestingherit la testele ADN de paternitate, cât și prin utilizarea tot mai largă a tehnicilor ADN în proceduri clinice și juridice, tot mai multe cazuri de discrepantă parentală sunt identificate în toate țările lumii. Discrepantă parentală definește fenomenul care apare atunci când un copil este identificat a avea un alt tată biologic decât cel cunoscut [149]. Acest fenomen reprezintă o problemă de sănătate publică deoarece conduce la violență și dezintegrarea unei familii.

Clasic, discrepantă parentală este rezultatul unei relații pe care o femeie o are în afara căsătoriei sau a relației oficiale, dar ea poate apărea și în afara infidelității, când femeia trece rapid de la o relație sexuală la alta (o sarcină de la precedentul partener poate fi atribuită actualului). Foarte rar, fenomenul poate apărea accidental datorită unei greșeli medicale din timpul inseminării artificiale sau a fertilizării in vitro. Pe măsura ce se dezvoltă tot mai mult investigațiile genetice și discrepantă parentală poate fi descoperită relativ ușor și uneori în situații care urmăresc cu totul alt obiectiv, trebuie stabilit un ghid despre când, cui și cum să fie dezvaluite informațiile descoperite. Familia trebuie informată despre consecințele unui test de paternitate printr-un training adaptat fiecărei situații [150]. Deoarece discrepantă parentală este o problemă de sănătate publică, se impune realizarea unor studii care să aprecieze impactul demografic și să cuantifice costurile directe și indirecte. Procedurile clinice și judiciare prin care se descoperă discrepantă parentală trebuie să respecte anumite reguli despre când și cum acest fapt trebuie dezvăluit, iar aceste reguli să fie unanim acceptate și pretutindeni cunoscute și aplicate [151].

Costurile testelor genetice de paternitate. Testele ADN au un pret mai ridicat decât testele serologice deoarece tehnicile de analiză moleculară necesită echipamente și reactivi de laborator cu mult mai costisitori. În plus, toate aceste tehnici moderne necesită și un personal înalt specializat, care trebuie plătit corespunzător muncii pe care o prestează. Periodic, specialiștii în domeniu din țara noastră sunt trimisi să urmeze cursuri în marile centre de cercetare vestice pentru a fi instruiți în noile descoperiri și a putea introduce ulterior tehnici de ultimă oră și în România. Aceste cursuri sunt plătite de laboratoare și nu sunt deloc ieftine. Sistemele de asigurări medicale, fie ele de stat sau private, nu prevăd nicaieri în lume decontarea acestui tip de investigații. Efortul financiar legat de efectuarea unor teste ADN pentru cercetarea filiației este uneori foarte dificil de suportat de solicitanți [39]. Referitor la costul expertizelor de filiație, trebuie spus că în România, testele reprezintă o problemă exclusivă a solicitanților, în timp ce în alte țări, stabilirea unei paternități este considerată o problemă socială. S-a decis că este mai rentabil să se identifice prin testare tatăl biologic al unui copil, decât să se încarce bugetul de stat cu cheltuielile de întreținere și educație ale respectivului copil, până la vârsta majoratului (costurile unei testări, fie ea testare ADN, sunt neglijabile în raport cu cele legate de întreținerea unui minor) [154].

II. CONTRIBUTII PERSONALE

A. STUDIUL METODELOR DE LABORATOR UTILIZATE IN INVESTIGAREA MEDICO-LEGALA A FILIATIEI

Tehnici pentru serotipare grupe sangvine ABO. Principiul metodelor de serotipare consta in reactia antigen - anticorp, vizibila ca o reactie de hemaglutinare, in care substantele plasmatiche de tip anticorpi-aglutinine aglutineaza si hemolizeaza hematiile care au pe suprafata lor antigeni corespunzatori-aglutinogeni. Pentru determinarea fenotipului se utilizeaza doua metode clasice, si anume: • **metoda Beth-Vincent** - pentru determinarea Ag de pe suprafata hematiilor - sangele continand hematii este pus in contact cu seruri test, posedand fiecare un tip de anticorpi specifici (dirijati impotriva antigenelor sistemului ABO). Este vorba de un test de aglutinare a hematiilor cu un serotest. • **metoda Simonin** – pentru determinarea aglutininelor - serul persoanei investigate, continand anticorpi circulanti, este pus in contact cu hematii test, apartinand fiecare la o grupa antigenica specifica sistemului ABO. Este vorba deci de un test de aglutinare a serului de catre hematiile test.

Evaluarea rezultatelor. Probele martor se citesc inaintea citirii si interpretarii probelor de lucru. **Reactie pozitiva:** hematiile aglutinate apar sub forma de conglomerate rosii, separate prin lichid clar si limpede, de culoarea reactivului initial sau a serului pacientului. **Reactie negativa:** amestecul hematii/ser capata o nuanta omogena portocalie. • Daca aglutinarea se produce cu hematiile test A si B, serul contine aglutininele alfa si beta si deci apartine grupei O; • Daca aglutinarea se produce cu hematiile test A , dar nu si cu cele B , serul contine aglutinina alfa si apartine grupei B; • Daca aglutinarea se produce cu hematiile test B , dar nu si cu cele A , serul contine aglutinina beta si apartine grupei A; • Daca aglutinarea nu se produce nici cu hematiile test A , nici cu cele B serul nu contine aglutinine si apartine grupei AB. **Lipsa aglutinarii** poate avea urmatoarele semnificatii : ▪ sange vechi sau incorect prelevat/conservat, ▪ sange de nou-nascuti (aglutininele apar de regula dupa varsta de 4 luni) ▪ persoane in virsta (titrul aglutininelor scade odata cu virsta si pot disparea dupa 70 ani). Rezultatele celor doua metode trebuie sa fie concordante pentru validarea serotiparii ABO. O exceptie de la aceasta regula o reprezinta nou-nascutii cu varsta mai mica de sase luni, la care anticorpii nu sunt bine dezvoltati si care pot da reactii neclare, dificil de interpretat, in cadrul metodei Simonin. **Surse de eroare in determinarea grupelor si subgrupelor ABO:** Pot sa apara in practica in urmatoarele situatii [3, 37]: datorate serurilor hemotest; datorate hematiilor test; datorate sangelui cercetat; erori tehnice; reactiile fals pozitive; reactii datorate exprimarii deficitare sau anormale a grupelor grupelor ABO: • **grupele A si B slab exprimate** • **fenotipul Bombay** • **grupele „Cis AB”** • **himerismul**

Tehnici pentru serotiparea HLA de clasa I. Au la baza testele de microlimfocito- toxicitate. Pentru testare sunt utilizate seruri cu anticorpi anti-antigeni HLA caracterizati printr-o specificitate inalta fata de variatii determinanti antigenici ai sistemului HLA. Serurile anti Ag-HLA se obtin de la pacientii politransfuzati, care au beneficiat de grefe de organe, sau de la femei multipare. Formarea complexelor antigen-anticorp pe suprafata limfocitelor T conduce la liza celulelor, care devin astfel un indicator al specificitatii reactiei antigen-anticorp si totodata un rezultat “pozitiv” al testului [39].

Dinamica investigatiilor de filiatie corelata cu metodele de testare pe plan national si in lume
Volumul investigatiilor de filiatie raportat in lume • In Statele Unite se raportau la nivelul anilor '80, mai precis in 1978, un numar de 11 000 de cazuri de paternitate, efectuate in 259 laboratoare, cu o medie de 42 de cazuri per an si per laborator [147]. • La nivelul anilor '90 numarul total de cazuri investigate serologic si/sau genetic a explodat ajungand la un volum impresionant de circa 100.000 de cazuri. • In 1995-1996, statisticile AABB (*American Association of Blood Banks*) indicau un volum de 170 000 de investigatii de paternitate pe an, efectuate insa la nivelul a numai 45 de laboratoare, toate echipate cu tehnologii foarte moderne [138]. • Dupa anul 2000, acest volum de testari deja urias, s-a triplat si apoi s-a mentinut constant la valori de peste 300.000 de cazuri pe an. Astfel, cazurile de stabilire a paternitatii si a relatiilor de inrudire complexe raportate in anul 2003 au totalizat 354011, cu

3,9 % mai multe decat in anul 2002 si cu 700% mai mult decat in anul 1984. S-a apreciat totodata ca la nivelul anului 2003 aproximativ 991000 de persoane au fost implicate in teste de paternitate [145].

Daca ne raportam la statisticile din **tarile Europene**, se poate spune ca volumul testelor de paternitate a crescut intr-un ritm alert, in special dupa anul 2000. Conform rapoartelor ESWG-ISFG (English Speaking Working Group – International Society of Forensic Genetics) [156]: • in 2003, numarul de cazuri investigate in laboratoarele europene era de aproximativ 30000 de cazuri, testarile fiind efectuate in 58 de laboratoare, cu o medie de 517 cazuri per an si per laborator; • in 2006, numarul de cazuri investigate a crescut la aproximativ 35000, testarile fiind efectuate in 69 de laboratoare; media testarilor per laborator a diminuat insa la 507 de cazuri per an si per laborator, in principal datorita aparitiei unui numar important de laboratoare private, ce activeaza in paralel cu cele oficiale (laboratoarele institutiilor medico-legale, centrelor de transfuzii, universitare) [156].

Schimbarile operate in tehnicile si markerii destinati testelor de filiatie. Practic, in perioada 1993-1998 s-a produs schimbarea de proportii in ce priveste sistemele de markeri si tehnicile de laborator de testare a filiatiei, prin comutarea investigatiilor de la markerii traditionali (antigene eritrocitare, leucocitare, proteice si enzimatic) la sistemele de markeri ADN [157]. Tot intre 1993-1998 au intervenit modificari importante in ce priveste tehnicile de analiza moleculara si chiar sistemele de markeri. Astfel: • tehnica RFLP a fost inlocuita pe scară largă cu aplicatii PCR, pentru ca in ultimii 5 ani aceasta tehnica sa dispara cvasicomplet • tehnicile de detectie in gel su fost inlocuite de tehnici de detectie automata • sistemele de markeri ADN de tip VNTR multilocus au fost inlocuiti cu markeri VNTR unilocus, iar in final, cu markerii STR si mai nou, pentru unele categorii de aplicatii, cu cei SNP [145].

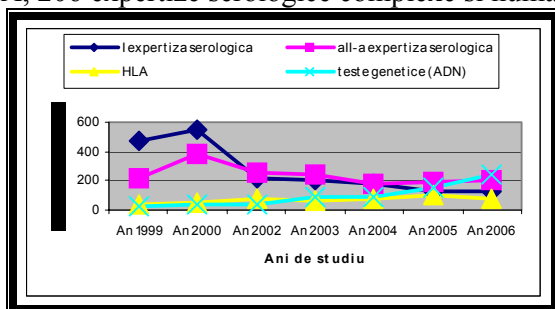
Tehnica	Nr. cazuri	Utilizare %
Ag eritrocitare	3	0,00085
Enzime eritrocitare/proteine serice	0	0
Serotipare HLA	3	0,00085
RFLP	8744	2,475
STR	329467	93,263
SNP	14111	3,994
Markeri cromozomiali Y	65	0,018
Total	353.265	100

Tabel A4-3. Tehnologii utilizate pentru cazurile raportate in 2003 de laboratoarele participante la studiul AABB (dupa [145])

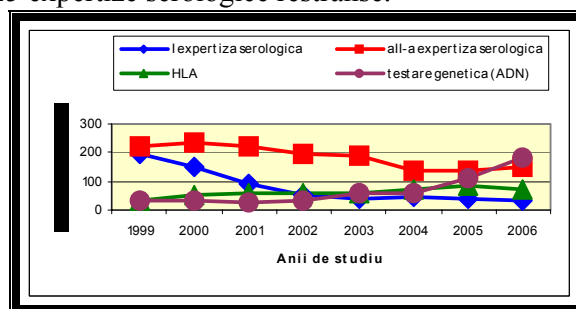
Schimbarile intervenite in ce priveste tipurile de probe biologice utilizate pentru testarile de filiatie. Varietatea probelor biologice acceptate pentru testarea paternitatii a suferit o seama de schimbari, inregistrandu-se o tendinta marcata de a se renunta la prelevatele de sange in favoarea prelevatelor de saliva pe tampoane sau perii de brosaj citologic sau a spoturilor de sange depuse pe microcarduri impregnate. Din totalul probelor testate in 2003 in laboratoarele americane, tampoanele salivare au reprezentat 91.57% din esantioanele prelucrate, in timp ce probele de sange integral numai 3.28% - o reducere semnificativa, de 61%, a probelor de sange fata de anul 2002. In Europa, schimbarile inregistrate sunt de aceeasi natura, dar ritmul de inlocuire al prelevatelor clasice de sange integral este mult mai lent.

Evolutia investigatiilor de filiatie corelata cu metodele de testare in Romania in perioada 1999-2006. Pentru Romania, volumul global al testarilor de paternitate intre 1999-2005 a cunoscut un declin constant, scazand progresiv de la 704 la 320 cazuri expertizate [158]. Declinul inregistrat in acest interval de timp este perfect explicabil in contextul scaderii importante a ratei natalitatii la nivelul tarii noastre. Pentru 2006 volumul investigatiilor de filiatie a cunoscut o crestere semnificativa, de 79.06%, respectiv 573 de cazuri fata de numai 320 din anul precedent). Dinamica crescatoare inregistrata in 2006 poate fi de asemenea corelata cu trendul natalitatii raportat in Romania. Nu trebuie neglijate insa nici

schimbarile operate in sistemul juridic de la noi din tara unde si-au facut aparitia incepand cu 2005-2006 instantele specializate pentru minori si familie si unde problemele legate de stabilirea filiatiei minorilor sunt rezolvate cu celeritate si acordandu-se o importanta cu totul speciala expertizelor stiintifice medico-legale. Dinamica testarilor de paternitate la nivel national trebuie insa corelata strans cu metodologiile de testare existente la nivelul principalelor laboratoare medico-legale. Astfel, incepand cu anul 2000 se constata o scadere constanta progresiva a numarului de cazuri de paternitate expertizate prin metode serologice clasice, declinul acestui tip de testari fiind datorat exclusiv aparitiei noilor tehnologii genetice. In intervalul 2000-2002 testarile serologice clasice in toata tara s-au injumatatit (476 de cazuri in anul 2002, prima si a doua expertiza serologica, fata de 924 in anul 2000). Testarea HLA a inregistrat de-a lungul timpului o crestere permanenta, intr-un ritm lent. Daca in anul 1996 se inregistrau 10 expertize HLA la nivel national, in 1998 numarul acestora se triplase (30 testari HLA), pentru ca ulterior, in anul 2002 sa se dubleze iarasi si sa ajunga la un numar de 73 determinari HLA. In 2005 s-a inregistrat un maxim, de 101 de expertize HLA in toata Romania (fig.A4-4). Introduse in laboratoarele de genetica de pe teritoriul tarii noastre abia din anul 1999, testele genetice de paternitate au cunoscut un real succes in practica medico-legala, numarul de determinari ADN in cadrul cercetarilor de filiatie crescand evident de la an la an. Daca in intervalul de debut 1999-2002 acest trend al testarilor ADN de paternitate nu a fost foarte semnificativ, in anul 2003, numarul lor a depasit investigatiile HLA (95 de determinari ADN la nivel national, fata de numai 64 expertize HLA), iar in 2005 chiar si pe cel al investigatiilor serologice clasice (154 teste ADN fata de 134 prime expertize serologice). In 2006, numarul de investigatii ADN de paternitate a depasit numarul de expertize serologice si HLA: 242 de testari ADN fata de 71 expertize HLA, 206 expertize serologice complexe si numai 125 expertize serologice restranse.



Volumul investigatiilor de filiatie in Romania in perioada 1999-2006



Volumul investigatiilor de filiatie in INML Bucuresti in perioada 1999-2006

Dinamica investigatiilor de filiatie corelata cu metodele de testare - in cadrul INML Bucuresti in perioada 1999-2006 In cadrul laboratoarelor INML se desfasoara in mod curent peste 80% din activitatea expertala din domeniul stabilirii filiatiei, si aceasta datorita faptului ca in institut functioneaza laboratoare performante de serologie si genetica. Statistica la nivel national reprezinta o reflectare destul de exacta a tipurilor de testari efectuate in cadrul INML.

Studiul statistic al cazurilor de paternitate investigate prin tehnici genetice in INML Bucuresti intre anii 2004-2006 Studiul nostru statistic s-a bazat pe cazuistica Laboratorului de Genetica al INML din intervalul 2004-2006.

2004

Teste de paternitate	Total	Confirmari	Excluderi
„La cerere”	29	25 (86,21%)	4 (13,79%)
„Oficiale”	32	22 (68,75%)	10 (31,25%)

2005

Teste de paternitate	Total	Confirmari	Excluderi
„La cerere”	56	44 (78,57%)	12 (21,43%)
„Oficiale”	58	50 (86,20%)	8 (13,80%)

2006

Teste de paternitate	Total	Confirmari	Excluderi
„La cerere”	75	58 (77,33%)	17 (22,67%)
„Oficiale”	109	84 (77,07%)	25 (22,93%)

Tabel A5-1. Tipuri de solicitari pentru investigarea filiatiei in anii 2004-2006 corelate cu rezultatele.

Teste ADN de paternitate „oficiale”	2004	2005	2006	Total
Test ADN precedat de serotipari si/sau HLA	21	27	16	64
Test ADN direct	11	31	93	135
Total	32	58	109	199

Tabel A5-2. Solicitari oficiale (de la instante, directii de protectia copilului, etc.) pentru investigarea filiatiei investigate prin tehnici genetice, precedate sau nu de testarile serologice, intre 2004-2006

Testari filiatie	2004	2005	2006
Nr.cazuri expertize serologice	188	178	183
Excluderi serologie	38 (20,21%)	31 (17,41%)	25 (13,66%)
Nr cazuri expertize HLA	74	85	71
Excluderi HLA	18 (24,32%)	18 (21,17%)	14 (19,71%)
Nr cazuri expertize ADN	61	114	184
Excluderi ADN	14 (22,95%)	20 (17,54%)	42 (22,82%)

Tabel A5-3. Excluderi de la filiatie in intervalul 2004-2006 raportate la totalul investigatiilor si la metodele de laborator utilizate

Test ADN trio M-C-P	Total	Confirmari	Excluderi
2004	42	33	9
2005	100	83	17
2006	166	127	39
Total	308	243	65

Test ADN Duo C-P	Total	Confirmari	Excluderi
2004	7	5	2
2005	15	11	4
2006	19	15	4
Total	41	31	10

Tabel A5-4 si A5-5. Rezultatele testelor de filiatie din categoria trio M-C-P si duo C-P investigate intre 2004-2006

CONCLUZII: Studiul statistic al investigatiilor de filiatie in corelatie directa cu tehnicile de analiza de laborator evidentiaza cu claritate trendul schimbarilor operate la noi in tara, in sensul utilizarii pe scara tot mai larga a testarilor ADN fata de testele serologice clasice si HLA. Aceste schimbari s-au facut remarcate cu precadere in intervalul 2004-2006, respectiv cu o intarziere de aproximativ 10 ani fata de schimbarile raportate in spatiul american si cu un decalaj ceva mai mic fata de spatiul vest-european. Se poate prognoza insa urmarind dinamica testarilor ultimilor trei ani din cadrul INML, ca volumul investigatiilor ADN se va dubla la fiecare cel putin doi ani. Sunt remarcabile insa modificarile care au aparut in ce priveste strategia de investigare in filiatie: astfel, daca solicitarile „oficiale” pentru testari ADN erau precedate de regula de una sau doua tipuri de serotipari, la nivelul anului 2006, nivelul de adresabilitate directa pentru expertize genetice a crescut notabil. In momentul de fata testarile ADN precedate de alte tipuri de examinari de laborator reprezinta o exceptie, regula fiind testarea ADN directa. Tot pentru statistica studiata s-a putut remarca faptul ca toate investigatiile ADN de filiatie din intervalul 2004-2006 au fost finalizate, in sensul ca au condus la rezultate concludente. Acest lucru este remarcabil in conditiile in care cazuistica a cuprins si investigatii din categoria celor speciale: cazuri deficitare si relatii de inrudire complexe.

Concluzia finala a acestui studiu statistic este in urmatorul interval de timp de numai cativa ani, testarile ADN se pot impune ca metoda de electie in investigarea paternitatii la noi din tara. Conditia va fi desigur aceea a respectarii cu strictete a standardelor recomandate de forurile stiintifice.

B. STUDIUL COMPARATIV AL TEHNICILOR DE GENOTIPARE UTILIZATE IN INVESTIGAREA FILIATIEI IN LABORATORUL DE GENETICA AL INML INTRE 1999-2006

B.1 Baza teoretica cunoscuta si acceptata

a) microsateliteli STR autozomali si gonozomali

Criteriile ce trebuiesc indeplinite de markerii genetici ADN utilizati în cercetarea filiatiei si investigatiile judiciare (dupa recomandările AABB, ISFG si EDNAP)	
grad înalt de polimorfism	variante structurale multiple ale unei structuri de bază; (tipuri de polimorfisme: unilocus, multilocus, dialelic, hipervariabil)
grad înalt de heterozigotitate	indicator fidel al populatiilor aflate în echilibru Hardy-Weinberger
independentă	localizarea pe cromozomi distincti a markerilor ADN din setul de analizat
mod de transmitere ereditară cu respectarea obligatorie a legilor clasice mendeliene	validat prin studii familiale
randament bun al genotiparii	în sensul detectării cu usurinta prin tehnicile uzuale a tuturor alelelor unui marker
distributie cunoscută a alelelor în populatie	validată prin studii de genetică populationala
rata mutatiilor scăzută	de regulă în jurul valorii de 10^{-3} .

b. Metode de izolare a ADN din probele biologice. Prima etapa din cadrul unei analize genetice moleculare pornind de la probe biologice de origine umana presupune izolarea de material genetic. Succesul unei genotipari ADN fie ea în scop de diagnostic medical, fie în scop de stabilire a paternitatii este intim legat de modul în care este realizata izolarea de ADN, fie el nuclear.

Izolarea ADN uman cuprinde în principiu **3 etape principale**: **1) Liza celulara** - etapa prin care se distrug membranele celulare si este eliberat materialul genetic într-un omogenat ce contine toti constituintii celulari, denumit lizat celular; **2) Purificarea ADN** - etapa de îndepartare a resturilor proteice, glucidice, de ARN, etc. (ADN prin centrifugare pe membrane sau coloane filtrante, procedee de izolare cu ajutorul rasinilor magnetice); **3) Verificarea extractiei ADN – estimarea cantitatii si puritatii**. Etapa de verificare se realizeaza de rutina spectrofotometric sau prin metoda minigel

c. metode PCR: am utilizat în studiul meu kit-lui multiplex Identifier® (Applied Biosystems)

d. metode de identificare a produsilor PCR prin electroforeza manuala si automata (capilara):

În mod curent în Laboratorul de Genetica al INML Bucuresti este utilizat un echipament de analiza genetica automatizat ABI Prism 3100- Avant Genetic Analyser având încorporat un soft de analiza specific tip GeneMapper ID v. 3.2 (Applied Biosystems).

e. achizitia si interpretarea datelor. Pe electroforegramele obtinute la analizorul genetic automat analistul poate consulta rezultatele concomitent în format grafic si alfanumeric. Se urmareste pentru fiecare proba analizata detectarea eventualelor: • artefacte de amplificare – iau forma unor potentiale neclare, nedefinite, de intensitate scazuta, situate în imediata vecinatate a potentialului de baza (*stutter peaks*) Semnalele de tip artefact sunt de dimensiunii mici decat alele de baza, cu 1-4 nucleotide; • fenomene de amplificare preferentiala - se evidentiaza prin prezenta unor benzi mai puternice pentru alelele de dimensiuni mai mici, care sunt amplificate cu un randament mai bun prin PCR

f. Formularea concluziilor În materie de analiza a probelor biologice în cazurile de paternitate, legatura dintre un copil si presupusul tata, nu poate fi facuta fara a se recurge la **date si calcule biostatistice** [95]. Trei tipuri de concluzii posibile pot fi formulate în urma efectuării unei investigatii ADN de cercetare a filiatiei biologice [39]: 1) **concluzie de probabilitate sau de confirmare a paternitatii**. Concluzia de probabilitate nu are un caracter absolut si de aceea pentru formularea ei este necesara prelucrarea biostatistica a rezultatelor analizelor ADN; 2) **concluzie de excludere sau de non-paternitate**. Acest tip de concluzie are un caracter absolut, prin urmare nu necesita evaluare statistica; 3) **analiza neconcludenta** - testarea nu poate servi la formularea unor concluzii. Rezultatele neconcludente nu au un caracter absolut, irevocabil, ele necesitând repetarea investigatiei genetice pe aceleasi probe biologice ori pe alte probe, schimbând protocoalele de lucru, completând seturile de markeri, în încercarea de a obtine rezultate concludente.

Cazurile deficitare. În aceste cazuri analiza pornește tot de la premisa că un parinte biologic transmite obligatoriu copilului jumătate dintre caracterele sale genetice. Dacă se observa ca pentru unii markeri, niciuna dintre cele doua alele specifice evidentiate în profilul ADN al copilului nu se regăsește în

profilul prezumate a fi parinte biologic, atunci respectiva persoana se exclude de la parentitatea copilului. Pentru atingerea parametrelor statistici la calculul de probabilitate in cazul testarii unui cuplu copil-parinte prezumtiv este deseori necesara utilizarea unor baterii suplimentare de markeri ADN [39].

g. Redactarea Raportului de Expertiza Medico-Legala de Cercetare a Paternitatii – Examen ADN. Un raport de expertiza pentru cercetarea filiatiei biologice trebuie scris conform recomandarilor AABB si ISFG –Paternity Testing Commission in vigoare.

B.2. Obiectivul si strategia studiului Obiectivul studiului il reprezinta analiza comparativa a rezultatelor genotiparilor efectuate pentru cercetarea filiatiei in intervalul 2004-2006 in Laboratorul de Genetica al Institutului National de Medicina Legala Bucuresti. Cazuistica a fost studiata cu permisiunea si sub indrumarea directa a analistilor din acest laborator.

B.3. Cazuistica studiata Studiul a urmarit rezultatele investigatiilor de filiatie efectuate in cadrul INML Bucuresti, din perioada 2004-2006, corelate cu tehnicile de investigatie. Identitatea subiectilor investigati, precum si data la care s-au efectuat analizele au ramas strict confidentiale, scopul urmarit de acest studiu fiind cel al unei cercetari stiintifice. Cu permisiunea conducerii INML, a fost studiata integral cazuistica inregistrata in evidentele Laboratorului de Genetica al INML. Pentru o buna parte dintre cazurile luate in studiu, au fost efectuate in prealabil, in Laboratorul de Serologie al INML, testele serologice clasice si/sau serotiparea HLA.

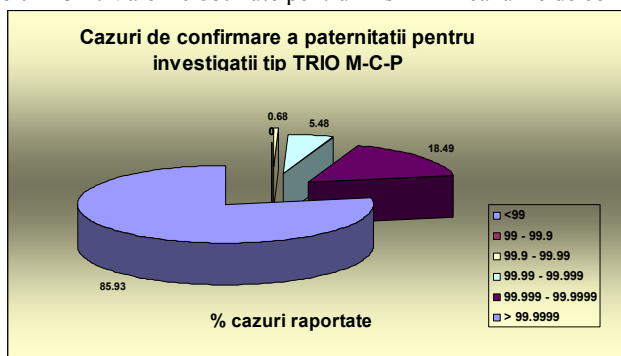
Teste de paternitate	Confirmari	Excluderi	Total
Trio complet(M/C/P)	256	79	335
Cazuri deficitare (C/P)	31	9	40
Total	287	88	375

Tabelul B3-1. Rezultatele testelor de filiatie investigate pe sisteme STR intre 2004-2006

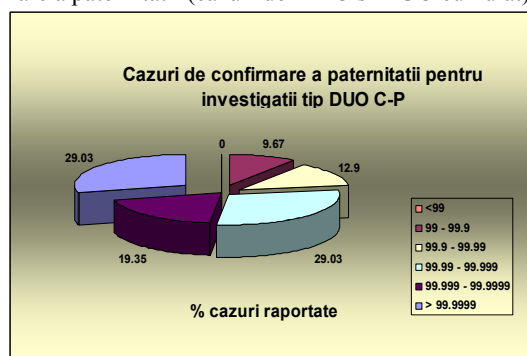
Pentru toate cazurile luate in studiu, la care s-au formulat concluzii de confirmare a paternitatii, cel mai important obiectiv urmarit a fost evaluarea statistica a rezultatelor prin calcularea *indexului de paternitate* (IP) si a *probabilitatii de paternitate* (PP).

IP	PP	Nr cazuri	%
>1000000	> 99.9999	229	79.79094
100000-1000000	99.999 - 99.9999	33	11.49826
10000-100000	99.99 - 99.999	17	5.923345
1000-10000	99.9 - 99.99	5	1.74216
1000-100	99 - 99.9	3	1.045296
<100	<99	0	0
		287	100

Tabelul B3-2. Valorile obtinute pentru IP si PP in cazurile de confirmare a paternitatii (cazuri de TRIO si DUO cumulat)



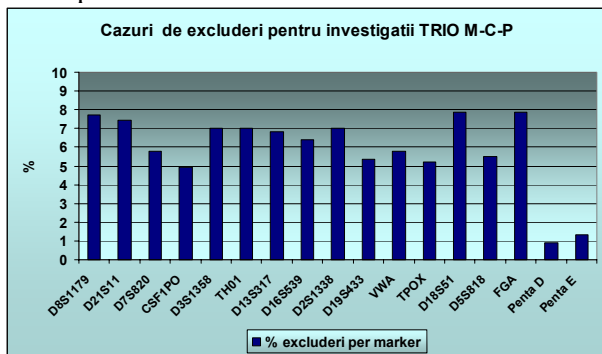
Cazuri tip TRIO – confirmari



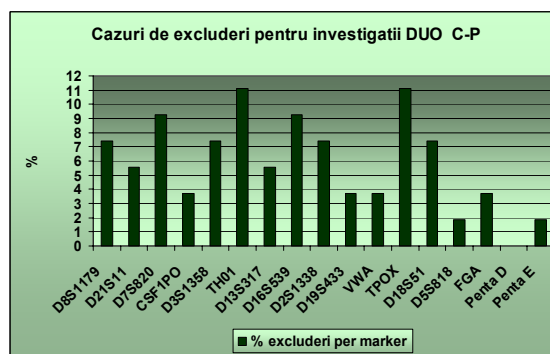
Cazuri tip DUO - confirmari

Concluziile de excludere au fost formulate numai in conditiile in care au fost detectate minimum 3 neconcordanțe pe 3 loci STR independenti, conform recomandarilor ISFG. Numarul mediu de loci cu necorcondante detectate per caz investigat a fost de 8.25, valoare calculata pentru cazurile tip TRIO si

DUO cumulat. Inainte de introducerea tehnicilor de detectie automata in Laboratorul de Gentica al INML, cand exista posibilitatea investigarii unor genotipuri de numai 6-12 markeri STR, concluziile de excludere erau formulate in baza “regulei de aur a celor 2 excluderi”: pentru 6 loci STR numarul de neconcordanțe detectate era de 2 - 3 loci, in timp ce pentru 9 -12 loci STR investigati numarul neconcordanțelor creștea la 3-6, mai rar 8 loci. Odata cu aplicarea tehnicilor moderne de detectie automata laser si cu investigarea de rutina a unui set de 15 markeri STR, numarul mediu de neconcordanțe pe caz a crescut la o medie de 8,506 loci pentru cazurile tip TRIO si respectiv la o medie de 6 loci pentru cazurile tip DUO.



Cazuri tip TRIO –excluderi



Cazuri tip DUO - excluderi

Pentru toate cazurile unde au fost detectate un numar mic de necorcondante, investigatiile au fost extinse pana la epuizarea intregii baterii de markeri disponibili in laborator. Astfel au existat in evidentele 2004-2006 doua cazuri pentru care s-a formulat concluzia de excludere de la paternitate in baza unui numar de 4 necorcondante, detectate prin investigarea unui set largit de 17 markeri STR. In ambele cazuri, testarea standard pe 15 loci STR a evidentiat doar 3 neconcordanțe, fapt ce a impus largirea investigatiilor. Explicatia observarii unui numar minim de neconcordanțe la aceste cazuri unde s-au analizat genotipuri largite de 17 markeri STR ar fi existenta unei relatii de inrudire intre persoana testata in calitate de prezumtiv tata si adevaratul tata biologic.

Unele ipoteze de genul celor mentionate mai sus pot fi verificate de catre genetician prin testarea de markeri aditionali de tip Y-STR sau X-STR, inasa rezultatele unor astfel de teste suplimentare nu sunt de regula comunicate partilor, ci servesc doar la aflarea adevarului stiintific. Astfel in doua cazuri, unul tip TRIO si un altul tip DUO, in care au fost detectate un numar minim de neconcordanțe, s-a suspiciat existenta unei inrudiri intre barbatul exclus de la paternitate si tatal biologic. Investigatiile a fost continuate in aceste doua cazuri cu markeri cromozomiali Y, care au relevat o concordanta perfecta intre haplotipul Y al copiilor si al barbatilor care s-au exclus de la filiatia biologica. Nu s-a mai considerat necesara largirea investigatiilor pe alti loci STR autozomiali.

Am prezentat si un caz unde concluzia de excludere s-a formulat cu dificultate desi numarul de neconcordanțe relevate dupa testarea unui prim set de 15 loci STR parea aparent suficient, relevandu-se un numar de 8 loci cu neconcordanțe. Din totalul celor 8 loci prezentand neconcordanțe intre copil si barbatul testat, 7 loci prezentau structuri de tip homozigot fie la copil, fie la barbat, fie la ambii, ingreunand decizia analistului, constient de pericolul fenomenelor mutationale, al alelelor silentioase sau alelelor nule. Cazul a necesitat continuarea investigatiei pe un set suplimentar de markeri, care a confirmat aspectul homozigot al celor 7 loci si in plus a mai evidentiat 2 loci cu neconcordanțe cu genotipuri heterozigote la copil si barbat.

Un alt tip de fenomen care poate sta la baza observarii unor cazuri de excludere de la filiatie cu numar mic de neconcordanțe il poate constitui inrudirea indirecta a personelor testate, care provin dintr-o serie de comunitati mici, inchise, cu grad inalt de cosangvinizare. Am observat fenomenul la un caz in care s-a solicitat cercetarea filiatiei unui copil deopotriva fata de mama si fata de tata. Ambii prezumtivi parinti au fost exclusi de la filiatia copilului, numarul de neconcordanțe observate fata de prezumtiva mama fiind de 4 loci, respectiv de 6 loci pentru prezumtivul tata.

Indiferent de tipul cazului investigat (TRIO sau DUO), numarul cel mai mare de neconcordanțe a fost raportat pentru markerii D18S51 (57) și FGA (55), unii dintre cei mai polimorfi loci STR. Cel mai mic număr de neconcordanțe a fost raportat pentru markerii CSF și TPOX, loci cu grad mai scăzut de polimorfism.

- Pentru cazuistica analizată au fost înregistrate și **fenomene mutaționale** aparente pentru locii STR la un număr de 6 cazuri (5 cazuri tip TRIO și un caz tip DUO). Locii pentru care s-au înregistrat mutații au fost următorii: CSF1PO, D13S317, D2S1338, VWA, D18S51, D5S818. Media mutațiilor per caz, raportată la întreaga cazuistică, a fost de 0.227%. Toate neconcordanțele etichetate mutații au fost observate între profilul copilului și cel al prezumtivului tată. Din totalul celor 6 mutații observate, 5 au fost de tip single step și una singură tip double step.

B4. CONCLUZII Genotiparea ADN în scop de cercetare a filiației biologice a condus la rezultate concludente pentru toate categoriile de markeri moleculari utilizați, permitând la final formularea unor concluzii certe de paternitate sau maternitate. Studiul a relevat avantajele și dezavantajele diferitelor seturi de loci STR și rolul etapei de formulare a concluziilor. Testele ADN reprezintă în prezent un mijloc extrem de eficient în procesul de cercetare a filiației biologice. Datorită numeroaselor avantaje pe care le oferă și a tehnicilor de laborator care se automatizează tot mai mult pe zi ce trece, testările ADN devin în România o investigație din ce în ce mai solicitată, nefiind în prezent rezervată numai cazurilor unde celelalte metode de laborator rămân inconcludente. Este de presupus că pe măsura creșterii performanțelor tehnicilor de analiză moleculară și a dotării laboratoarelor, testele ADN să devină tot mai populare la noi în țară în viitor.

Fără a avea pretenția că au fost epuizate toate aspectele genotipării ADN în scop de cercetare a filiației biologice pornind de la cazurile clasice reprezentate de trio-uri și cupluri copil-parinte, concluzionăm că prin acest studiu, efectuat la standarde de analiză înalte, am reușit să demonstrăm complexitatea pe care o implică procesul de analiză moleculară, din punct de vedere al tehnicilor moderne de analiză, cât și al interpretării riguroase a rezultatelor. Concluzia finală a acestui studiu este că genotiparea ADN se poate impune la noi în țară ca un mijloc performant de investigare în cercetarea paternității, dacă întregul protocol tehnic de laborator, de analiză și de interpretare a datelor se conformează standardelor recomandate de forurile științifice în domeniu.

C. STUDIUL COMPARATIV AL TEHNICILOR DE GENOTIPARE SI TIPURILOR DE MARKERI ADN UTILIZATI IN INVESTIGAREA UNOR RELATII DE INRUDIRE COMPLEXE

C.1. Baza teoretica cunoscuta si acceptata

- **Cercetarea filiatiei fata de buncii paterni.** Cea mai frecventa situatie intalnita este aceea cand parintele fata de care se cerceteaza filiatia, de regula tatal, nu este disponibil pentru testare (decedat, disparut, etc.). In cazurile in care prezumtivul tata este decedat, cea mai directa modalitate de testare cand o reprezinta testarea parintilor acestuia, in calitate de prezumtivi buncii paterni. Ipoteza de la care porneste testarea este aceea ca barbatul este fiul biologic al buncilor. Testarea ambilor buncii paterni este insa o situatie ideala, in majoritatea cazurilor fiind posibila doar testarea unui singur bunic paternal. Daca nici unul dintre parintii prezumtivului tata nu sunt disponibili pentru testare, atunci investigatia poate viza fratii paterni (frati sau surori), pornind bineinteles de la ipoteza conform careia acestia sunt frati buni cu prezumtivul tata si impart o multitudine de caractere genetice mostenite de la aceeasi parinti biologici. O serie de laboratoare solicita testarea a minimum doi frati buni paterni, sau a unui frate si unuia dintre buncii paterni.

- **Cercetarea relatiei de infratire.** Acest tip de investigatie urmareste sa determine daca anumite persoane sunt frati buni sau frati vitregi. Persoanele care solicita astfel de analize se pot imparti in doua categorii: 1) persoane care au un parinte comun (de regula mama) si doresc sa verifice daca au in comun si celalalt parinte (de regula tatal) - acest tip de testare poarta numele *test de infratire intre frati buni (full sibship testing)*. Participarea mamei la testare creste mult gradul de concludenta al investigatiei intrucat se pot identifica cu usurinta alelele de origine paterna; 2) persoane care au un parinte diferit (de exemplu: mame biologice diferite) dar doresc sa verifice daca celalalt parinte este comun (de exemplu: tatal) - acest tip de testare poarta numele de *test de infratire intre frati vitregi (half sibship testing)*. Pentru acest tip de testare este necesara participarea parintilor biologici diferiti (ex.: mamele biologice ale persoanelor investigate). Rezultatul unui test de infratire se exprima printr-un *indice de infratire*, care reprezinta sansa ca unul sau mai multe caractere genetice (alele) sa fie identificate la doua persoane in ipoteza ca sunt inrudite raportat la ipoteza ca persoanele sunt neinrudite.

Cercetarea relatiilor de inrudire complexe. Acest tip de investigatii sunt de regula solicitate atunci cand nu sunt disponibili pentru testare nici prezumtivul parinte biologic si nici parintii sau fratii biologici ai acestuia, presupunand testarea a unei variate categorii de prezumtive rude.

b. Cercetarea relatiilor de inrudire cu ajutorul markerilor gonozomali.

- **Cercetarea markerilor specifici cromozomului Y.** Potentialul polimorfismelor STR-Y pentru studiul relatiilor de descendenta biologica este deosebit de important datorita modului lor de transmitere exclusiv pe linie paternala. Aplicatiile majore ale analizei microsatelitelor STR-Y sunt descrise in capitolul G al lucrarii. Utilizarea markerilor STR-Y ramane limitata deoarece testarea este rezervata exclusiv cazurilor in care copilul este baiat. In plus, obtinerea unor rezultate corecte pentru cazurile deficitare este strans conditionata de utilizarea unui set larg de 9-16 markeri STR-Y. Profilele cromozomiale Y nu pot servi ca unic element de identificare genetica al unei persoane, intrucat, indivizi aparent neinruditi, pot avea acelasi profil ADN al cromozomului Y printr-o descendenta comuna pe linie paterna, necunoscuta situata undeva in trecut, uneori la distanta de cateva generatii. De aceea in cadrul genotiparilor in scop de identificare este obligatorie si evaluarea profilelor autozomale.

C.2. Obiectivele studiului. Obiectivul studiului nostru il reprezinta analiza comparativa a rezultatelor genotiparilor efectuate pentru cercetarea relatiilor de inrudire intervalul 2004-2006 in Laboratorul de Genetica al Institutului National de Medicina Legala Bucuresti. Cazuistica a fost studiata cu permisiunea si sub indrumarea directa a analistilor din acest laborator si a vizat evaluarea categoriilor de markeri ADN, autozomali si gonozomali X si Y utilizati pentru genotipare, precum si modul de interpretare si formulare al concluziilor medico-legale. Identitatea subiectilor investigati, precum si data

la care s-au efectuat analizele au ramas strict confidentiale, scopul urmarit de acest studiu fiind cel al unei cercetari stiintifice.

C.3. Studiu de caz. A fost studiata cazuistica inregistrata in evidentele Laboratorului de Genetica al INML intre 2004-2006. Trebuie precizat faptul ca pentru cazurilor luate in acest studiu, nu au fost efectuate in prealabil, testele serologice clasice si/sau HLA. Totodata, in perioada anterioara celei studiate de noi, nu au fost efectuate in laboratorul INML teste ADN de inrudire, intrucat nu au existat mijloacele necesare unor astfel de investigatii genetice complexe. Protocolul de analiza de laborator a fost cel prezentat in studiul B exceptand metodele de calcul de probabilitate care au fost realizate urmand recomandarile lui Evett si Weir [99]. Desi nu foarte numeroase, testarilor de inrudire au totalizat 11 cazuri intre 2004-2006, inasa au surprins o mare varietate de situatii • teste de infratire intre frati vitregi - 4 cazuri • teste de paternitate cu tatal decedat - 7 cazuri

Sunt prezentate in lucrare, in extenso, din aceasta categorie de testari, 8 cazuri ilustrative pentru formularea concluziilor medico-legale.

Cazul 1: in contextul in care prezumtivul tata era decedat, au participat la testare copilul, mama copilului si o fiica legitima, dintr-o alta casatorie a barbatului decedat. Testarea s-a efectuat pe 13 loci STR autozomali pentru urmatorul pedegree: mama M, copil C si fiica legitima a prezumtivului tata S, fara sa existe posibilitatea suplimentarii numarului de markeri autozomali care ar fi avut capacitatea cresterii indicelui de infratire. Concluzia formulata a fost in favoarea existentei unei relatii de infratire de tip surori vitrege, cu un indice de infratire supranumerar de 15.01819, calculat pentru un coeficient de inrudire de 1/4. Paternitatea persoanei decedate referitoare la copilul C a rezultat implicit prin formularea acestei concluzii.

Cazul 2: pentru un caz in care a fost testat urmatorul pedegree: mama M, copil C1 (legitim) si copil C2 (nascut dintr-o posibila relatie extraconjugala) pe 17 loci STR autozomali, concluzia formulata a fost in favoarea existentei unei relatii de infratire de tip frati vitregi (aceeasi mama, dar tati diferiti) cu un indice de infratire supraunitar de 15,797 (calculat pentru un indice de inrudire de 1/2 pentru frati buni si 1/4 pentru frati vitregi). Testarea ipotezei de infratire de tip frati buni intre cei doi copii a condus la un indice de infratire subunitar de 0,00695, lucru ce nu a permis sustinerea acestei ipoteze.

Cazul 3: in contextul in care prezumtivul tata era decedat, au participat la testare copilul, mama acestuia si un unchi patern, fratele babatului decedat. Testarea s-a efectuat pe 15 loci STR autozomali si 12 loci cromozomiali Y. Raportul de probabilitate al paternitatii (IP) conditionat de ipotezele testate si calculat pentru un coeficient de inrudire de 1/8 intre prezumtivul tata biologic decedat si persoana testata a condus la obtinerea unei valori >100 (1513.084). Aceasta valoare a IP, coroborata cu corespondenta perfecta a haplotipurilor cromozomiale Y a permis formularea unei concluzii in favoarea paternitatii.

Cazul 4: pentru un caz in care a fost testat urmatorul pedegree: mama M, copil C si bunicul patern (BP) – tata decedat pe 15 loci STR autozomali si 16 loci cromozomiali Y s-a obtinut un raport de probabilitate al paternitatii (IP) conditionat de ipotezele testate si calculat pentru un coeficient de inrudire de 1/4 intre prezumtivul tata biologic decedat si bunicul patern participant la testare a condus la o valoare <100 (39.2274). Valoarea IP, destul de modesta in acest caz, a fost coroborata cu corespondenta perfecta a haplotipurilor cromozomiale Y si a permis formularea unei concluzii in favoarea paternitatii. S-a putut remarca in acest caz importanta testarii markerilor specifici de sex. In conditiile in care nu ar fi fost posibila efectuarea testarilor pe markerii cromozomiali Y, investigatia genetica ar fi trebuit completata cu markeri aditionali autozomali.

Cazul 5: in contextul in care prezumtivul tata era decedat, au participat la testare copilul, mama acestuia si bunicii paterni, parintii babatului decedat. Testarea s-a efectuat pe 15 loci STR autozomali si 16 loci cromozomiali Y. Raportul de probabilitate al paternitatii (IP) conditionat de ipotezele testate si calculat pentru un coeficient de inrudire de 1/4 intre prezumtivul tata biologic decedat si bunicii paterni participanti la testare a condus la o valoare apreciabila, $IP > 10^5$. Obtinerea unei valori crescute a parametrilor statistici s-a datorat participarii ambilor buncici paterni la testare, situatie ideala, inasa mai rar intalnita in practica. Pentru acest caz, testarea markerilor gonozomali nu a reprezentat o necesitate

absoluta, insa a fost efectuata pentru ca minorul in cauza era baiat si din dorinta de a avea o confirmare in plus a relatiei de inrudire intre nepot si bunicii paterni.

Cazul 6: : in contextul in care prezumtivul tata era decedat, au participat la testare copilul, mama acestuia, bunicii paterni si o fiica legitima a decedatului, nascuta in cadrul casatoriei. Testarea s-a efectuat pe 15 loci STR autozomali si 16 loci cromozomiali Y. Raportul de probabilitate al paternitatii (IP) calculat pentru un coeficient de inrudire de $1/4$ intre prezumtivul tata biologic decedat si bunicii paterni participanti la testare a condus la o valoare considerabila a $IP > 1000$. Obtinerea unei valori crescute a parametrilor statistici s-a datorat participarii ambilor bunici paterni la testare. Nici pentru acest caz, testarea markerilor gonozomali nu a reprezentat o necesitate absoluta, insa a fost efectuata pentru ca minorul in cauza era baiat si din dorinta de a avea o confirmare in plus a relatiei de inrudire intre nepot si bunicii paterni. Se remarca la acest caz participarea la testare a unei fiice legitime a decedatului. Acest lucru a permis calcularea unei relatii de inrudire intre copil si prezumata sa sora vitrega. Valorile indicelui de inrudire pentru o relatie tip frati vitregi s-au situat intr-o zona confortabila pentru formularea unei concluzii pozitive de inrudire.

Cazul 7: pentru un caz in care a fost testat urmatorul pedegree: mama M, copil C, matusa paterna si unchi patern, testarea s-a efectuat pe 18 loci STR autozomali si 8 loci cromozomiali X. Raportul de probabilitate al paternitatii (IP) calculat pentru un coeficient de inrudire de $1/4$ intre prezumtivul tata biologic decedat si unchi paterni participanti la testare a condus la o valoare neconcludente ale IP dupa testarea a 15 loci autozomali. Investigatia a fost extinsa intr-o prima etapa pe markeri autozomali (in total 18 loci STR) si ulterior pe 8 markeri specifici cromozomului X. Numai in aceste conditii valorile obtinute pentru IP au putut permite formularea unei concluzii pozitive de inrudire fata de unchiul si matusa paterna.

Cazul 8: in contextul in care prezumtivul tata era decedat si mama copilului a refuzat sa participe la testare, testarea s-a efectuat pentru urmatorul pedegree: copil S2, fiu legitim S1, fiice legitime D1, D2 si D3. Pedegree-ul complet al acestei investigatii s-a realizat in mai multe etape, in prima etapa participarea la testare fiind posibila numai pentru S2, D1 si D3. Pe masura completarii pedegree-ului cazului, testarea a fost largita de la 14 la 18 loci STR autozomali, apoi completata cu loci Y-STR si X-STR. Testarea ipotezei de inrudire de tip frati vitregi intre S2 si fiecare dintre prezumtivele surori vitrege D1 si D3 a condus la rezultate contradictorii. Astfel, pentru S2-D1 s-a calculat un indice de inrudire subunitar, de 0.2355, rezultat ce sugera improbabila relatia de inrudire dintre S2-D1, in timp ce pentru S2-D3 a rezultat un indice de inrudire cu o valoare apreciabila, de 253.644, rezultat ce pleda in favoarea unei relatii de inrudire sustinerea unei ipoteze de inrudire. Prin urmare, s-a concluzionat ca rezultatele acestei primei runde de teste genetice este neconcludent, in sensul imposibilitatii formularii unei concluzii de inrudire sau neinrudire intre cei trei indivizi testati. Intr-o etapa ulterioara au participat la testare si S1 si D2, iar investigatia a fost completata cu inca 3 markeri autozomali, si apoi cu markeri cromozomiali Y. La finalizarea genotiparilor efectuate pentru toti subiectii, s-au putut observa o serie de neconcordanțe între genotipurile lui S2, fata de genotipurile fiului si fiicelor legitime ai defunctului, atat la nivelul locilor autozomali suplimentari, cat si la nivelul locilor Y-STR. In acest stadiu al investigatiei genetice s-a concluzionat ca subiectul S2 se exclude de la filiatia fata de barbatul defunct, tatal fratilor S1, D1, D2 si D3, intre subiectii testati neexistand nici o relatie de inrudire. Referitor la aceasta etapa, s-au mai observat ca in constelatia alelelor parentale ale fratilor S1, D1, D2 si D3, copiii legitimi ai defunctului, exista un set de 5 alele din maximum 4 posibile pe locusul vWA. Aceasta constelatie multialelica nu a fost observata si pentru alti loci autozomali, motiv pentru care s-a suspionat existenta unei mutatii fie la nivelul genotipului S1, fie la nivelul genotipului lui D3. Pentru a se lamuri totusi si acest aspect, investigatiile au fost continuate cu prin testarea unui set de 8 markeri cromozomiali X, grupati in patru haplotipuri distincte. Neconcordanțele observate pe markerii cromozomiali X au condus la investigatia catre o concluzie neasteptata, aceea de posibila excludere de la filiatia biologica a unuia dintre copiii legitimi ai defunctului, fie a fiului S1, fie a fiicei D3. Dupa reorganizarea grupurilor de haplotipuri X, astfel incat constelatia de alele cromozomiale X de origine materna sa nu fie mai mare de 2 per grup

haplotipal, s-a putut observa ca neconcordanțele persistau la nivelul haplotipului lui D3. S-a formulat o concluzie de excludere a fiicei D3 de la paternitate, lucru care ar putea explica rezultatul obținut în prima parte a investigației genetice, acela de posibilă înruderire între S2 și D3.

C.4. CONCLUZII Cele opt cazuri prezentate în acest studiu, din totalul celor 11 investigate în laborator în intervalul 2004-2006, evidențiază rolul pe care îl joacă dotarea tehnică și experiența expertală în abordarea acestui capitol spinos al relațiilor de înruderire complexe. Cazurile selectate sunt reprezentative pentru o multitudine de probleme care pot apărea în practica curentă, în condițiile în care finalizarea acestora s-a realizat de o manieră care respectă recomandările și standardele din domeniu. Interpretarea rezultatelor testelor de înruderire trebuie făcută cu multă precauție și numai după testarea tuturor ipotezelor care au corespundent un posibil pedigree. Limitarea testărilor numai la pedigree-ul declarat de subiecții participanți la testare trebuie evitată, exemplificator fiind cazul 8 care a relevat o excludere de la paternitate pentru o relație de înruderire prezumată corectă. De asemenea, interpretarea haplotipurilor gonozomiale Y și mai ales a celor X, mai nou intrate în practică, trebuie făcută însă cu multă atenție și ținând cont de modul de transmitere și particularitățile structurale și mutaționale ale cromozomului Y și X. Expertul trebuie permanent să fie conștient de limitările investigațiilor pe cromozomul Y sau X ce țin în special de proprietățile acestor cromozomi. În afara de testarea relațiilor de paternitate și înruderire, investigarea microsateliților de pe gonozomi are o semnificație clinică deosebită pentru analiza de linakge, cum ar fi identificarea unor maladii genetice cu transmitere X-linkată.

În concluzie, reiterăm opinia specialiștilor din domeniu care sunt de părere că investigația genetică a relațiilor de înruderire trebuie să intre numai în repertoriul de analize al marilor laboratoare de genetică medico-legală, care au posibilități de ordin tehnic și calificarea expertală necesară întreprinderii unei investigații largite pe multiple categorii de markeri ADN, până la epuizarea și rezolvarea tuturor problemelor unei spete civile sau penale.

III. CONSIDERATII GENERALE

Astazi, in mileniul al treilea, cand explozia informationala a descoperirilor stiintifice si uriasa dezvoltare tehnologica din toate domeniile si in special din cel biomedical, au depasit orice limita a imaginabilului, devenind realitate, medicina legala – specialitate care interpreteaza datele medico-biologice in folosul justitiei - trebuie sa ofere justitiei probe cu caracter stiintific, indubitabile, care sa serveasca la stabilirea adevarului in justitie. Expertiza medico-legala a filiatiei, pana nu demult doar expertiza cu valoare eminamente de excludere, este capabila in acest moment sa confere certitudini, confirmand o relatie de paternitate cu o probabilitate de peste 99,9999%. Testarea ADN a relatiilor de descendenta biologica castiga pe zi ce trece in complexitate si precizie.

Testele de paternitate reprezinta un punct in care se intersecteaza si interrelacioneaza trei discipline diferite: medicina legala, genetica moleculara si domeniul juridic. In cadrul tezei mele de doctorat am abordat cercetarea filiatiei intre anii 2004-2006, la nivel national si la nivelul INML Bucuresti, institutie in care m-am format ca specialist si unde mi-am desfasurat studiul doctoral. Am avut in vedere in alcatuirea lucrarii doua obiective de baza: sa structurez intr-o sinteza informatii de genetica moleculara, genetica judiciara, metodologie expertala medico-legala si bioetica cu aplicabilitate in campul medicinei legale, si sa studiez teoretic si practic principalele tehnici de analiza genetica si categorii de markeri ADN utilizati in rezolvarea cazuisticii curente.

Studiul meu asupra investigatiilor de filiatie a inceput intr-un moment in care testele serologice clasice si HLA au pierdut din popularitate in favoarea testelor ADN. Aceasta problema a introducerii testelor genetice moderne in laboratoarele din intreaga lume a fost intens dezbatuta pe plan mondial inca de la inceputul anilor '90, atat in mediile stiintifice medicale, cat si in cele juridice, confruntate cu necesitatea de a schimba o serie de teorii considerate "clasice". Intre anii 1990-1995, chiar specialistii din tarile avansate tehnologic au fost neincredatori in valoarea investigatiilor ADN, inclinand sa utilizeze in continuare metodele traditionale de investigare a paternitatii. Astfel, la inceputurile sale, testarea ADN a relatiilor de descendenta biologica a fost rezervata unor situatii speciale in care metodele conventionale nu ofereau rezultate concludente. Pe masura trecerii timpului insa, odata cu generalizarea tehnicilor PCR si a celor de detectie automata, cercetarea sistemelor de markeri ADN a fost larg imbratisata de comunitatea stiintifica medico-legala din intreaga lume. Scopul lucrarii mele a fost acela de a dovedi avantajele utilizarii testelor ADN in cercetarea filiatiei prin raportare la cele serologice considerate "clasice". Lucrarea se doreste sa ofere o trecere in revista a celor mai uzuale protocoale de genotiparea in scop de testare a paternitatii, cu accent pe partea de interpretare a rezultatelor si formulare a concluziilor medico-legale.

Urmarind dinamica investigatiilor de filiatie pe plan international, am evidentiat faptul ca la inceputul anilor '90, numarul total de cazuri investigate practic a explodat datorita comutarii investigatiilor de la markerii traditionali, la sistemele de markeri ADN. Dupa anul 2000 volumul de testari s-a triplat pe plan mondial, pentru a se mentine la un volum qvasiconstant la peste 300.000 pe an. Cele mai insemnate cresteri ale volumului testarilor ADN de paternitate s-a inregistrat cum era de asteptat pe teritoriul SUA, care a raportat in anul 2003 un numar de circa 1 milion de persoane implicate in testele de paternitate. In acelasi timp, in acest interval de timp, in Europa de vest, atitudinea fata de inlocuirea tehnicilor clasice de testare a paternitatii cu teste ADN a fost mai conservatoare: sistemele si tehnicile serologice s-au utilizat de rutina pana la nivelul anilor 2000-2001, dupa care au inceput sa cunoasca acelasi declin vertiginos ca pe teritoriul american. Volumul mare al investigatiilor medico-legale pentru stabilirea paternitatii inregistrat in Europa de vest si SUA s-a datorat si se datoreaza in continuare unor ratiuni sau legi care tin de politica de protectie sociala a statelor respective, care nu admit sa preia cheltuielile de intretinere a unor copii, atunci cand sarcina trebuie sa revina parintelui biologic. Un factor demografic corelat statistic cu volumul testelor de paternitate este reprezentat de numarul nasterilor inregistrate in afara casatoriei, considerate si ele o importanta problema sociala cand depasesc 25-30% din totalul nasterilor.

Contrar tendintelor din tarile vest-europene, in Romania in perioada 1999-2005 s-a inregistrat un declin constant al numarului total de teste de paternitate, fenomen explicabil de scaderea importanta a ratei natalitatii, dar si unei politici de protectie sociala deficitar reglementata la noi in tara, precum si unor factori de ordin economic. Dinamica crescatoare a investigatiilor de filiatie inregistrate in 2006 poate fi corelata cu recentul trend crescator al natalitatii raportat in Romania si cu aparitia incepand cu anul 2005 de instante specializate pentru minori si familie, care solicita expertize medico-legale de filiatie care sa respecte reglementari europene de ordin social si administrativ. Studiul meu a incercat sa surprinda atat tendintele, cat si schimbarile operate in ultimii ani in tehnicile de testare a paternitatii la nivel national, lucruri care se regasesc reflectate cu maxima fidelitate in cazuistica de paternitate a INML. Pentru perioada 1999-2003 am avut la dispozitie datele statistice prezentate in Rapoartele Anuale Nationale ale activitatii de medicina legala din Romania, iar pentru perioada 2004-2006 am realizat, pe baza documentelor existente in arhiva Laboratoarelor de Serologie si Genetica ale INML Bucuresti, o cercetare amanuntita privind volumul si dinamica testelor de paternitate, metodologia tehnicilor de laborator si rezultatele investigatiilor de filiatie.

IV. CONCLUZII

Lucrarea doctorala intitulata *„Studiul comparativ privind aportul introducerii cercetarii ADN in expertiza filiatiei fata de metodele utilizate pana in prezent in tara noastra”* se doreste un studiu complex menit sa evidentieze importanta testelor ADN in cercetarea filiatiei biologice, in contextul in care aceste investigatii medico-legale au devenit si la noi in tara tot mai frecvent solicitate, nemaifiind rezervate cazurilor in care testarile “traditionale” esueaza sau conduc la rezultate neconcludente. De o maniera mai lenta fata de tarile Vest-Europene, si in Romania ultimilor ani s-a declansat un proces de dotare moderna a laboratoarelor medico-legale cu echipamente de analiza genetica de inalta performanta in scopul identificarii de persoane si stabilirii relatiilor de inrudire biologica intre indivizii umani. Pe parcursul studiilor efectuate am dorit sa evidentiez faptul ca testele ADN au un potential informativ net superior fata de metodele de investigare a filiatiei serologice “clasice”, numai daca testarea ADN este efectuata de personal inalt calificat si intr-un laborator care respecta standardele recomandate de forurile stiintifice de specialitate. Laboratorul de Genetica al Institutului National de Medicina Legala Bucuresti, care s-a dezvoltat in anii 1999-2000 si modernizat dupa 2004, si in cadrul caruia am realizat cercetarea personala a Lucrarii de Doctorat, participa anual la o serie de teste de verificare a performantelor de lucru organizate la nivel national si international, Certificatele de excelenta obtinute an de an de echipa Laboratorului de Genetica demonstreaza respectarea riguroasa a unor standarde de calitate in testarile de paternitate.

Testele ADN de paternitate au ca prim obiectiv respectarea unui drept fundamental al copilului, acela de a-si cunoaste tatal biologic, cu toate consecintele de ordin legal si social care decurg din aceasta. Dat fiind complexitatea si importanta testarilor genetice in planul vietii unui individ, opiniam ca in tara noastra testarea ADN pentru stabilirea paternitatii este recomandata a se realiza in laboratoarele oficiale, acreditate, apte sa certifice asupra rezultatelor obtinute. Numai in acest fel, testarile ADN de filiatie pot fi acceptate fara ezitare in instantele de judecata. In acelasi timp, un laborator trebuie sa ofere confidentialitate absoluta, astfel incat informatiile obtinute sa nu poata fi speculate de rude sau de anturaj, in scopul revendicarii unor drepturi materiale. Consimtamantul scris al fiecarei persoane participante la testarea genetica medico-legala reprezinta de asemenea un aspect foarte important, testarile putand fi altfel lovite de nulitate si calificate drept un abuz si o interventie grava in viata privata a oricarui individ uman.

Datorita costurilor relativ ridicate ale testarilor ADN de paternitate, au aparut diverse practici controversate, cum ar fi testarea realizata pe tampoane bucale vandute pe internet, mostre livrate direct la domiciliu, sau testarea unui subiect fara acordul acestuia, pe baza unor obiecte personale care contin material biologic (periute de dinti, fire de par, manusi, etc). Deasemenea, s-au dezvoltat laboratoare

private care nu se conduc dupa norme stricte in ce priveste aspectele tehnice ale testarii genetice sau cele care vizeaza acordarea consimtamantului. In astfel de laboratoare, care definesc asa numita „zona gri a testelor ADN de paternitate”, erorile de ordin tehnic sau rezultatele neconcludente nu sunt o raritate, producand astfel prejudicii grave persoanelor implicate intr-o speta civila de filiatie. Tehnologiile moleculare moderne cresc dramatic preocuparile in domeniul eticii, informatia genetica putand induce prejudicii in zona vietii familiale, sociale, profesionale a unei persoane. Consecintele de ordin social, moral, economic si de sanatate publica ale fenomenului de discrepanta parentala sunt de o gravitate majora: cresterea ratei divorturilor, cresterea comportamentelor antisociale, a violentei si agresiunii, cresterea problemelor de sanatate mentala. Se impune adoptarea in Romania a unei legislatii referitoare la testarile genetice de orice natura, fie medicale, fie medico-legale, in concordanta cu legislatia deja existenta in Uniunea Europeana, apte sa previna abuzul utilizarii informatiei genetice.

Partea personala a lucrarii surprinde trendul schimbarilor operate in Romania incepand cu anul 1999, insistand cu precadere asupra intervalului 2004-2006. Pe baza cazurilor analizate, se poate prognoza ca volumul investigatiilor ADN se va dubla la fiecare doi ani, in paralel cu renuntarea progresiva la metodele serologice “clasice”. Testele ADN au devenit instrumentul fara rival al investigatiilor medico-legale, prin performantele de neegalat ale sistemelor de markeri ADN si imbunatatirea tehnologiilor de analiza genetica, generalizarea metodologiilor PCR si a celor de detectie si secventiere automata. Studiile realizate in cadrul lucrarii indica faptul ca strategia de analiza ADN trebuie adaptata in functie de complexitatea cazului de investigat. Evaluarea parametrilor statistici IP si PP, cat si raportarea rezultatelor in conformitate cu standardele legislative si cu recomandarile forurilor stiintifice reprezinta o garantie a unei investigatii genetice, de buna calitate. Efectuarea analizelor pe kituri de markeri STR cu cel putin 15 loci conduce la obtinerea unor valori ale parametrilor statistici ($IP > 1.000.000$ si $PP > 99,9999\%$) care permit formularea unor concluzii de confirmare a paternitatii, anuland riscul de raportare de rezultate fals pozitive.

Lucrarea in ansamblu doreste sa puna in lumina rezonanta pe care testele genetice de paternitate o au in diverse planuri ale vietii sociale. Concluzia acestui studiu este ca genotiparea ADN se impune in Romania ca un mijloc performant de investigare a paternitatii sau a altor tipuri de relatii de inrudire biologica. In contextul schimbarilor operate in sistemul legislativ civil si penal romanesc, apare ca evidenta redefinirea rolului expertului stiintific in actul de justitie.

BIBLIOGRAFIE

1. Ayala F.J., Black B., "Science and the courts", American Scientists 1993: 81, 203-209
2. Albu I. "Dreptul familiei", Ed. Didactica Pedagogica Bucuresti 2000
3. Belis VI. "Tratat de medicina legala", Ed. Medicala, Bucuresti, 1995
4. Belis Vladimir, Dragomirescu V. "Medicina legala", Ed. Teora, Bucuresti, 1992
5. *** Codul Familiei
6. *** Constitutia Romaniei
7. Filipescu I.P. "Tratat de Dreptul Familiei", Ed. All Beck, 2000
8. Belis VI. "Medicina legala. Curs pentru facultatile de stiinte juridice", Societatea Romana de Medicina Legala, Bucuresti, 1995
9. Lupsan G. "Dreptul familiei", Ed. Chemarea, Iasi, 1999, pag. 53
10. ***Codul de Procedura Civila
11. ***Decizia Curtii Constitutionale 349/2001
12. Anca P. "Incheierea casatoriei si efectele sale", Ed. Academiei, Bucuresti, 1989
13. Culea I. "Cercetarea datei concepiei in expertiza medico-legala, Scrisoare metodologica - I.M.L. Bucuresti in anul 1979
14. ***O.U.G. 25/97 privind adoptiile
15. ***HG 119/97 privind alocatia de stat pentru copii
16. ***Legea 102/1997 privind concediul pentru ingrijirea copilului
17. ***Legea 19/2000 privind pensia de urmas
18. ***Codul Penal al Romaniei cu modificarile si completarile aduse prin Legea nr. 278/2006 si O.U.G. nr. 60/2006 din 6 septembrie 2006
19. Hammond H. & colab. - "In utero paternity testing following alleged sexual assault" (1995) JAMA 273(22):1774-1777
20. Jeffrey A.J. "Positive identification of an immigrant test case using Human DNA fingerprints", Nature 1985, 317: 818-819
21. Fabricius F.A. "New German Guidelines for Paternity testing 2002", communicated paper ISFG
22. Labrusse C., Cornu G. "Droit du la filiation et progres scientifique - perspectives economiques et juridiques", Ed Economica, Paris, 1982
23. Neagu I., "Drept procesual penal", vol. I si II, Ed. Sansa S.R.L., Bucuresti, 1988
24. ***ONU „Human Rights” dupa www.onu.org
25. ***Codul de Procedura Penala al Romaniei cu modif. si compl. aduse prin Legea nr. 356/2006 si O.U.G. 60/2006 din 6 septembrie 2006
26. ***Decretul 446/1966 privind organizarea institutiilor si serviciilor medico-legale
27. ***O.U.G. 1/2000 privind desfasurarea activitatii medico-legale
28. ***Legea 459/2001 privind Organizarea activitatii de medicina legala (MOR 41/2001) modificata prin legea 271/2004, HG 1204/2002
29. Dermengiu D. „Curs de medicina legala”, Bucuresti 2005, pg. 10-13; 209-226
30. ***Preluat dupa www.legmed.ro (referinta electronica)
31. Sullivan J. „The medical expertise: solid medicine sufficient legal and a measure of common sense, MJM, 9(2), 147-151
32. Ștefănescu D.T., Călin G., Ștefănescu F. "Genetica medicală - Progrese recente" (1998), Editura Tehnică, București, 13-80
33. Brown T.A., "Genetics – A Molecular Approach" (1992) Chapman & Hall, London, 280-310
34. Maximilian C., Ioan D.M. "Genetica medicala" (1986) Editura Medicala, Bucuresti, 49-76
35. Friedman J.M., Dill J.F., Hayden M.R., Mc Givray B.C.: „N.M.S. Genetics", 1996
36. Trent R.J.- "Forensic Medicine" (1993) Molecular Medicine – An Introductory Text for Students, Churchill Livingstone, Logman Group, Edinburgh, 179-192
37. Dermengiu D. "Medicina Legală – Note de curs", Bucuresti 1999
38. Cristea-Popa E., Popescu A., Trutia E., Dinu V. "Tratat de Biochimie Medicala", Ed. Medicala, 1991
39. Belis VI., Barbarii L. "Genetica judiciara – de la teorie la practica", Ed. Medicala, Bucuresti, 2007
40. Emery A.E.H., Mueller R.F. "Elements of Medical Genetics" (1992) Churchill Livingstone, Logman Group, Edinburgh, 14
41. Kirby L.T. "DNA findexprinting" (1990) Stockton Press
42. ***www.biology.washington.edu/fingerprint – "DNA 101- What is it?" (1998)
43. Kendrew J. "DNA typing" (1995) The encyclopedia of Molecular Biology, Blackwll Science Ltd., Oxford, 286-294
44. Jeffeys A.J., Wilson V., Thein S.L. "Hypervariable 'minisatelite' regions in human DNA" (1985) Nature 317: 67-73
45. Krawczak M., Schmidtke J. "DNA Fingerprinting" (1994), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, 61-75
46. Krawczak M., Schmidtke J. - "Origin and maintenance of DNA polymorphism" (1994) DNA Fingerprinting, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 17– 60
47. Schlotter C., Zangerl B. - The Use of Imperfect Microsatellites for DNA Fingerprinting and Population Genetics" (1999) DNA Profiling and DNA Fingerprinting, Birkhauser Verlag, Basel
48. Solomon E., Berg L. "Biology", Thompson Pub House 2005
49. Bergeron J., Herve J.C. "Biologie cellulaire et moleculaire; Heredite et genetique humaine", 1990, Science naturelles, Hatier Paris
50. Hartl E., Jones D. "Essential genetics", Jones and Bartlett, 2004
51. Gill P.D., Evett I.W. "Population Genetics of short tandem repeats (STR) loci" (1995) Genetica 96(1-2):69-87
52. Primorac D. et al, "Application of Forensic DNA testing in the Legal System", Croatian Medical Journal, 2000 41(1), 32-46
53. Apateanu V., Danelescu M. "Grupele sangvine eritrocitare" in St. Berceanu, "Hematologie clinica", Ed. Medicala, Bucuresti, 1987
54. ***http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_type
55. Groza P. "Fiziologie", Ed. Medicala, Bucuresti, 97-104
56. Teige B., Olaisen B., Pederseal L."Subtyping of haptoglobin – Advances in forensic haemogenetic", Berlin, 1985, 136-140
57. Dahr W. "Alloantigens of proteins and glicoproteins in membranes of human red blood cells - Advances in forensic haemogenetic", vol.II, 1987, 8-15
58. Hopkinson D.A. "Current research on enzyme polymorphism", Berlin, 1985, 145-153
59. Bodmer W.F. "The HLA system", Brit. Med. Bulletin, 1978, 34, 213-310
60. "Report of the committe of the genetic constitution of chromosome 6". Cytogenet Cell. Genet. 1976, 16, 24-30
61. Inoue S., Yamamoto Y. "Improvement of sensitivity in HLA-DRB1 typing by semi-nested PCR-RFLP." Acta Med Okayama 1998 Dec; 52 (6): 289-96
62. Dausset J. "The major histocompatibility complex in man. Past, present and future concepts", 1981, 213, 1469-1474
63. Allen M. "Genetic Typing of HLA Polymorphism Application to Studies of Disease Association and Forensic Medicine", (1995) Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Suedia, 90-97
64. Henke L., Hoffmann P.H., Henke J. "Use of DNA polymorfism in forensic paternity evaluation" (1990) Zeitschrift fur Rechtsmedizin 235-248
65. Brinkman B. & colab "Mutation rate in Human Microsatellites; Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat" (1998) Am J Hum Genet 1408-1415

66. Schlotter C. "Are microsatellites really simple sequences?" (1998) *Current Biology* 8(4):322-329
67. Henke J., Fimmers R., Baur M.P. "DNA – minisatellite mutation; recent investigations concerning distribution and impact on parentage testing" - *Int.J.Leg.Med.* 1993, 105, 3, 217-223
68. Lee H.C., Ladd C., Bourke M.T. "Forensic applications of DNA typing", *Collection and preservation of evidence*, A.M. J. Forensic Med. Path. 1998, 19: 10-18
69. Ștefănescu D.T., Bărbărie L. "Un mijloc de proba revoluționar/ amprenta genetică" (2001) *Dreptul seria III* (9): 98-107
70. Smith J.C., Newton C.R., Alves A., Anwar R., Jenner D., Markham A.F. "Highly polymorphic minisatellite DNA probes", 1990, 30, 3-18
71. Morling N., Hansen H.E. "Paternity testing with VNTR DNA systems I. Matching criteria and population frequencies of VNTR systems", 1993, 105, 4, 189-197
72. Tracey M. "Short tandem repeat – based identification individuals and parents", *Croat. Med. J.* 2001, 233-238
73. ***www.cstl.nist.gov/biotech/strbase – "Brief Introduction to STR" (2000)
74. Brinkman B. – "Overview of PCR-Based Systems in Identity Testing" (1998) *Forensic DNA Profiling Protocols – Methods in Molecular Biology* vol.98, Humana Press, Totowa, NJ, 105-119
75. Schneider P.M. "Scientific standards for studies in forensic genetics", *Forensic Sci Int*, 2006, 238-243
76. Evett I.W., Gill P.D., Scragge J.K., Weir B.S. "Establishing the robustness of short tandem repeat statistics for forensic applications" (1996) *American J Hum Genet* 58: 398-407
77. Jeffreys A.J., Wilson V., Neumann R., Keyte J. "Amplification of human minisatellites by polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells", 1988, 10953-10971
78. Brinkman B. & colab. "The evidential value of STR - An analysis of exclusion cases" (2001) *Int J Leg Med* 114:173-177
79. Polesky H.F. & colab. "Systems reported by Laboratories participating in the AABB/CAP Parentage Testing Program:1993-1998" (2000) *Progress in Forensic Genetics* 8, Elsevier Science B.V., 609-611
80. Barbărie L.E. "International recommended standards for genetic paternity testing", 2002, *Rom. J. Legal Med.*
81. ***www.cstl.nist.gov/div831/strbase
82. Huo Y. "How many STR markers are enough for paternity identification" (2000) *Progress in Forensic Genetics* 8, Elsevier, 384-387
83. Pfitzinger H., Mangin P. "Identification genetique a partir d'échantillons biologiques medico-legaux fortement dégradés et présents en très faible quantité" (1995) *J. Med. Leg. et Droit Med.*, 453 –457
84. Butler J.M. „Forensic DNA biology and technology behind STR markers”, London Academic Press, 2001
85. McPherson M.J. "PCR - practical approaches" (1992) Oxford University Press, Oxford
86. Lyu P., Seo T.S. „Integrated portable polymerase chain reaction- capillary electrophoresis microsystems for rapid forensic short tandem repeat typing”, *Anal. Chem.* 2007, 1881-1889
87. Marjanovic D., Bakal N. „Optimisation of forensic genetics procedures used in disputed paternity testing: adjustment of the PCR reaction volume”, *Bosn. J. Med. Sci.*, 2006, 76-81
88. McKeown B. & colab. "Automation in Paternity Testing" (2000) AstraZeneca Cellmark Diagnostics
89. Southern E.M. „Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis”, *J. Mol. Biol.*, 1975, 98, 503
90. Hochmeister M.N., Budowle B., Baechtel F.S. „Effects of presumptive test reagents on the ability to obtain restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from human blood and semen stains”, *Journal of Forensic Sciences*, 656-661
91. Simon M. „Establishment of an approved clinical laboratory based on the analyses of restriction fragment length polymorphisms”, New York, 1988, 195-216
92. J.J. Cassiman, R. Decorte "Forensic Medicine and the PCR Technique" (1993) *J. Med. Genet.*, 625-633
93. *** "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.* (1992), 63-64
94. Krawczak M. "Statistical Inference from DNA Evidence" (1999) *DNA Profiling and DNA Fingerprinting*, Birkhauser Verlag, 229-224
95. Ludes B., Mangin P. "Presentation des résultats" (1992), « Les empreintes genetique en medecine legale », Ed. Lavoisier, Paris, 107-114
96. Evett I.W., Werrett D.J. "Bayesian Analysis of Single Locus DNA profile" (1990) *Proceedings for The International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, 77-91
97. Saldeen A. "A modified method for calculating the probability of paternity on the basis of the paternity index", 1981
98. Brenner C.F. „Forensic mathematics of DNA matching”, referința electronică la www.wco.com
99. Evett I.W. & Weir B.S. "Interpreting DNA Evidence – Statistical genetics for Forensic Scientists" (1999) Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts
100. Brenner C.H. "A note on paternity computation in cases lacking a mother" (1993), 51-54
101. Ayres K.L., Overall A.D.J. "Allowing for within-subpopulation inbreeding in forensic match probabilities" (1999) *Forensic Sci. Int.*, 207-216
102. Brenner C.H. "Mutations in Paternity" (1999) *Forensic Mathematics home page*, <http://dna-view.com>
103. Wiegand P., Lorente J., Brinkmann B. "DNA investigations on fetal material from paternity cases" (1991) *Int. J. Leg. Med.*, 276-279
104. Huckenbeck W., Rand S. "Serological findings and efficiency of DNA profiling in transfused patients and their significance for identity and paternity tests" (1994), *Int. J. Leg. Med.*, 178-182
105. Bein G. & colab. "Pseudo-exclusion from paternity due to maternal uniparental disomy 16" (1998), *Int. J. Legal Med.*, 328-330
106. Guarducci S. & colab. - "Practical application of DNA study for genetic analysis in complex situations involving presumed incest as cause of Mendelian disorders" (2000), *Progress in Forensic Genetics* 8, Elsevier, Amsterdam, 381-383
107. Jobling M.A. "The Y Chromosome as a marker for the history and structure of human populations" (2000) Report for a Wellcome Trust funded Project, www.leicester.ac.uk/genetics/
108. Jobling M.A., Pandya A., Tyler-Smith C. "The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing" (1997) *Int. J. Legal Med.* 118-124
109. *** "Men in genes – The how and Y of human evolution" (1998) *Wellcome News* (17Q4): 24-26
110. Jobling M.A. "Surnames and genetic structure: a molecular analysis using Y-chromosomal DNA polymorphisms" (2001) Report for a Wellcome Trust funded Project, www.leicester.ac.uk/genetics/
111. Gill P. „An assessment of the utility of single nucleotide polymorphism (SNP) for forensic purposes”, *Int. J. Legal Med.* 2001, 114, 204-211
112. *** "Y-Chromosome STRs" www.cstl.nist.gov/strbase/y_strs.htm
113. Knijff P. & colab. - "Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects" (1997) *Int. J. Legal Med.* 125-133
114. Kayser M. & colab. "Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study" (1997) *Int. J. Legal Med.* 125-133
115. Santos F.R., Carvalho-Silva D., Pena S. "PCR based DNA Profiling of Human Y Chromosomes" (1999) *DNA Profiling and DNA Fingerprinting*, Birkhauser Verlag, Basel, 133-152
116. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ "The DNA sequence of the human X chromosome", *Nature* 2005, 434: 325-37

117. ***<http://www.chrx-str.org>
118. Zalan et al. "Hungarian Population data of four X-linked markers: DXS8378, DXS7132, HPRTB, and DXS7423", 2007, Int. J. Legal Med. 121(1):74-7
119. Pepinski W et al. "Polymorphism of four X-chromosomal STRs in a Polish population sample", Forensic Sci. Int. (2000) 151: 93-95
120. Szibor R et al. "Population data on the X chromosome short tandem repeat locus HumHPRTB in two regions of Germany", J. Forensic Sci. (2000), 45: 231-3.
121. Bar W., Brinkmann B., Budwole B., Carracedo A., Gill P., Mayr W., Olaisen B. "DNA recommendations: further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems", 1997, Int. J. Legal Med., 110:175-176
122. Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D "Use of X-linked markers for forensic purposes", 2003, Int. J. Legal Med. 117: 67-74
123. *** <http://www.cse.csiro.au/poptools.html>
124. Shin SH et al. "Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population", 2005, Forensic Sci. Int. 147: 35-41
125. Chen MY, Wu FC, Meng LM et al "Population data on the X chromosome short tandem repeat loci HPRTB and AR in Taiwan", 2005, Forensic Sci. Int. 126:171-172
126. Zarrabeitia MT et al. "X-linked microsatellites in two Northern Spain populations", 2004, Forensic Sci. Int. 145: 57-59
127. Anderson S. & colab. "Sequence organization of the human mitochondrial genome"(1981) Nature 290:457-465
128. Bar W., Brinkmann B., Budwole B., Holland M., Carracedo A., Gill P., Lincoln P.J., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P.M., Tully G. & Wilson M. "DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for Mitochondrial DNA Typing", 2000, Int. J. Leg. Med. 113: 193-196
129. Steighner R.J., Holland M. "Amplification and sequencing of Mitochondrial DNA in Forensic Casework" ,Methods in Molecular Biology, vol. 98: Forensic DNA profiling Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 213-221
130. Baasner A., Schafer C., Junge A., Burkhard R. "Polymorphic sites in human mitochondrial DNA control region sequences: population data and maternal inheritance" (1998) Forensic Science Int 98: 169-178
131. Budwole B. & colab. "Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data" , 1999, Forensic Science Int. 103: 23-35
132. Rousselet F., Mangin P. "Mitochondrial DNA polymorphisms: a study of 50 french caucasian individuals and application to forensic casework" , 1998, Int. J. Leg. Med. 111:292-298
133. Huhne J., Pfeiffer H., Brinkmann B. "Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples", 1998, Int. J. Leg. Med. 112: 27-30
134. Carracedo A. & colab. "Reproductibility of mtDNA analysis between laboratories: a report of the European DNA profiling group (EDNAP)" , 1998 Forensic Science Int. 97:165-170
135. Isenberg A.R., Moore J. "Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory", 1999, Forensic Science Communications vol.1 no.2 (www.fbi.gov)
136. Sullivan K.M., Hopgood R., Gill P. " Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA", 1992, Int. J. Leg. Med. 105:83-86
137. Wilson M.R. & colab. "Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis", 1995, Int. J. Leg. Med. 108:68-74
138. ***Annual Report summary for 1998 – prepared for the Parentage Testing Standards Program Unit, 1998, www.aabb.org
139. Bar W, Brinkmann B., Budwole B., Carracedo A., Gill P., Lincoln P., Mayr W., Olaisen B. " DNA recommendations - further report of the DNA Commission* of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems" Int. J. Legal Med. (1997) 110:175-176
140. Thomson A. & colab. "Validation of Multiplex STR Systems for the investigation of parentage and other Familial Relationships", 2000, Progress in Forensic Genetics 8 , Elsevier, Amsterdam 374- 376
141. Morling N. & colab. "Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on genetic investigations in paternity cases", 2002 Report (draft) to the Paternity Testing Workshop of the ESWG-ISFG, Lisbon 2002
142. Shows A. "Guidelines for human gene nomenclature. An international system for human gene nomenclature", 46:11-28
143. Gill P. & colab. "Report of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): formulation and testing of principles to evaluate STR multiplexes" (2000) Forensic Science Int 108:1-29
144. Bjerre A., Court D.S., Lincoln P., Morling N. "A report of the 1995 and 1996 Paternity Testing Workshop of the English Speaking Working Group of the International Society for Forensic Haemogenetics, Forensic Sci. Int. 90 (1997) 41-55
145. ***Annual Report Summary for Testing in 2003 – Parentage Testing Standards Program Unit, October 2004, www.aabb.org
146. Brenner C.H. "Likelihood ratios for paternity situations" (1999) www.dna-view.com
147. Allen R. "Parentage Testing in the United States. The Role of the American Association of Blood Banks"
148. Callaghan G. "Who's your daddy?", The Weekend Australian Magazine 2004; 6-7 Nov:28-9.
149. Bellis M.A., Hughes K. "Measuring paternal discrepancy and its public health consequence", Journal of Epidemiology and Community Health 2005;59:749-754
150. Lucassen A, Parker M. "Revealing false paternity: some ethical considerations" Lancet 2001;357:1033-5
151. Ross LF. "Disclosing misattributed paternity. Bioethics", 1996; 10:114-30
152. Valentin J. "Exclusions and attributions of paternity: practical experiences of forensic genetics and statistics", Am. J. Hum. Genet., 1980;32:420-31
153. Forste R, Tanfer K. "Sexual exclusivity among dating, cohabiting, and married women", J. Marriage Fam., 1996, 58:33-47
154. ***<http://www.abc.net.au/science/news/stories/s177471.htm>
155. Schriver M., Fudakis T. "Getting the science and the ethics right in forensic genetics", Nat. Genet. 2005 May, 449-450
156. ***ESWG Report - Paternity Testing Workshop, 22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2007, Copenhagen
157. *** American Association of Blood Banks – 1994 Annual Report Summary for Parentage Testing
158. ***Raportul național 1999-2006 prezentat de INML București (referință electronică: <http://www.legmed.ro/despre-rapoarte.php>)
159. Technical Manual GenePrint[®] STR Systems - Silver Stain Detection - Promega (referință electronică: www.promega.com)
160. Ingvarsson S. & colab. "Population Studies and Validation of Paternity Determinations by Six Microsatellite Loci", 2000, J. Forensic Science 45(3): 692-694
161. Committee on DNA Forensic Science, Commission on DNA Forensic Science, National Research Council "Statistical Issues" (1996) The Evaluation of Forensic DNA Evidence National Academy Press, Washington D.C., 125-166
162. Pfizinger H., Ludes B., Mangin P. "Sex determination of forensic samples: coamplification and simultaneous detection of a Y-specific and X-specific DNA sequence", 1993, Int. J. Leg. Med. 105:213-216
163. ***referință electronică: www.appliedbiosystems.com
164. ***www.dna-view.com
165. Panke E. and colab. "Stopping Parentage Tests Probability of paternity of 99% Clinical Studies Show Potential for false Positive Results, 2000, Progress in Forensic Genetics, Amsterdam, 387-389