

АКТ № _____

молекулярно-генетического исследования случая спорного отцовства

На основании **частного обращения** г-на Пушкина Александра Сергеевича (заявитель) от такого-то числа комиссия сотрудников лаборатории _____

_____ в составе:

_____ (образование высшее медицинское,
стаж по специальности _____ лет);

_____ (образование высшее педагогическое,
стаж по специальности _____ лет);

_____ (образование высшее биологическое,
кандидат биологических наук, стаж по специальности _____ лет);

_____ (образование высшее химическое,
доктор биологических наук, стаж по специальности _____ лет)

произвела независимое молекулярно-генетическое исследование по делу об установлении спорного отцовства (**биологического**).

Материалы, представленные на исследование

Исследовались биологические образцы, полученные от следующих лиц:

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ОТЕЦ:	Пушкин Александр Сергеевич (соскоб буккального эпителия) <i>Паспортные данные</i>
МАТЬ:	Чушкина Александра Сергеевна (соскоб буккального эпителия) <i>Паспортные данные</i>
РЕБЁНОК:	Пушкин-Чушкин Сергей Александрович (соскоб буккального эпителия) <i>Данные, указанные в свидетельстве о рождении</i>

Взятие биологических образцов осуществлялось в помещении _____
_____ в присутствии следующих
сотрудников: _____.

Личности Пушкина А.С. и Чушкиной А.С. удостоверены предъявленными паспортами, личность Пушкина-Чушкина С.А. – свидетельством о рождении. Фотографии обследуемых лиц представлены в *Приложении 1*.

На разрешение исследования вынесен вопрос:

Является ли г-н Пушкин А.С., _____ г.р., проживающий по адресу _____,
_____ истинным
(биологическим) отцом несовершеннолетнего ребёнка Пушкина-Чушкина С.А., _____ г.р.,
родившегося у Чушкиной А.С., _____ г.р., проживающей по адресу _____
_____?

Ответственный исполнитель: _____

ИССЛЕДОВАНИЕ

Краткое описание метода исследования

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

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

Выявленные аллели исследованных полиморфных локусов обозначаются в соответствии со стандартной международной номенклатурой, что позволяет при необходимости сравнить результаты, полученные в разных лабораториях.

Результаты исследования интерпретируются в соответствии с тем фактом, что в момент зачатия ребёнка происходит слияние яйцеклетки матери и сперматозоида биологического отца, содержащих гаплоидные наборы хромосом (по 23 хромосомы). После оплодотворения эти два гаплоидных набора хромосом формируют диплоидный набор хромосом ребёнка (23 пары хромосом). Таким образом, половину генетического материала ребёнок получает от матери и другую половину от биологического отца. Отсюда следует, что в геноме ребёнка могут присутствовать только такие аллели полиморфных локусов, которые обнаруживаются у матери и биологического отца.

Сравнение генотипов ребёнка и матери позволяет установить, какие именно аллели унаследованы ребёнком от биологического отца (определить *«отцовский набор аллелей»* у ребёнка).

Вывод об исключении отцовства делается, если в генотипах ребёнка и предполагаемого отца отсутствуют совпадающие аллели по отдельным локусам. При наличии совпадающих аллелей по всем исследованным локусам у ребёнка и предполагаемого отца делается вывод о возможности получения ребёнком наследственного материала от обследуемого: случай *«не-исключения» отцовства*.

Иными словами, в проводимом исследовании выносится на разрешение следующий вопрос: *присутствует ли в геноме предполагаемого отца генетический материал, который был передан ребёнку истинным (биологическим) отцом?*

Результаты исследования логически неопровержимы лишь в случаях исключения отцовства. В случаях же *«не исключения»*, поскольку комбинация генотипов по всем исследованным локусам не является абсолютно уникальной для каждого человека, информативность полученных результатов оценивается средствами теории вероятности и математической статистики на основании данных о встречаемости аллелей в соответствующей эталонной популяции.

Любой случай *«не исключения»* отцовства, независимо от количества исследованных локусов, не является логически неопровержимым: формально всегда существует вероятность

Ответственный исполнитель:

случайного совпадения аллелей в сравниваемых образцах ДНК предполагаемого отца и ребёнка. Следует также отметить, что у однояйцевых близнецов комбинированный генотип по всем полиморфным локусам является абсолютно одинаковым, и поэтому отцом ребёнка точно так же может быть и брат-близнец предполагаемого отца.

Выделение ДНК и проведение ПЦР

Исследование в целом проводили, руководствуясь рекомендациями Международного общества по судебной генетике: *International Society of Forensic Genetics, ISFG* [1-3].

ДНК из биологических образцов выделяли по стандартной методике с использованием фенол-хлороформной экстракции [4, 5].

Исследовали полиморфные локусы генома человека, указанные в *таблице 1*. ПЦР проводили с использованием термоциклера *Терцик МС-2* (Россия). ПЦР осуществляли с использованием наборов реагентов для определения количества тандемных повторов в полиморфных локусах и пола в геномной ДНК человека «ТАПОТИЛИ» (Россия) в соответствии с «Инструкцией по применению» [5].

Таблица 1.

Использованные в настоящем исследовании полиморфные локусы генома человека.

№	Локус	Хромосомная локализация	Длина повторяющейся единицы (нуклеотидных пар)
1	<i>TPOX</i>	2p25.3	4
2	<i>D3S1358</i>	3p21.31	4
3	<i>CSF1PO</i>	5q33.1	4
4	<i>D7S820</i>	7q21.11	4
5	<i>LPL</i>	8p22	4
6	<i>D8S1179</i>	8q24.13	4
7	<i>D10S1248</i>	10q26.3	4
8	<i>TH01</i>	11p15.5	4
9	<i>CD4</i>	12p12-pter	5
10	<i>vWFII</i>	12p13.3	4
11	<i>CYAR04</i>	15q21.1	4
12	<i>D16S539</i>	16q24.1	4
13	<i>D22S1045</i>	22q12.3	3

Анализ продуктов ПЦР

Для идентификации аллелей полиморфных локусов продукты ПЦР анализировали методом электрофоретического разделения в агарозных ПА-2...4 гелях и 10%-ных неденатурирующих полиакриламидных гелях (ПАГ). В качестве внешних молекулярных стандартов использовали *100 п.н.-GeneRuler DNA Ladder* и *MspI*-фрагменты плазмиды *pBlueScript*, положительные контроли с известными генотипами, а также аллельные «лестницы» для всех локусов, содержащие наборы фрагментов ДНК известных размеров.

Ответственный исполнитель:

По окончании электрофореза гели окрашивали в растворе бромистого этидия и просматривали в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 или 312 нм) на трансиллюминаторе. Результаты документировали с использованием аппаратно-программного комплекса *KT&C CCD CAMERA Hi-Res EXvision / Gel Imager ver. 1.0*.

Интерпретация результатов

Идентификацию аллелей для исследованных локусов осуществляли с использованием соответствующих аллельных «лестниц», контрольных образцов с известными генотипами, а также по нелокусным внешним стандартам путём компьютерной интерполяции и регрессионного анализа (сплайн третьего порядка).

Сравнивали индивидуальные генотипы по отдельным локусам у ребёнка и заявленных родителей. Интерпретацию выявленных гомозиготных профилей проводили, исходя из предположения об отсутствии эффекта «ложной гомозиготности». Полагали полную невозможность мутаций. Материнство рассматривали как беспорное.

Результаты

Выявленные генотипы по тринадцати исследованным аутосомным локусам геномов ребёнка и заявленных родителей представлены в таблице 2. При этом **жирным шрифтом** у ребёнка выделены аллели условно отцовского происхождения (которые отсутствуют в генотипе матери). **Жирным шрифтом** у предполагаемого отца выделены аллели, которые также присутствуют у ребёнка. Нумерация аллелей и их популяционные частоты для всех исследованных локусов взяты из инструкции к наборам [5].

Как видно из представленных в таблице 2 данных, заявленный отец обнаруживает формальное совпадение с ребёнком как минимум по одному из аллелей во всех исследованных тринадцати аутосомных локусах.

Таким образом, установлено: генетический материал ребёнка мог быть получен по наследству от заявленного отца, то есть *отцовство в исследованном спорном случае не исключается*.

Образцы выделенной ДНК и полученные в ходе исследования электрофореграммы сохраняются в архиве лаборатории в течение трёх месяцев после окончания исследования. Данные материалы могут быть представлены заявителю по дополнительному запросу.

Расчёт численных значений индекса и вероятности отцовства

Отношения правдоподобия (ОП) рассчитывались отдельно для каждого аутосомного локуса на основе стандартных алгоритмов с использованием соответствующей компьютерной программы [6].

Исходя из хромосомной локализации исследованных локусов, сцепленное наследование аллелей предполагалось возможным для локусов *CD4* и *vWFII*. Поэтому для дальнейших расчётов использовалось только одно (наибольшее) значение ОП из этой пары сцепления (см. таблицу 2, обозначение «→»). Данный подход позволяет избежать необоснованного завышения значений комбинированного индекса отцовства. Предполагая независимое наследование аллелей для всех остальных аутосомных локусов (отсутствие сцепления), отношения правдоподобия были перемножены и рассчитан комбинированный индекс отцовства (CPI).

Использованные для расчётов ОП значения частот аллелей (см. таблицу 2) являются консервативной оценкой для *европеоидного населения России* (анализ различных популяционных выборок, печатные работы).

При необходимости значения индекса и вероятности отцовства могут быть пересчитаны по другим эталонным частотам аллелей для тех популяций, по которым доступны литературные данные.

Индекс отцовства по тринадцати аутосомным полиморфным маркерам по результатам выполненного исследования составил **68 806**.

Вероятность отцовства оценивалась на основании алгоритма Байеса, исходя из предположения, что никто из кровных родственников обследуемого мужчины (его отец, братья, другие дети, любые другие патрилинейные родственники) не входит в число “предполагаемых отцов”. Априорная вероятность отцовства (то есть до получения результатов исследования ДНК) полагалась равной 0,5. При необходимости значения вероятности отцовства могут быть пересчитаны при любых других значениях априорной вероятности.

Вероятность отцовства по результатам выполненного исследования составила **99,9985%**.

Таким образом, по результатам выполненного исследования ДНК в 68806 раз более вероятно, что наблюдаемое совпадение аллелей у заявленного отца Пушкина А.С. и ребёнка Пушкина-Чушкина С.А. обусловлено тем, что именно этот мужчина является биологическим отцом, нежели истинным отцом является некто другой (случайно выбранный из популяции мужчина).

Совпадение аллелей можно считать закономерным, то есть обусловленным кровно-родственными родительскими отношениями заявленного отца и ребёнка, с вероятностью не менее $P = 99,9985\%$.

Выводы

Сравнительный молекулярно-генетический анализ показал, что по всем **тринадцати** исследованным локусам обнаружено формальное совпадение как минимум по одному из аллелей между генотипами заявленного отца и ребёнка. *Таким образом, заявленный отец Пушкин А.С. может являться истинным (биологическим) отцом ребёнка Пушкина-Чушкина С.А., родившегося у Чушкиной А.С.*

По результатам выполненного молекулярно-генетического исследования комбинированный индекс отцовства составляет **68806**, а вероятность того, что именно заявленный отец Пушкин А.С. является биологическим отцом ребёнка Пушкина-Чушкина С.А., составляет не менее **99,9985%** (при априорной вероятности 50%).

Подписи всех исполнителей:

Даты:

поступления необходимых материалов	
начала исследования	
окончания исследования	
составления акта	

Ответственный исполнитель:

Список литературы

1. *Morling N., Allen R.W., Carracedo A., Geada H., Guidet F., Hallenberg C., Martin W., Mayr W.R., Olaisen B., Pascali V.L., Schneider P.M.* (2002) Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. – *Forensic Science International*, 129, 148–157.
2. *Морлинг Н., Аллен Р.В., Каррачедо А., Жеада Е., Гуде Ф., Нелленберг Ш., Мартин В., Майр В.Р., Олайсен Б., Паскали В., Шнайдер П.М.* (2003) Международные рекомендации по стандартам проверки отцовства. – *Проблемы стандартизации в здравоохранении*, 7, 8-20.
3. *Gjertson D.W., Brenner C.H., Baur M.P., Carracedo A., Guidet F., Luque J.A., Lessig R., Mayr W.R., Pascali V.L., Prinz M., Schneider P.M., Morling N.* (2007) ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. – *Forensic Science International Genet.*, 1 (3-4), 223-231.
4. *GenePrint™ STR Systems (Silver Stain Detection). Technical manual.* – Promega Corporation (USA), revised 7/06.
5. *Наборы реагентов для определения количества tandemных повторов в полиморфных локусах и пола в геномной ДНК человека «ТАПОТИЛИ».* – <http://www.tapotili.ru/nabory.htm>
6. *Ефремов И.А., Серегин Ю.А.* Программа для расчета индекса и вероятности отцовства (материнства) при исследованиях ДНК Pindex: Paternity Index. – Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2009610058 от 11.01.2009.

Таблица 2.

Генотипы, установленные для обследованных лиц, и расчёт отношений правдоподобия (ОП) для исследованных аутосомных локусов.

№	Локус	Генотип отца (Пушкин А.С.)	Генотип ребёнка (Пушкин- Чушкин С.А.)	Генотип матери (Чушкина А.С.)	Формулы расчёта ОП	Частоты аллелей	Значения ОП
1	D10S1248	12/13	13/15	13/15	$1/(2p(13)+2p(15))$	p(13)=0,262 p(15)=0,206	1,07
2	TPOX	8/8	8/11	8/11	$1/(p(8)+p(11))$	p(8)=0,580 p(11)=0,245	1,21
3	CYAR04	11/12	7/11	6/7	$1/2p(11)$	p(11)=0,350	1,43
4	D3S1358	15/15	15/16	15/16	$1/(p(15)+p(16))$	p(15)=0,270 p(16)=0,310	1,72
5	D16S539	11/14	11/13	13/13	$1/2p(11)$	p(11)=0,284	1,76
6	LPL	11/12	12/13	10/13	$1/2p(12)$	p(12)=0,226	2,21
7	D7S820	9/11	10/11	10/10	$1/2p(11)$	p(11)=0,220	2,27
8	D8S1179	13/14	14/14	13/14	$1/2p(14)$	p(14)=0,202	2,48
9	CD4	6/6	6/10	5/10	$1/p(6)$	p(6)=0,357	2,80 (-)
10	D22S1045	11/14	11/16	15/16	$1/2p(11)$	p(11)=0,160	3,12
11	TH01	7/10	7/9	6/9	$1/2p(7)$	p(7)=0,153	3,27
12	vWFII	9/9	9/12	11/12	$1/p(9)$	p(9)=0,110	9,09
13	CSF1PO	9/11	9/10	10/12	$1/2p(9)$	p(9)=0,047	10,64
Комбинированный индекс отцовства:					68 806		
Вероятность отцовства (при априорной вероятности 0,5):					99,9985%		

Ответственный исполнитель: