

LA-19**TEHNICI DE GENETICĂ MOLECULARĂ
APPLICATE ÎN MEDICINA LEGALĂ**

Adrian Crețu

Centrul de Medicină Legală
Chișinău, Republica Moldova

Principiul identificării genetice a fost elaborat în 1984 de Alec Jeffreys pe baza unor regiuni ale ADN-ului formate din anumite secvențe care sunt repetate de mai multe ori. Numărul de repetări diferă de la un individ la altul generând un profil genetic sau amprenta genetică unică pentru fiecare individ.

La începutul anilor '90 ai secolului trecut, gelul de poliacrilamidă era folosit în mare parte pentru separarea alelelor minisateliților sau microsateleților amplificate prin PCR. De la introducerea analizatorului genetic ABI PRISM 310 în 1996, instrumentele de electroforeza capilară au devenit o platformă dominantă pe care se efectuează și în prezent analizele genetice judiciare.

Cu ajutorul tehnologiilor moderne, cantitatea de ADN necesară pentru analiză poate fi obținută chiar și de la o probă biologică minusculă, care permite identificarea profilului genetic al oricărei persoane.

Până în prezent, în Republica Moldova, cercetarea genetică a diferitelor cazuri specifice medicinei legale s-a făcut prin analiza markerilor serologici clasici (grupele sangvine, sistemul HLA, proteinele polimorfe și enzimele, cercetate prin metode imunologice sau electroforetice).

Analiza moleculară a ADN-ului în problemele medico-legale de identificare a persoanelor și investigații criminalistice este folosită pe larg în toate țările din Europa și cele din spațiul CSI, singura țară care nu dispune de un laborator de genetică judiciară fiind doar Republica Moldova.

Tehnici molecular-genetice utilizate în laboratoarele de genetică judiciară:

- PCR – reacție de copiere și amplificare a informației ADN;
- Real Time PCR – amplificarea și cuantificarea ADN-ului în timp real;
- Electroforeză în gel – separarea fragmentelor de ADN și vizualizarea lor utilizând un transiluminator și un sistem fotodocumentare gel;
- Electroforeză capilară – separarea și analiza fragmentelor de ADN la analizorul genetic automatizat;
- Secvențierea ADN – stabilirea secvenței de nucleotide.

Reacția de polimerizare în lanț (*Polymerase Chain Reaction, PCR*).

Metoda al cărei principiu se bazează pe procesul replicării semiconservative și prin care se realizează amplificarea selectivă și rapidă a secvențelor țintă ADN (fragmentelor de interes). Metoda a fost dezvoltată în condiții de laborator de Kary Mullis în 1983, laureat al Premiului Nobel pentru chimie (1993).

Procedura este simplă, economică și în întregime automatizată. Pentru tehnica PCR sunt necesare următoarele componente: ADN de amplificat, primeri (oligonucleotide, amorse), ADN-polimeraza (Taq, Smart-Taq), dNTP (dezoxiribonucleotid trifosfați): dATP, dCTP, dGTP și dTTP, soluție tampon (Mg²⁺ sau Mn²⁺, K⁺) care constituie un *PCR-Buffer* și apă ultrapură (H₂O nuclease free).

Specificațiile tehnice de bază ale unui thermocycler utilizat pentru amplificarea ADN-ului în laboratoarele de expertiză genetică judiciară: un grad ridicat de flexibilitate, mod simplu de programare, funcție de gradient, rampă programabilă, mod de incubare, capac cu încălzire ajustabilă, acuratețea temperaturii ridicată ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Blocul universal cu microplaci din aluminiu, argint sau aur.

Kiturile pentru markerii STR (*short tandem repeats*), aplicate în cazurile medico-legale, se bazează pe tehnologia **PCR multiplex**, adică amplificarea tuturor locilor de interes se face în mod simultan.

Real Time PCR.

Pentru a evalua calitatea și cantitatea probelor și pentru a determina spectrul potrivit de input, ADN-ul din probele de caz trebuie cuantificat.

Pentru cuantificarea ADN-ului uman într-un caz judiciar este necesar un instrument PCR în timp real pentru estimarea conținutului ADN într-o probă, după parcurgerea etapei de extragere a ADN-ului.

Real Time PCR, este util pentru determinarea:

- calitativă: rezultat pozitiv sau negativ;
- cantitativă: stabilirea concentrației.

Deși analiza genotipică bazată pe electroforeza capilară domină în laboratoarele de expertize genetice judiciare din 1996 până în prezent, introducerea tehnologiilor alternative pe piață a debutat relativ recent. Determinarea secvenței nucleotidice a ADN-ului pentru întreaga genă sau o parte din ea se poate face prin:

Secvențierea Sanger (metoda clasică) care folosește: dNTPs + ddNTPs marcate cu fluorocromi, electroforeză capilară + detector de fluorescență.

Secvențierea de nouă generație. Folosind tehnologia secvențierii de ultimă generație (NGS) cuplată cu analiza bioinformatică avansată, fragmentele secvențiate sunt asamblate pe baza regiunilor în care se suprapun.

Polimorfismul unei singure nucleotide (SNP): tehnică utilizată pentru determinarea variațiilor unei singure nucleotide la nivel de genom.

Separarea fragmentelor de ADN.

Pe baza electroforegramelor obținute în urma electroforezei capilare la secvențiator (analizor genetic automatizat) și procesării datelor într-un soft specializat, se poate elibera concluzia privitor la profilul genetic al unei persoane. După această etapă, pot fi comarate profilele ADN-ului mai multor persoane sau de la obiecte ce conțin material biologic de proveniență umană.

La modul practic, fiecare companie producătoare de secvențiatoare (analizoare genetice automatizate), au propriile tehnologii de secvențiere, cele mai notorii fiind:

- Applied Biosystems / Life Technologies;
- Roche / 454;
- Illumina / Solexa;
- Pacific Biosciences;
- Promega / Spectrum.

Aplicațiile secvențierii:

- Amprentarea genetică, prin identificarea profilului genetic;
- ADN ancestral și informații cu privire la apartenența etnică sau la originea geografică;
- Genomuri individuale;
- Variațiile structurale ale ADN-ului;
- Identificarea agenților infecțioși;
- Analiza regiunilor genomului asociate bolilor;
- Cercetare oncologică;
- HLA în transplantologie;
- Farmacogenomica și medicina personalizată.

Amprentarea genetică (identificarea profilului genetic).

La fel ca amprente digitale, amprente genetice pot fi folosite pentru identificarea persoanelor.

Amprentarea ADN, dezvoltată de către Alec Jeffreys, este metoda folosită în prezent în toată lumea în știința medico-legală: în identificarea polimorfismelor

individuale în analiza filiației (testele de paternitate), în criminalistică, identificarea victimelor dezastrelor, disputelor legate de imigrări,...

În 1992, Consiliul Europei, a publicat recomandarea cu privire la utilizarea analizelor ADN în rețeaua sistemului judiciar.

SUA menține cea mai mare baza de date ADN – CODIS (*Combined DNA Index System*) – care a fost extinsă pentru a include aproape orice infractor, astfel încât deja în anul 2011 erau înregistrate peste 10 milioane de profiluri ADN.

Baza de date a Marii Britanii, NDAD (the National DNA Database) a fost prima bază de date genetică din lume (implementată în 1995) unde sunt incluse:

- profilele genetice a tuturor persoanelor arestate pentru o infracțiune care este înscrisă în cazierul judiciar;
- profile genetice ale victimelor;
- profile genetice a unor persoane pe bază de voluntariat.

Numărul total de probe în baza de date britanică a fost de peste 6 milioane în anul 2011.

În 2005, guvernul portughez a propus să se introducă o bază de date ADN pentru întreaga populație a Portugaliei, dar după o serie de dezbateri, baza de date a fost introdusă doar pentru infractori.

Majoritatea țărilor europene folosesc baza de date CODIS, pentru stocarea profilurilor ADN.

Concluzii.

Tehnologia convențională folosită în majoritatea laboratoarelor de expertize generice judiciare se bazează pe separarea și analiza locilor STR (fragmentelor ADN) în analize genetice automatizate de tip electroforeză capilară.

Tehnologiile alternative ca secvențierea de ultimă generație (NGS) cuplată cu analiza bioinformatică avansată, sau stabilirea rapidă a profilului ADN ar putea deveni în viitorul apropiat tehnologii dominante în laboratoarele de expertize generice judiciare, potențialul acestora fiind foarte larg.

Avantajul secvențierii NGS este că simultan se pot analiza loci localizați pe cromozomi autozomali, cromozomul Y, cromozomul X și ADN-ul mitocondrial. Spectrul informațional obținut fiind mult mai complex față de secvențierea clasică de tip Sanger.

Bibliografie.

1. **Butler, J.M.** *Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing*. J. Forensic Sci. 51(2): 253-265, 2006.
2. **Dogăroiu Cătălin.** *Identificarea persoanei în medicina legală*. Ed. AIT Laboratories, București, 2011.
3. **Jeffrey M. Perkel, Peter A. Fung.** *2016 Next-Gen Sequencing Buyer's Guide*. Posted: August 30, 2016.
4. **Norrgard, K.** *Forensics, DNA fingerprinting, and CODIS*. Nature Education 1(1):35, 2008.
5. https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_profiling

6. <https://www.theguardian.com/science/2009/may/24/dna-fingerprinting-alec-jeffreys>
7. <https://worldwide.promega.com/products/genetic-identity/analysis/spectrum-ce-system-forensics-paternity/>