

**Jarosław A. Berent, Danuta Miścicka-Śliwka, Jakub Czarny,
Marcin Woźniak, Tomasz Grzybowski, Beata Pleszyńska, Anna
Syroczyńska**

Przydatność wybranych układów DNA w sprawach dochodzenia ojcostwa¹

Power of exclusion for selected DNA systems in paternity investigations

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. n. med. K. Śliwka

Celem pracy było porównanie przydatności (teoretycznej szansy wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny, PE) wybranych układów DNA stosowanych aktualnie w badaniach ojcostwa w stosunku do przydatności zestawu klasycznych układów serologicznych wynoszącej 0.8428. Otrzymano następujące wartości: dla zestawu układów oznaczanego w technice dot-blot (DQA1 + PolyMarker) – 0.8576, dla układu SE33 z analizą sekwencji – 0.8969, dla czterech układów AmpFLP (D1S80 + Apo B + Col 2A1 + YNZ22) – 0.9729, dla własnego multiplexu STR (5 loci) – 0.9959, dla komercyjnych multiplexów STR AmpFISTR Blue – 0.9609, PowerPlexTM – 0.9983, FFFL – 0.9132, PowerPlexTM + FFFL – 0.9998.

The aim of this paper was to compare the power of exclusion (PE) considered as a theoretical chance of exclusion of random falsely accused men for selected DNA systems with value for a set of 9 classical serological systems (PE=0.8428). The computer program compiled in Turbo Pascal 7.0 (Borland) was prepared to provide all calculations on the ground of allele frequencies (its listing is attached). The following results were achieved: dot-blot technique (DQA1 + PolyMarker) – 0.8576, SE33 with sequence analysis – 0.8969, AmpFLP technique (D1S80 + Apo B + Col 2A1 + YNZ22) – 0.9729, own multiplex (5 loci) – 0.9959, AmpFISTR Blue – 0.9609, PowerPlexTM by Promega – 0.9983, FFFL by Promega – 0.9132, PowerPlexTM + FFFL together – 0.9998.

Badanie polimorfizmu DNA w sprawach dochodzenia ojcostwa w opinii większości sędziów stanowi dowód potwierdzający ojcostwo. Nie każda jednak analiza DNA daje taką możliwość. Pewność uzyskuje się jedynie wtedy, kiedy

¹

Praca była zaprezentowana podczas XI Krajowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii, Łódź 2-5 wrzesień 1998 r.

wyłączamy ojcostwo. Celem uniknięcia nadinterpretacji wyników badań DNA Komisja Serologiczna Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii określa minimum, które winno być wypełnione w toku analizy i pozwalałoby jednocześnie na potwierdzanie ojcostwa z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością. Z praktyki wiadomo jednak, że nawet wykonanie rekomendowanych przez Komisję analiz nie zawsze upoważnia do formułowania opinii potwierdzających ojcostwo z dużym prawdopodobieństwem. Zdarza się to najczęściej, kiedy u stron występują np. często spotykane w populacji allele. W takiej sytuacji zakres badań powinien być poszerzony. Opracowanie metod badania wielu układów VNTR opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) sprawiło, że coraz częściej hemogenetycy sięgają właśnie po te układy, bądź to włączając je w zakres badań rutynowych, bądź to rozszerzając ich zakres dla uzyskania potwierdzenia ojcostwa w satysfakcjonującym stopniu.

Który z układów włączyć do badania, aby podnieść jego wartość dowodową, można określić na podstawie oceny przydatności danego układu (zwanej inaczej teoretyczną szansą wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny, ang. power of exclusion, PE). Oznacza ona ilu z niesłusznie pozwanych mężczyzn na 100 badanych wykluczyłoby się podczas badania przy użyciu wybranego układu.

Parametr ten był często stosowany w przeszłości do oceny polimorficzności nowowprowadzanych układów i ustalenia teoretycznej szansy wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny dla ekspertyzy w dochodzeniu ojcostwa. Podjęto również próby wykorzystania tego parametru do prowadzenia obliczeń tzw. zmodyfikowanego prawdopodobieństwa ojcostwa [23].

Obecnie parametr ten jest stosowany także w odniesieniu do układów DNA dla określenia ich przydatności w dochodzeniu ojcostwa i ustalenia zakresu badań [3].

Celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie i porównanie przydatności (teoretycznej szansy wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny) wybranych układów DNA w dochodzeniu ojcostwa na tle przydatności klasycznych układów grupowych.

MATERIAŁ I METODA

W pracy obliczono przydatności układów DNA stosowanych do badań ojcostwa w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej AM im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, których oznaczanie oparte jest na technice łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR): DQA1, PolyMarker, D1S80, Apo B, Col 2A1, YNZ22, układ SE33 z analizą sekwencji, własny multipleks STR (D1S103, TH01, D21S11, D18S51 i FGA), Perkin Elmer AmpFISTR Blue (D3S1358, vWA, FGA) oraz multipleksy Promegi: PowerPlex™ (D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, CSF1PO, TPOX, TH01, vWA) i FFFL (F13A01, FESFPS, F13B, LPL). Dane niezbędne do obliczeń zaczerpnięto z własnych baz populacyjnych [15–19]².

² Za wyjątkiem układów Apo B, Col 2A1 i YNZ22, dla których wartości przydatności zaczerpnięto z pracy Pestoni i wsp. [22].

Wyniki odniesiono do przydatności zestawu 9 układów klasycznych stosowanych rutynowo w naszym Zakładzie w badaniach I stopnia (AB0, MN, Rh, Hp, ACP, PGM1 – podtypy, ESD, GLO I i PGP). Wartości przydatności tych układów obliczono dla własnych baz populacyjnych [11–13]³.

Wartości przydatności dla poszczególnych układów obliczono – bazując na danych populacyjnych – stosując wzór podany przez Weir'a [25]:

$$PE = \sum_u p_u (1-p_u)^2 - \frac{1}{2} \sum_u \sum_{u \neq v} p_u^2 p_v^2 (4 - 3p_u - 3p_v)$$

gdzie: PE – przydatność (power of exclusion),

u, v – numery alleli;

p_u – częstość allelu u w populacji,

p_v – częstość allelu v w populacji.

Łączną przydatność dla konkretnego zestawu układów obliczono – bazując na przydatnościach każdego układu z osobna – stosując wzór:

$$PE_T = 1 - \prod_i (1-PE_i)$$

gdzie PE_T – łączna przydatność zestawu układów,

PE_i – przydatność i tego układu.

Dla ułatwienia stosunkowo żmudnych obliczeń opracowano program komputerowy w języku Turbo Pascal 7.0 firmy Borland prowadzący obliczenia PE dla dowolnego układu po zadaniu częstości populacyjnych alleli. Jego program źródłowy w wersji dla układu D1S80 przedstawiono w końcowej części pracy.

Stosowanie powyższych wzorów umożliwia uzyskanie dokładnych wartości przydatności danego układu. W tego typu obliczeniach nie stosuje się wzoru na obliczenie wartości przydatności (PE) bazującego na heterozygotyczności układu, bowiem daje on tylko przybliżoną wartość, znacznie różniącą się od

³ Za wyjątkiem układów AB0, MN, Rh i Hp, dla których wartości przydatności zaczerpnięto z pracy Szczotki i wsp. [24].

wartości rzeczywistej w przypadkach, gdy poszczególne allele występują z różnymi częstościami (a więc praktycznie zawsze).

WYNIKI

Przydatności poszczególnych układów klasycznych stosowanych rutynowo w ekspertyzie serologicznej I stopnia przedstawiono w tabeli I, a układów DNA w tabeli II. Łączne wartości przydatności różnych zestawów układów przedstawiono natomiast w tabeli III. Dla lepszego zobrazowania wyników na rycinie 1. przedstawiono ilu niesłusznie pozwanych mężczyzn na 100 badanych nie wykluczy się podczas badań w różnych wariantach.

Tabela I. Przydatność układów klasycznych.

Table I. Power of exclusion for classical serological systems.

Układ	Przydatność
AB0	0.1914
MN	0.1830
Rh	0.2953
Hp	0.1799
ACP	0.2756
PGM1	0.1549
ESD	0.0733
GLO I	0.1845
PGP	0.1099
Wartość łączna	0.8428

DYSKUSJA

Uzyskane wartości przydatności poszczególnych układów dla analiz w dochodzeniu ojcostwa są zbliżone do danych podawanych przez innych autorów w układach oznaczanych techniką dot-blot, układów AmpFLP i STR [2,4–6,9,14]. Gjertson i wsp. podał przydatność dla układu HLA wynoszącą 0.9325, a Nata i wsp. oraz Hansen i wsp. dla zestawu 7 i 5 układów VNTR badanych metodami hybrydizacyjnymi wartości wynoszące odpowiednio 0.999932 i powyżej 0.999 [7,8,20]. Do tych ostatnich wyników należy jednak odnieść się z dużą ostrożnością, bowiem de facto dla układów VNTR badanych metodami hybrydizacyjnymi nie można dokładnie określić ich przydatności, z uwagi na spotykane w tych układach mutacje, jak również różne podejścia do ustalenia częstości fragmentów.

Tabela II. Przydatność układów DNA.
Table II. Power of exclusion for DNA systems.

Układ DNA	Przydatność
DQA1	0.5621
LDLR	0.1801
GYP A	0.1867
HBGG	0.1875
D7S8	0.1834
GC	0.2649
SE33	0.8969
D1S80	0.6712
Apo B	0.5889
Col 2A1	0.3689
YNZ22	0.6828
D1S103	0.5538
TH01	0.5605
D21S11	0.7069
D18S51	0.7202
FGA	0.7441
D16S539	0.5610
D7S820	0.6157
D13S317	0.5971
D5S818	0.4887
CSF1PO	0.5135
TPOX	0.4076
vWA	0.6304
F13A01	0.5206
FESFPS	0.4323
F13B	0.4453
D3S1358	0.5859
LPL	0.4248

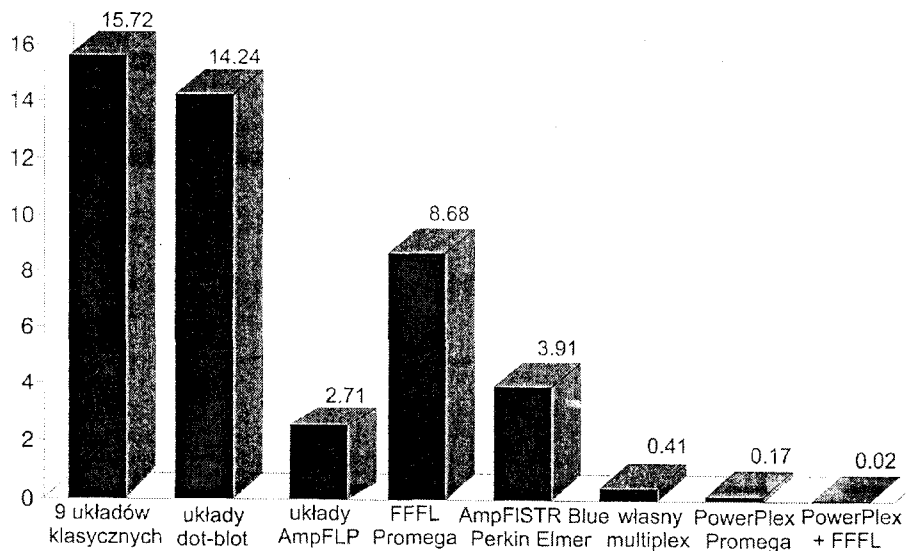
Dobór zestawu układów stosowanych do badań ojcostwa nie może być przypadkowy, lecz musi zapewniać maksymalny efekt przy minimalnym nakładzie pracy i – co się z tym wiąże – kosztów. Minimalizację nakładu pracy można uzyskać przez ujednoczenie procedur laboratoryjnych stosowanych podczas badań. Z tego punktu widzenia najmniej efektywny jest zestaw 9 układów klasycznych, bowiem podczas badań stosowane są różne procedury laboratoryjne, co wyklucza jednoczesowe badanie kilku układów, a ponadto efekt tych badań jest mało informatywny. Układy DNA wykrywane techniką dot-blot, tzn. DQA1 i PolyMarker zapewniają podobny efekt (0.8576 vs. 0.8428), przy mniejszym nakładzie pracy. Jeszcze lepszy wynik porównania uzyskujemy dla 4 układów DNA badanych techniką AmpFLP, tzn. D1S80, Apo B, Col 2A1 i YNZ22

(0.9729 vs. 0.8428), chociaż każdy z tych układów oznacza się osobno. Jednakże najlepsze wyniki w porównaniu uzyskano dla multipleksów STR (własny układ 5 loci – 0.9959, AmpFISTR Blue Perkin Elmer 3 loci – 0.9609, PowerPlex™ Promegi 8 loci – 0.9983, FFFL Promegi 4 loci – 0.9132, PowerPlex™ + FFFL – 0.9998).

Tabela III. Łączne przydatności układów.

Table III. Overall power of exclusion for different sets of systems.

Zestaw układów	Łączna przydatność
9 układów klasycznych (wg tab. I)	0.8428
Układy badane techniką dot-blot (PolyMarker + DQA1)	0.8576
Układy badane techniką AmpFLP (D1S80, Apo B, Col 2A1, YNZ22)	0.9729
AmpFISTR Blue (3 loci)	0.9609
Własny multipleks (D1S103, TH01, D21S11, D18S51, FGA)	0.9959
FFFL (4 loci)	0.9132
PowerPlex™ (8 loci)	0.9983
PowerPlex™ + FFFL	0.9998



Ryc. 1. Ilość nie wykluczonych niesłusznie pozwanych mężczyzn na 100 badanych przy zastosowaniu różnych metod badawczych.

Fig. 1. Number of non excluded man for 100 falsely accused individuals for different methods of surveys.

Powyższe wyniki wskazują wyraźnie na to, że dalsze stosowanie układów klasycznych jest nieuzasadnione zarówno z punktu widzenia siły dowodowej ekspertyzy, jak i ze strony nakładów pracy i środków niezbędnych dla wydania takiej opinii. Warto w tym miejscu zacytować Hochmeister'a i wsp., którzy już w 1992 roku podali, że: „wykorzystanie technologii konwencjonalnych powinno być całkowicie zastąpione” [10]. Celowym wydaje się zatem rozważenie, czy i w jaki sposób można zastąpić dotychczasową ekspertyzę I stopnia? Z matematycznego punktu widzenia jej najbliższymi odpowiednikami są zestawy badane techniką dot-blot (DQA1 i PolyMarker) i AmpFLP (D1S80, Apo B i Col 2A1). Jednakże wobec zdecydowanie większej przydatności układów multipleksowych wydaje się, że w bliskiej przyszłości właśnie układy multipleksowe staną się metodą w dochodzeniu ojcostwa. Wówczas też najprawdopodobniej zniknie dotychczasowy podział na badania I i II stopnia, bowiem wobec ogromnej przydatności tych układów przy niskim nakładzie pracy badania te będą mogły być uważane za rozstrzygające [1].

Poniżej przedstawiono listing programu pozwalającego obliczyć przydatność układu D1S80. Może być on zastosowany również dla dowolnego innego układu dyskretnego. W tym celu należy zmienić stałą ilość alleli (zawiera ilość alleli rozważanego układu w badanej populacji) oraz kolejnych komórek tablicy f (zawierających częstości kolejnych alleli rozważanego układu w badanej populacji).

Program power of exclusion;

```
uses crt;
const ilość_alleli=20;
var f: array [1..50] of real; {poszczególne komórki zawierają częstości alleli}
    u,v:integer;
    pe,pe1:real;
```

```
begin
clrscr;
```

```
f[ 1]:=0.1817;
f[ 2]:=0.0098;
f[ 3]:=0.0345;
f[ 4]:=0.0049;
f[ 5]:=0.0197;
f[ 6]:=0.0246;
f[ 7]:=0.3424;
f[ 8]:=0.0887;
```

```

f[ 9]:=0.0123;
f[10]:=0.0172;
f[11]:=0.0295;
f[12]:=0.0419;
f[13]:=0.0345;
f[14]:=0.0985;
f[15]:=0.0222;
f[16]:=0.0025;
f[17]:=0.0025;
f[18]:=0.0148;
f[19]:=0.0098;
f[20]:=0.0025;

pe:=0;
for u:=1 to ilość_alleli do pe:=pe+ (f[u] * sqr(1-f[u]));
pe1:=0;
for u:=1 to ilość_alleli do
for v:=1 to ilość_alleli do if u<>v then
pe1:= pe1 + (sqr(f[u]) * sqr(f[v]) * (4 - (3 * f[u]) - (3 * f[v])));
pe:=pe - (0.5 * pe1);

writeln('PE = ',pe:8:5);
end.

```

PIŚMIENNICTWO

1. Alford R.L., Hammond H.A., Coto I., Caskey C.T.: Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1994, 55, 190–195. –2. Alonso S., Castro A., Fernandez I., Gomez de Cedron M., Garcia–Orad A., Meyer E., Martinez de Pancorbo M.: Population study of 3 STR loci in the Basque Country (northern Spain). *Int. J. Legal Med.* 1995, 107, 239–245. –3. Brown C.M., Seber G.A.: Paternity testing 3: exclusion probabilities. *Am. J. Med. Genet.* 1987, 26, 157–166. –4. Buscemi L., Cucurachi N., Mencarelli R., Sisti B., Tagliabracci A., Ferrara S.D.: PCR typing of the locus D17S30 (YNZ22 VNTR) in an Italian population sample. *Int. J. Legal Med.* 1994, 106, 200–204. –5. Buscemi L., Cucurachi N., Mencarelli R., Tagliabracci A., Wiegand P., Ferrara S.D.: PCR analysis of the short tandem repeat (STR) system HUMVWA31. Allele and genotype frequencies in an Italian population sample. *Int. J. Legal Med.* 1995, 107, 171–173. –6. Cowland J.B., Madsen H.O., Morling N.: HLA–DQA1 typing in Danes by two polymerase chain reaction (PCR) based methods. *Forensic Sci. Int.* 1995, 73, 1–13. –7. Gjertson D.W., Mickey M.R., Terasaki P.I.: Empirical paternity exclusion rates. *Am. J. Forensic Med.*

Pathol. 1987, 8, 123–126. –8. Hansen H.E., Morling N.: Paternity testing with VNTR DNA systems. II. Evaluation of 271 cases of disputed paternity with the VNTR systems D2S44, D5S43, D7S21, D7S22, and D12S11. *Int. J. Legal Med.* 1993, 105, 197–202. –9. Helmuth R., Fildes N., Blake E., Luce M.C., Chimera J., Madej R., Gorodezky C., Stoneking M., Schmill N., Klitz W.: HLA-DQ alpha allele and genotype frequencies in various human populations, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. *Am. J. Hum. Genet.* 1990, 47, 515–523. –10. Hochmeister M., Borer U.V., Dirnhofer R.: Umstellung der Abstammungsbegutachtung auf DNA-Analyse. *Beitr. Gerichtl. Med.* 1992, 50, 89–94.

11. Janiszewska H.: Badania populacyjne fosfatazy fosfoglikolanowej w regionie bydgoskim. *Pol. Tyg. Lek.* 1985, 40, 1385–1387. –12. Janiszewska H., Miścicka-Śliwka D.: Polimorfizm glioksalazy I (GLO I, E.C. 4.4.1.5) w populacji regionu bydgoskiego. *Arch. Med. Sąd. i Krym.* 1984, 34, 251–255. –13. Janiszewska H., Miścicka-Śliwka D.: Polimorfizm kwaśnej fosfatazy krwinek czerwonych (AcP), Fosfoglukomutazy (PGM1), Kinazy adenylanowej (AK) i Esterazy D (Es D) w populacji okręgu bydgoskiego. *Prace Wydz. N. Przyr. Bydg. Tow. Nauk.* 1985, 28, 171–178. –14. Klintschar M., Kubat M.: A study of the short tandem repeat systems HUMVWA and HUMTH01 in an Austrian population sample. *Int. J. Legal Med.* 1995, 107, 329–330. –15. Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Grzybowski T., Woźniak M.: Population genetics of 14 STRs: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, F13A01, FESFPS, F13B, LPL, D3S1358, and FGA in the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Adv. Forens. Haemogenet.*, praca w druku. –16. Miścicka-Śliwka D., Grzybowski T., Woźniak M.: Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci. *Electrophoresis* 1997, 18, 1627–1632. –17. Miścicka-Śliwka D., Pleszyńska B.: Polimorfizm locus HLA DQA1 w populacji regionu pomorsko-kujawskiego. *Post. Med. Sąd. i Krym.* 1996, 3, 315–318. –18. Miścicka-Śliwka D., Pleszyńska B., Śliwka K., Grzybowski T., Berent J.A.: Allele frequencies of LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and GC in the Polish population. w: Prax J.Y., Marc B. (eds.): 5th Cross-Channel Conference on Forensic Medicine on CD-ROM. Coreedge Editions Electroniques, Paris 1995, pp. 488–494. –19. Miścicka-Śliwka D., Syroczyńska A., Śliwka K., Berent J.A.: Investigation of D1S80 VNTR locus in Polish population. W: P. Mangin, B. Ludes (eds.): *Acta Medicinæ Legalis*, Vol. XLIV 1994, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1995, pp. 72–73. –20. Nata M., Yokoi T., Aoki Y., Sagisaka K., Hiraiwa K., Takatori T.: Paternity test with single locus DNA probes. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1991, 45, 138–145.

21. Pawłowski R., Janowicz A.: Genetyka populacyjna układu typu VNTR – Apo B w populacji Polski północnej. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1996, 46, 93–99. –22. Pestoni C., Munoz I., Comesana M., Fernandez-Falcon A., Garcia-Rivero A., Rodriguez-Calvo M.S.: Distribution of the AMPFLPs YNZ22, 3'APOB and COL2A1 in the population of Galicia (NW Spain). *Forensic Sci. Int.* 1996, 80, 175–188. –23. Szczotka H.: Prawdopodobieństwo ojcostwa oparte na teoretycznej funkcji dyskryminacyjnej układów grupowych krwi. *Mat. i Prace*

Antrop. 1984, 105, 7-30. -24. Szczotka H., Schlesinger D.: Tablice do obliczania prawdopodobieństwa ojcostwa w populacji polskiej. Mat. i Prace Antrop. 1980, 98, 3-52. -25. Weir B.C: Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sutherland, Massachusetts 1996, pp.209-211.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy,
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9,
85-094 Bydgoszcz,
tel./fax (0-52) 341 12 49