|  |
| --- |
|  |
| "Использование индивидуальных систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства. Методические указания N 98/253"(утв. Минздравом России 19.01.1999) |
|   |

Утверждаю

Заместитель Министра

здравоохранения

Российской Федерации

А.И.ВЯЛКОВ

19 января 1999 года

Согласовано

Руководитель Департамента

научно-исследовательских

и образовательных

медицинских учреждений

В.И.СЕРГИЕНКО

18 января 1999 года

Руководитель Департамента

организации медицинской

помощи населению

А.А.КАРПЕЕВ

11 января 1999 года

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ

ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ (ПДАФ) ДНК

В СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ

И УСТАНОВЛЕНИЯ РОДСТВА

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

N 98/253

Методические указания посвящены регламентированию в рамках экспертного подхода методических и аналитических процедур, сопряженных с анализом полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) в аллельных профилях гипервариабельных локусов хромосомной ДНК человека, а также общей методологии использования индивидуализирующих ПДАФ-систем при решении задач судебно-медицинской экспертизы. Обобщен и проанализирован накопленный практический опыт, касающийся производства судебно-медицинской экспертизы (исследования) вещественных доказательств с помощью применения методов молекулярно-генетической индивидуализации человека, и в частности - методов идентификации личности и определения биологического родства, основанных на использовании феномена ПДАФ.

Настоящие Методические указания касаются общих принципов экспертного использования молекулярно-генетических индивидуализирующих систем на основе феномена ПДАФ. Для более детальной проработки конкретных вопросов практического применения метода следует обратиться к другим нормативным, инструктивным и методическим документам, регламентирующим производство экспертиз в Российской Федерации, в частности, к "Правилам производства судебно-медицинской экспертизы (исследования) вещественных доказательств с помощью применения методов молекулярно-генетической индивидуализации человека" (РЦСМЭ МЗ РФ, 1998), "Стандартным операционным процедурам" (РЦСМЭ МЗ РФ, 1998) и др.

Методические указания подготовлены зав. отделом судебно-медицинских генетических научных и экспертных исследований Республиканского центра судебно-медицинской экспертизы доктором биологических наук Ивановым П.Л.

Введение

Существует несколько базовых технологий молекулярно-генетического (геномного) идентификационного анализа, применяемых в судебно-медицинской экспертной практике. Общим для них является исследование особых, так называемых гипервариабельных участков геномной ДНК человека, которые строго специфичны для каждого индивидуума и потому могут служить индивидуализирующими личность признаками.

Вариант молекулярно-генетического идентификационного анализа, в основе которого лежит феномен полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК, является одним из наиболее перспективных в плане судебно-медицинского исследования вещественных доказательств. Он отличается высокой дифференцирующей способностью - благодаря использованию в качестве маркерных (диагностических) элементов высокополиморфных генетических локусов мини- и микросателлитной природы, а также чрезвычайно высокой чувствительностью - благодаря применению процесса энзиматической амплификации молекул ДНК, известному как полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Феномен ПДАФ проявляется в том, что в случае ПЦР-амплификации гипервариабельных мини- и микросателлитных генетических матриц (локусов), присутствующих в геноме каждого человека, в ходе реакции образуются фрагменты ДНК, которые у разных людей имеют разную длину - и потому оказываются индивидуально специфичными. Эти полиморфные по длине фрагменты, по сути представляющие разные аллельные варианты полиморфных локусов геномной ДНК, становятся доступными для сравнительного анализа в качестве индивидуализирующих личность признаков. Важно отметить, что в ряду поколений каждый вариант ПДАФ наследуется как простой менделевский кодоминантный признак. Все это создает прекрасные предпосылки для решения экспертных задач, связанных как с индивидуализацией и идентификацией, так и с установлением биологических родственных связей данного индивидуума с другими лицами (например, установление фактов отцовства или материнства).

ПДАФ-типирование ДНК является одним из наиболее доказательных методов анализа биологического материала при производстве судебно-медицинской идентификационной экспертизы. В то же время, следует подчеркнуть, что экспертные исследования биологических объектов с использованием индивидуализирующих систем ПДАФ-типа предъявляют очень высокие требования как к техническому обеспечению анализа, так и к степени корректности экспериментальных процедур и интерпретационных построений. Наряду с бесспорными преимуществами по сравнению с традиционными методами, экспертное применение анализа ПДАФ в судебно-медицинской практике сопряжено с целым рядом осложняющих моментов. Технология анализа включает многостадийные операции и многопараметрические процессы, которые таят в себе опасность различного рода артефактов. Интерпретация получаемых в ходе исследования данных часто достаточно сложна и требует детального анализа с позиции молекулярной биологии и популяционной генетики. Учитывая же характерное для данного вида экспертизы высокое доказательственное значение выводов, возможная неадекватность экспериментальных процедур и неправильное истолкование результата чреваты серьезными экспертными и, как результат, судебно-следственными ошибками.

Из всего сказанного очевидно, что для обеспечения надлежащего уровня надежности и доказательности необходима строгая методическая регламентация судебно-медицинских экспертиз вещественных доказательств, проводимых с помощью применения методов молекулярно-генетической индивидуализации человека. В рамках этой задачи в настоящих Методических указаниях изложены общие принципы экспертного использования молекулярно-генетических индивидуализирующих систем на основе феномена ПДАФ для целей идентификации личности и разрешения вопросов спорного происхождения детей. Рассмотрены принципиальные вопросы, касающиеся специфики лабораторных процедур и интерпретации экспертных данных, а также методические приемы, призванные повысить надежность анализа.

Описание метода

1. Формула метода

Предложен метод судебно-медицинской экспертизы (исследования) вещественных доказательств биологической природы, основанный на молекулярно-генетической индивидуализации человека. Принцип метода заключается в использовании индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) хромосомной ДНК.

В общем виде метод предусматривает выделение из исследуемых объектов хромосомной ДНК, энзиматическую амплификацию с помощью ПЦР мини- и микросателлитных локусов этой ДНК, которые в силу своей природы обладают свойством индивидуальной специфичности, и сопоставление полученных индивидуальных картин распределения по длине амплифицированных фрагментов ДНК (так называемых амплификационных профилей) с целью их отождествления или выявления сходства и различий и установления на этом основании определенных фактов в плане судебно-медицинской идентификации личности и определения биологического родства.

2. Материально-техническое обеспечение метода

2.1. Требования к помещениям

Судебно-медицинская экспертиза вещественных доказательств с помощью применения индивидуализирующих систем ПДАФ-типа должна проводиться только в специализированной лаборатории бюро судебно-медицинской экспертизы, удовлетворяющей требованиям "Положения о лаборатории молекулярно-генетических исследований бюро судебно-медицинской экспертизы" (приложение к Приказу Минздрава РФ N 131 от 22.04.98 "О мерах по совершенствованию судебно-медицинской службы в Российской Федерации").

Главным требованием является обеспечение и строгое соблюдение принципа компартментализации основных стадий производственного процесса. Это означает, что в лаборатории должны быть выделены территориально автономные операционные зоны (компартменты), каждая из которых предназначена для выполнения строго определенного круга операций. Каждая зона должна быть укомплектована спецодеждой, лабораторным и офисным оборудованием, посудой, которые предназначены для использования только в границах данной зоны. Таких зон минимум три:

а) лабораторная зона общего назначения: помещения для хранения и препарирования вещественных доказательств, забора крови, выделения и очистки ДНК, мойки и стерилизации посуды; к этой зоне относятся кабинеты экспертов, лаборантские и санитарские помещения, компьютерный зал для обработки данных и оформления документов, аппаратные;

б) чистая зона ПЦР: стерильные, оборудованные УФ-облучателями боксированные помещения с приточно-нагнетательной вентиляцией - для приготовления реагентов, компонентов реакционных смесей, для пробоподготовки и постановки ПЦР;

в) зона для анализа продуктов амплификации: оборудованные УФ-облучателями боксированные помещения с вытяжной вентиляцией - для проведения электрофореза ДНК, окрашивания гелей и документирования электрофореграмм.

Компартментализация рабочего процесса, связанного с применением ПЦР, служит абсолютно необходимой мерой предосторожности, которая позволяет свести к минимуму риск случайных загрязнений компонентов реакции ранее амплифицированными продуктами или молекулами ДНК из посторонних источников. Способность ПЦР амплифицировать единичные молекулы ДНК означает, что опасность представляют даже самые незначительные, следовые количества ДНК-контаминантов, которые могут вовлекаться в реакцию как матричные молекулы. Это приводит к искажению результатов исследования.

2.2. Необходимое оборудование

В соответствии с процедурой метода на первом этапе осуществляется выделение из исследуемых объектов геномной ДНК, ее очистка, определение концентрации и хранение. Для этого необходимо типовое лабораторное оборудование для молекулярной биологии (в том числе: вытяжной шкаф, мини- и микроцентрифуга, суховоздушный и водяной термостаты, рн-метр, аквадистиллятор-деионизатор, спектрофотометр, аналитические весы, микропипетки-дозаторы, лабораторная посуда, холодильник/морозильник).

Постановка ПЦР требует наличия стерильного шкафа-бокса с ультрафиолетовым облучателем, а также термоциклера (ДНК-амплификатора). Эти позиции выпускаются серийно отечественными и зарубежными производителями.

На этапе электрофоретического фракционирования ДНК необходимы стандартные аппараты для электрофореза в гелях агарозы и полиакриламида (соответственно, горизонтальные и вертикальные), микроволновая печь, стандартные источники тока для электрофореза - низковольтный (300 в/250 mA) и высоковольтный (1000 в/300 mA), УФ-трансиллюминатор, снабженный системой документирования изображения (напр. фото- или видеокамерой) или/и прибор для вакуумной сушки гелей.

Для анализа результатов исследования и обработки экспертных данных требуется набор стандартной офисной оргтехники (компьютер с периферийными устройствами: принтер, сканер и проч.).

3. Технология использования метода

Технологическая схема выполнения экспертизы вещественных доказательств с использованием ПДАФ-систем включает следующие этапы:

а) получение препаратов хромосомной ДНК из объектов исследования;

б) энзиматическая ПЦР-амплификация на матрице этой ДНК специфических участков, обладающих свойством ПДАФ с целью их последующего генотипирования (определения геномных вариантов);

в) фрагментный анализ: фракционирование с помощью гель-электрофореза продуктов амплификации, сопоставление амплификационных профилей, определение молекулярных размеров фрагментов и их генотипирование;

г) интерпретация результатов: раздельная оценка выявленных геномных признаков и определение их индивидуализирующего значения, сопоставление и оценка различия и совпадения комплекса признаков, анализ всей совокупности экспертных данных с целью разрешения вопросов, поставленных перед экспертизой.

3.1. Получение препаратов ДНК

Предметом судебно-медицинских молекулярно-генетических экспертных исследований являются следы и иные вещественные доказательства по делу - объекты биологического происхождения от трупов и живых лиц. Хромосомная ДНК содержится во всех ядерных клетках организма, поэтому для экспертного исследования в принципе пригодны любые биологические субстраты, в которых сохранились хотя бы единичные ядерные клетки или остатки их ядерного материала: мягкие ткани, жидкая кровь и выделения, высохшие следы крови и выделений, зубы и волосы человека, отчлененные части тела и фрагменты частей тела от неопознанных и расчлененных трупов, фрагменты скелетированных трупов, отдельные кости, костные фрагменты и др. При этом важно подчеркнуть, что во всех клетках одного организма ДНК одинакова. Это позволяет проводить отождествление объектов на основании сравнительного ПДАФ-анализа биологических образцов разного тканевого происхождения.

С точки зрения экспертного использования, среди множества известных методик выделения и очистки ДНК наибольшее значение имеет классическая фенол-хлороформная экстракция, которая универсальна, обладает хорошей воспроизводимостью и способна обеспечить высокую степень чистоты ДНК; полученные этим методом препараты стабильны и могут храниться при +4 °С в течение нескольких лет. Поэтому методикам выделения ДНК, основанным на органической экстракции, следует отдать предпочтение.

В общем случае, это многоэтапные процедуры, которые предусматривают разрушение (лизис) клеточных структур и диссоциацию хромосомных нуклеопротеидных комплексов с помощью применения детергентов, протеазную обработку лизата, экстрагирование белков органическими растворителями, отделение водной фазы, содержащей ДНК, и концентрирование и очистку ДНК путем спиртовой преципитации или ультрамикрофильтрации.

Существуют также методики, которые без применения органических растворителей позволяют получать пригодные для анализа в ПЦР препараты ДНК. Большинство из них являются вариантами вышеприведенной схемы, но позволяют экономить время и не прибегать к трудоемкой процедуре фенольной экстракции. Однако эти процедуры применимы лишь для некоторых видов объектов. Наиболее распространенным универсальным неорганическим методом, пригодным для экспертного применения, является метод с использованием хелатирующего реагента "Килекс" (Chelex(R) 100). Это экспресс-метод, который вообще не предполагает выделения ДНК в очищенном виде; получаемый препарат по сути представляет клеточный лизат, который содержит все исходные компоненты, только в инактивированной форме. Этот метод прост и не требует много времени. Нужно однако учитывать, что его надежность, а также качество и стабильность "килексных" препаратов в целом заметно ниже, чем фенол-хлороформных экстрактов.

Очень важный в экспертной практике частный случай - это получение ДНК из спермы и смешанных следов, содержащих сперму. Особенность здесь в том, что хроматин сперматозоидов имеет принципиальное отличие от хроматина соматических клеток - его структура дополнительно стабилизирована дисульфидными связями. Поэтому применяемый по стандартной процедуре выделения ДНК протеолиз в случае спермального хроматина малоэффективен и идет очень медленно, а используемые для диссоциации нуклеопротеинов детергенты практически не оказывают на него солюбилизирующего действия. В результате выход спермальной ДНК оказывается практически нулевым. Для преодоления этой трудности при выделении ДНК из спермы в клеточный лизат вводят дополнительно реагенты-тиовосстановители, например дитиотрейтол или 2-меркаптоэтанол, которые разрушают дисульфидные белковые сшивки. Это позволяет продолжить процесс по стандартной схеме.

На использовании описанной особенности спермального хроматина основан общепринятый метод селективного выделения ДНК сперматозоидов из смешанных следов, содержащих сперму. Это двухэтапная процедура, получившая название дифференциального лизиса клеток. Суть ее заключается в том, что при выделении ДНК из смеси сперматозоидов и соматических клеток на первом этапе, представляющем собой стандартный протеазно-детергентный лизис, солюбилизируется только хроматин соматических клеток. Его раствор отделяют центрифугированием от остающегося структурированным (и потому нерастворимым) спермального хроматина и используют для экстрагирования соматической ДНК. Отделенный же спермальный хроматин подвергают второму литическому циклу, но уже с добавлением реагентов-тиовосстановителей, и уже потом из получившегося лизата экстрагируют спермальную ДНК.

Следует особо подчеркнуть, что при проведении судебно-медицинского исследования следов, содержащих сперму, для дифференцирования присутствующих в смеси генетического материала мужчины - донора спермы и ДНК из других возможных источников (например, эпителиальных клеток и клеток крови потерпевших при изнасиловании), в обязательном порядке должны применяться только такие методики, которые включают двухэтапный дифференциальный лизис клеток с использованием на втором этапе реагентов-тиовосстановителей.

Типовые варианты методик получения препаратов ДНК из объектов экспертизы - как с использованием органической экстракции, так и в виде "килексных" лизатов, приведены в сборнике "Стандартные операционные процедуры" (РЦСМЭ МЗ РФ, 1998 г.).

3.2. ПЦР-амплификация полиморфных локусов

на матрице геномной ДНК

При постановке ПЦР геномную ДНК, обычно в количестве 2 - 200 нг, вводят в реакционную смесь, содержащую все необходимые компоненты для работы фермента - термостабильной ДНК-полимеразы (обычно Taq полимеразы в количестве 1 - 3 е.а.). Там хромосомная ДНК будет служить субстратом-матрицей для амплификации нужного локуса. Специфическим компонентом реакции и амплификационной индивидуализирующей системы в целом являются олигонуклеотидные (15 - 30 звеньев) праймеры - именно они определяют, какой генетический локус будет избирательно нарабатываться в ходе реакции. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез новых полинуклеотидных цепей с помощью ДНК-полимеразы осуществляется только между ними, удваивая в каждом цикле количество копий этого участка ДНК. Для проведения полимеразной цепной реакции, кроме исходного препарата ДНК, праймеров (в концентрации 0,1 - 1 мкМ), Taq полимеразы, нужны еще так называемые предшественники ДНК - дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дезоксинуклеотиды) в концентрации 200 мкМ и солевой буферный раствор. Эти компоненты смешивают в реакционной пробирке в микрообъеме (обычно 25 - 100 мкл) и помещают в специальный прибор - программируемый термоциклер (ДНК-амплификатор), который обеспечивает необходимый температурный профиль реакции: она претерпевает 25 - 35 циклов нагрева и охлаждения в интервале температур от 50 до 95 °С.

Параметры температурного профиля - продолжительность и температура каждой стадии полимеразной реакции зависят от структуры используемых праймеров и потому индивидуальны для каждой конкретной амплификационной индивидуализирующей системы.

Весь процесс длится несколько часов. За время процесса интересующие последовательности ДНК, присутствующие в исходной геномной матрице, многократно (миллионократно) копируются ферментом Taq полимеразой, и эти молекулярные копии накапливаются в реакционной смеси.

Амплифицируемые в ходе ПЦР мини- и микросателлитные участки (локусы) ДНК - это относительно короткие нуклеотидные последовательности, организованные в виде блоков тандемных повторов. Высокий уровень вариабельности (феномен гиперполиморфизма) микро- и минисателлитов основан на том, что число тандемных повторов, соединенных "голова к хвосту" в единую последовательность ДНК непостоянно и варьируется в разных аллелях данного локуса от одного до нескольких десятков. Таким образом, для данного локуса в популяции обнаруживается целый набор аллелей (феномен мультиаллельности), отличающихся друг от друга по числу повторяющихся единиц. У каждого индивидуума в популяции имеется из этого набора по 2 аллеля, и они могут быть равной или разной длины (соответственно гомозиготное и гетерозиготное состояния). Такого рода генетические элементы получили название локусов с варьирующимся числом тандемных повторов или просто тандемных повторов с переменным числом звеньев.

В методическом плане важно отметить, что класс тандемных полиморфных локусов условно разбит на два подкласса: минисателлитов или VNTR (англ. - Variable Number Tandem Repeat) - с длиной повтора более семи пар нуклеотидов и микросателлитов, у которых длина повторяющейся единицы составляет от одного до семи пар нуклеотидов и которые еще называют короткими тандемными повторами или STR (англ. - short tandem repeat). Эти две группы ПДАФ-систем, хотя и являются функциональными аналогами, не вполне эквивалентны по своим прикладным свойствам; в аспекте судебно-медицинской экспертизы их следует рассматривать как взаимодополняющие. Суть их особенностей в следующем.

Минисателлитные системы в своем большинстве обладают гораздо более высоким полиморфизмом, чем микросателлитные. Соответственно, их дифференцирующие свойства также заметно выше. Однако существенные ограничения накладываются на ПДАФ-анализ минисателлитных локусов при исследовании деградированных препаратов ДНК, например выделенных из пятен крови, спермы, слюны, а также частей волосяного покрова и трупного материала, подвергшихся разложению под действием разрушающих биологических или физико-химических факторов. При анализе подобных препаратов может наблюдаться отсутствие электрофоретических полос в аллельном диапазоне, что, как правило, свидетельствует о деградации аллелей анализируемого локуса. Если же при анализе деградированного образца ДНК обнаруживается только один низкомолекулярный аллель, то в этом случае существует опасность ложной гомозиготности: возможно, анализируемый образец является гетерозиготным, но высокомолекулярный аллель не выявляется в ходе исследования, поскольку степень его деградации оказывается более высокой.

С этой точки зрения ПДАФ-типирование микросателлитных, STR-локусов может дать определенные преимущества. Так, благодаря более коротким по сравнению с минисателлитными размерам STR-аллелей, в целом выше вероятность их сохранения в деградированной ДНК. На практике это означает ощутимый выигрыш в чувствительности анализа. Кроме того, вероятность ложной гомозиготности, обусловленной предпочтительной амплификацией низкомолекулярных аллелей, крайне низка для микросателлитных локусов вследствие узости спектра аллельных длин.

В настоящее время для экспертных целей разработано несколько десятков молекулярно-генетических ПДАФ-систем на основе мини- и микросателлитных полиморфных локусов. Следует иметь в виду, что в случае микросателлитов согласно международной практике для экспертного применения подходят только "крупные" - тетра- и пентануклеотидные STR.

3.3. Фрагментный анализ. Позиционное сопоставление

амплификационных геномных профилей

Гипервариабельные тандемно организованные локусы содержат различное число повторяющихся элементарных звеньев-повторов. При амплификации с праймерами, расположенными на флангах такого локуса, образуются фрагменты ДНК различной длины, причем длина фрагмента будет пропорциональна числу повторов. Таким образом, в данной аналитической системе любой индивидуальный образец ДНК человека характеризуется наличием двух амплифицированных фрагментов разной или одинаковой длины (соответственно, гетерозиготное и гомозиготное состояние), поскольку каждая из двух гомологичных хромосом несет свой вариант гипервариабельного локуса, и эти варианты могут отличаться числом содержащихся в них тандемных повторов.

Синтезированные в ходе ПЦР продукты - молекулярные копии полиморфных участков геномной ДНК накапливаются в реакционной смеси, вследствие чего количественно оказываются доступными для сравнительного анализа. Для этого полученные амплификационные продукты фракционируют по длине с помощью электрофореза в геле агарозы или полиакриламида (в последнем случае применяют как обычный электрофорез, так и электрофорез в денатурирующих условиях) и фрагменты ДНК, амплифицированные в ходе реакции, выявляют, используя различные методы детекции. Чаще всего на электрофореграмме визуализируют полосы (зоны локализации фрагментов ДНК одного размера) с помощью флуоресцентного красителя этидиумбромида и затем регистрируют фотографически в УФ-свете или путем окрашивания нитратом серебра (в акриламидных гелях) с последующей фиксацией и высушиванием геля.

Индивидуальность ДНК реализуется в виде индивидуально-специфичной комбинации из двух полиморфных фрагментов (полос на электрофореграмме), характеризующихся определенным расположением на дорожке геля. Это так называемый амплификационный профиль ДНК, который и является в данном случае индивидуализирующей геномной характеристикой человека, которому принадлежит анализируемая ДНК. Для целей отождествления амплификационных профилей ДНК или выявления в них признаков сходства и различий проводят их позиционное сопоставление.

При анализе электрофореграммы можно выделить два аспекта:

а) картины распределения полос на сравниваемых дорожках геля похожи или непохожи;

б) позиции соответствующих фрагментов совпадают или не совпадают.

Вопрос о том, одинаковы или неодинаковы амплификационные профили, полученные при анализе препаратов ДНК, выделенных из объектов экспертизы (скажем, из биологических следов на вещественных доказательствах и из крови проходящих по делу лиц), является в экспертизе ключевым. Это ясно, поскольку от того, как будет интерпретирован результат сравнения, зависит экспертный вывод: в одном случае это не исключение, а в другом - исключение причастности данного лица к происхождению следов. Между тем, именно вопрос о похожести и непохожести геномных профилей таит в себе большую опасность неверного решения из-за множества имеющихся здесь подводных камней. Некоторые из них мы и рассмотрим в этом разделе.

3.3.1. Ложное генотипирование

Что касается общей похожести одного геномного профиля на другой, то здесь ложный результат может быть обусловлен двумя причинами. Во-первых, присутствие в сравниваемых препаратах ДНК постороннего генетического материала (чаще всего - в результате случайных загрязнений) может имитировать как совпадение, так и различие их геномных профилей. Во-вторых, этот же эффект может проявиться как результат неправильного генотипирования, в частности - ложноопределенной гомо- или гетерозиготности анализируемых объектов. Это связано с артефактами полимеразной цепной реакции, возникающими под влиянием неоптимальных условий ее проведения:

- избыточным или недостаточным исходным количеством матричной ДНК;

- плохим качеством препарата;

- неспецифичностью праймеров и (или) неадекватно подобранным для них рабочим режимом, например, отжигом при более низкой, чем следует, температуре;

- неоптимальной концентрацией Taq полимеразы в реакционной смеси, в частности, ее избыточным количеством;

- присутствием в реакции неоптимальной концентрации ионов Mg2+;

- профилем кривой нагрева реакционной смеси с неоптимальными значениями температурных переходов (это может быть вызвано неудачными техническими параметрами прибора, используемого для амплификации ДНК);

- неоптимальной продолжительностью процесса циклического наращивания.

Наиболее распространенный артефакт - так называемый феномен предпочтительной амплификации аллелей довольно часто приводит к ошибочному заключению о гомозиготности. Вместе с тем, наряду с опасностью типирования ложных гомозигот нередки и более сложные случаи искажения генотипа, характеризующиеся не только частичной утратой истинных аллелей, но амплификацией неспецифических (неаллельных) фрагментов, имитирующих ложно-гетерозиготный аллельный профиль. Решить проблему ложноопределенной гомо- или гетерозиготности в некоторых случаях бывает весьма непросто. Помочь здесь может анализ устойчивости амплификационных профилей, основанный на амплификационном титровании сомнительных препаратов, использовании разных условий электрофореза и сред разделения, а также многократная проверка воспроизводимости результата.

3.3.2. Сдвиг полос

Второй аспект вопроса - физическое сопоставление полос на электрофореграмме - также требует учета многих факторов. Одна из неприятностей здесь - так называемый сдвиг полос, когда в процессе электрофореза фрагменты ДНК в одной дорожке геля движутся быстрее или медленнее, чем идентичные фрагменты в соседней дорожке. Это явление имеет несколько причин:

- неодинаковое количество ДНК в разных дорожках геля;

- неодинаковые ионные условия в препаратах, внесенных в разные дорожки геля (присутствие в препаратах примесей, влияющих на электрофоретическую подвижность ДНК - солей, спирта, фенола этидиумбромида и др.);

- избыточная напряженность электрического поля;

- перегрев и нарушение структуры геля (избыточный ток);

- истощение электрофорезного буфера;

- микрогетерогенность геля (в частности, недостаточно высокое качество среды разделения).

Большая часть перечисленных факторов поддается контролю, поэтому решением проблемы может быть оптимизация и текущий мониторинг соответствующих параметров.

В некоторых случаях сдвиг полос носит не ступенчатый, а сглаженный характер (например, хорошо известный эффект "улыбки"). Тогда возникающие геометрические искажения электрофоретической картины в принципе поддаются математическому анализу и могут быть скомпенсированы на стадии обработки изображения. Для этого рекомендуется кроме фланкирующих дорожек также и каждую третью-четвертую дорожку геля делать референтной, то есть вносить в нее маркеры молекулярных масс, по которым будет рассчитываться фактор коррекции. Следует однако сказать, что надежная математическая коррекция возможна не всегда и электрофорез по возможности следует повторить.

3.3.3. Разрешающая способность электрофореза

Еще один очень важный момент, о котором следует помнить при позиционном сопоставлении полос на электрофореграмме - это разрешающая способность используемой электрофоретической системы. Оценка этого параметра имеет принципиальное значение для решения вопроса о самой возможности адекватного сравнения амплификационных профилей. Для того, чтобы иметь такую возможность, необходимо быть уверенным, что применяемая для фракционирования амплифицированных фрагментов ДНК аналитическая система позволяет уверенно различать аллельные варианты, отличающиеся по длине как минимум на одно повторяющееся звено. Иначе, можно ошибочно посчитать идентичными те фрагменты, которые имеют близкую, но не одинаковую длину.

Для разделения аллелей применяемых на практике локусов с варьирующимся числом тандемных повторов, таких как STR-локусов (длина повторяющейся последовательности 2 - 4 п.н.) и VNTR-локусов с коротким шагом (в частности, минисателлитного локуса D1S80, где длина повторяющейся последовательности составляет 16 п.н.), необходимо иметь возможность различать фрагменты ДНК, которые отличаются по длине на 1 - 2% (и даже меньше в случае коротких тандемных повторов). Это справедливо и в случае электрофоретического фракционирования половых гетероформ амелогенинового гена, где надежность разделения дублета XY (106/112 п.н.) имеет принципиальное значение для использования данного теста.

Обеспечить такое разрешение способна не всякая электрофоретическая система. В первую очередь этим обусловлены высокие требования, предъявляемые к электрофоретическим средам разделения. В современном анализе ДНК применяются агарозные и полиакриламидные гели.

Если говорить об агарозных гелях, то они безусловно являются наиболее удобными и технологичными системами для электрофоретического анализа ДНК: с ними легко манипулировать и они не обладают присущим акриламиду нейротоксическим действием. Кроме того, стандартные нативные гели агарозы в гораздо меньшей степени, чем полиакриламидные среды, чувствительны к случайным флуктуациям в макроструктуре молекул ДНК и потому менее склонны к определенным, связанным с этим артефактам, которые могут приводить к позиционным искажениям в анализируемом геномном профиле и как следствие - к ошибкам при идентификации аллелей. Однако следует помнить, что разделяющая способность обычных агарозных гелей в отношении фрагментов ДНК малого размера намного ниже, чем у полиакриламидных, и потому они непригодны для фрагментного анализа STR-локусов и даже некоторых VNTR-локусов с коротким шагом. В этих случаях следует использовать специальные агарозные среды, такие как модифицированные агарозы семейства NuSieve(R) и MetaPhor(R) фирмы FMC Bio Products (США) или аналогичные им продукты других фирм.

Акриламидные гели могут применяться как нативные, так и денатурирующие. Каждая из этих систем имеет ряд особенностей. Из принципиальных моментов отметим, что интерпретация электрофореграмм, полученных в денатурирующих условиях, может осложняться эффектом "разделения цепей", когда индивидуальные фрагменты ДНК в геле оказываются представленными двумя полосами. Что касается нативных полиакриламидных гелей, то в целом это системы с нехарактерными для агарозы электрофоретическими свойствами: они гораздо более чувствительны к пространствено-конформационным параметрам молекул ДНК. Поэтому в этих гелях электрофоретическое поведение фрагментов ДНК довольно сильно зависит от их нуклеотидного состава, что может проявляться в так называемом эффекте аномальной электрофоретической подвижности и вызывать определенные геометрические искажения амплификационного профиля, в частности - позиционные несоответствия, касающиеся наблюдаемых и реальных размеров фрагментов.

На практике разрешение электрофореза нужно обязательно контролировать, например, визуально - используя наборы локус-специфичных аллельных маркеров (аллельных "лестниц"), или с помощью компьютерных программных средств, используя внутренние или внешние маркеры молекулярных масс.

3.3.4. Измерение электрофоретической подвижности фрагментов ДНК

Из сказанного выше очевидно, что вопрос позиционного совпадения или несовпадения амплифицированных фрагментов ДНК в сравниваемых геномных профилях (по сути - вопрос их тождественности или отличия) не может быть адекватно решен "на глазок". И прежде всего потому, что при таком способе оценки трудно учесть все действующие факторы в их совокупности, а именно это влияет на результат. Так например, при невысоком электрофоретическом разрешении можно ошибочно отождествить заведомо разные фрагменты, поскольку их позиции совпадут на электрофореграмме. В более сложных случаях, в сочетании с выраженным эффектом сдвига полос, недостаточное разрешение электрофореза может привести к тому, что наоборот, заведомо одинаковые фрагменты будут иметь разные позиции на геле и восприниматься как разные аллели.

Поэтому, строго говоря, вопрос позиционного совпадения или несовпадения фрагментов ДНК должен решаться аналитическим путем - на том основании, что позиции сравниваемых фрагментов попадают или же не попадают в интервалы, удовлетворяющие установленным допускам. Очевидно, что такой подход в первую очередь требует выполнения физических измерений на электрофореграмме и учета их неизбежных неточностей.

Существует множество методов, позволяющих проводить измерение электрофоретической подвижности фрагментов ДНК на геле. При этом определенные ограничения на применимость того или иного метода накладывают погрешности измерений.

Так, наиболее простой, но и наименее точный способ - измерение обычной линейкой. Однако он оказывается неприемлемым для относительно коротких агарозных гелей, когда цена деления мерной шкалы легко "вмещает" разницу в подвижности двух соседних аллелей. Более или менее универсальный вариант - это так называемый дигитайзер (англ. digitizer), представляющий собой электронный модуль, включающий курсор-измеритель и цифровое координатное устройство. Такой модуль может использоваться как самостоятельный прибор или в качестве составной части компьютерных систем обработки изображения. Наивысшую надежность и точность измерений обеспечивают компьютеризованные регистрирующие системы, снабженные соответствующими программными средствами.

В качестве примера можно рекомендовать компьютеризованную систему TVID-DATAPHOR, разработанную и внедренную в 1993 г. в Бюро Главной судебно-медицинской экспертизы МЗ РФ. При помощи видеокамеры данная система позволяет получать и хранить в памяти компьютера оцифрованное изображение окрашенного геля. Программные средства позволяют эксперту осуществить контроль электрофоретического разрешения, провести анализ распределения материала в полосе на электрофореграмме и двумерное измерение пробега в геле, а затем определить размеры фрагментов ДНК с использованием нескольких алгоритмов. Предусмотрена также возможность коррекции электрофоретической неоднородности геля. Программа-дигитайзер имеет координатную систему с ценой деления в 1 пиксель, что обеспечивает точность измерений в реальном масштабе в пределах +/- 0,1 мм.

3.3.5. Позиционные критерии сопоставления геномных профилей

В плане решения ключевого вопроса - позиционного совпадения или несовпадения фрагментов ДНК, оценка величины физической погрешности, используемой экспертом аналитической системы, позволяет установить для данной системы соответствующие объективные правила позиционного сопоставления амплификационных профилей.

Рассуждая чисто теоретически, обобщенные требования для аналитической системы просты, а именно: позиции на геле разных аллельных фрагментов не должны совпадать, а одинаковых - различаться. Однако не следует забывать, что физическая погрешность используемых на практике аналитических систем - реальная величина, и потому позиции идентичных фрагментов на геле могут несколько различаться. Это может привести к неоднозначному истолкованию результата. Чтобы избежать интерпретационных ошибок, надо руководствоваться следующими критериями оценки:

- два фрагмента ДНК считать тождественными друг другу - если их позиции на геле не отличаются более чем на удвоенную величину физической погрешности системы при условии, что разрешение электрофореза в этой точке достаточно, чтобы величина физической погрешности была меньше 1/4 длины аллельного шага на минимально измеряемую величину;

- два фрагмента ДНК нетождественны - если при том же условии их позиции на геле отличаются более чем на удвоенную величину физической погрешности.

3.3.6. Определение размера и генотипирование фрагментов

Для индивидуализирующих ПДАФ-систем, которые основаны на использовании полиморфных локусов с дискретным распределением аллелей, применение локус-специфичных аллельных маркеров (аллельных "лестниц") позволяет относительно просто осуществлять генотипирование аллельных профилей и при условии, что в каждом эксперименте были соблюдены необходимые позиционные критерии сопоставления полос (см. выше), переходить от позиционного анализа в рамках одного эксперимента к безотносительному сравнению генотипов объектов.

В том случае, если используются другие (неаллельные) маркеры молекулярных масс, ключом к генотипированию, то есть к идентификации аллелей служит молекулярный размер (длина) амплифицированных фрагментов, определяемый расчетным путем на основании физических измерений пробега фрагментов ДНК на электрофореграмме. Однако здесь существуют важные дополнительные условия, без учета которых определение размеров амплифицированных фрагментов ДНК не всегда может гарантированно обеспечить правильную идентификацию аллелей, которым эти фрагменты соответствуют.

Чтобы определить размеры амплифицированных фрагментов ДНК по их расположению на геле в первую очередь нужно проанализировать профиль электрофоретического разделения для данного конкретного геля и для него определить точный характер зависимости электрофоретической подвижности фрагментов от их размеров. Это можно сделать, используя стандарты молекулярных масс, то есть фрагменты ДНК заранее известного размера, которые фракционируют на том же геле, что и анализируемые амодифицированные фрагменты.

По характеру применения электрофоретические стандарты молекулярных масс бывают внешними и внутренними. Внешние стандарты наносят на гель так, что они образуют самостоятельные - контрольные или маркерные дорожки. Чтобы минимизировать возможные пространственные искажения - как реальные, так и кажущиеся (параллаксные), которые влияют на точность сопоставления характеристик стандартной и анализируемой дорожек, маркерные дорожки следует располагать на геле как можно ближе к дорожкам, где движутся анализируемые фрагменты ДНК. Такой проблемы не возникает в том случае, если стандарты молекулярных масс вносят непосредственно в ту же дорожку, где фракционируют интересующие амплифицированные фрагменты (внутренний стандарт). Однако в обычной практике использование внутренних стандартов пригодно лишь для решения ограниченного круга задач; универсализация же этого подхода требует специальной приборной базы (например, многоцветной флуоресцентной детекции).

Анализ данных электрофоретического разделения стандартных (маркерных) фрагментов позволяет определить параметры кривой зависимости электрофоретической подвижности фрагментов от их размеров для данного конкретного геля и затем, используя эти параметры, рассчитать длину анализируемого фрагмента на основании величины его электрофоретической подвижности. Для этого существуют специальные расчетные алгоритмы, которые характеризуются разной степенью точности. Это надо учитывать. Кроме того, еще один важный момент заключается в следующем: принципиальное значение для всех алгоритмов имеет условие, что стандарты (маркерные фрагменты) и анализируемые фрагменты - гомологичны, то есть представлены одинаковыми полинуклеотидными последовательностями. Если это условие не соблюдено, то есть нуклеотидный состав и первичная структура анализируемой и контрольной ДНК различны, то ошибка в определении размера фрагментов может достигать нескольких процентов. (Это связано с минорными различиями в физико-химических, и как следствие, электрофоретических свойствах полинуклеотидных цепей с различным нуклеотидным составом). Таким образом, погрешность расчетов при определении размера фрагментов является важной составляющей (вместе с физической погрешностью), которую необходимо учитывать при оценке общей ошибки генотипирования, присущей данной аналитической системе в целом.

Все это означает, что генотипические характеристики, полученные расчетным путем на основании величины электрофоретической подвижности гетерологичных стандартов молекулярных масс, являются условными и потому не могут быть напрямую использованы для сопоставления как элементы банка данных - например, для сопоставления геномных профилей, полученных на разных гелях. Чтобы получить такую возможность, необходимо как минимум использовать одинаковые маркеры или же провести нормирование ошибки и осуществить коррекцию всех данных по эталону - например, по гомологичному аллельному маркеру. Последний вариант предпочтителен, поскольку позволяет оперировать не условными, а истинными генотипами, что необходимо для корректной статистической обработки данных.

3.4. Интерпретация результатов генотипирования

Достоверная нетождественность аллельных профилей ДНК трактуется в общем случае как исключение происхождения сравниваемых биологических объектов от одного индивидуума. При этом следует соблюдать следующее условие: несовпадение аллельных профилей в исследуемых препаратах ДНК имеет доказательственное исключающее значение только при том условии, что оно зарегистрировано более чем в одной ПДАФ-системе и соответствующие полиморфные локусы генетически не сцеплены. (Это требование компенсирует возможность соматических и гаметических мутаций в исследуемых локусах хромосомной ДНК).

В свою очередь, достоверная тождественность аллельных профилей ДНК не влечет безусловный вывод о происхождении сравниваемых биологических объектов от одного индивидуума. Здесь строго обязательна вероятностная оценка генетической идентичности объектов экспертизы при условии зарегистрированного совпадения их ПДАФ-профилей. Это требование диктуется необходимостью принимать во внимание возможность случайного совпадения индивидуализирующих признаков разных лиц.

Действительно, совпадение амплификационных профилей (генотипов) в препаратах ДНК, полученных из биологических следов с места преступления и в ДНК подозреваемого, еще не означает, что у этих двух ДНК общее происхождение. Иначе говоря, сам по себе факт генотипического совпадения не обязательно влечет за собой вывод о том, что следы произошли именно от этого человека; они могли произойти и от другого индивидуума, который неотличим по исследованным генетическим признакам от первого. Точно так же, в экспертизе спорного отцовства факт совпадения отцовских аллелей в генотипе ребенка с аллелями, присутствующими в геноме предполагаемого отца, еще не означает доказанного отцовства.

Это объясняется тем, что как бы ни высока была индивидуализирующая значимость анализируемых признаков, а именно, аллельных вариантов полиморфных генов, она не абсолютна. По сути, эти признаки остаются группоспецифическими, то есть в той или иной степени каждый из них распространен в популяции. Поэтому после того как в ходе экспертизы установлен факт совпадения ДНК-профилей, характеризующих объекты экспертизы, и выполнено их генотипирование, перед экспертом встает последний и самый важный вопрос:

- Если генотипические аллельные комбинации двух препаратов ДНК совпадают, то какова вероятность того, что они произошли от одного человека?

Или, в случае экспертизы спорного происхождения детей:

- Если все аллели ребенка находят комплементарное соответствие в генотипах матери и предполагаемого отца и если материнство бесспорно, то какова вероятность того, что предполагаемый отец является биологическим отцом этого ребенка?

Для того, чтобы ответить на этот ключевой вопрос и, тем самым, окончательно решить экспертную задачу, необходимо прояснить два момента. Во-первых, необходимо оценить индивидуализирующее значение выявленного комплекса признаков, то есть количественно определить насколько полученные в ходе исследования генетические признаки позволяют отграничить исследованный объект экспертизы от любого другого, ему подобного. Во-вторых, нужно правильно выбрать алгоритм расчета вероятности для оценки идентификационной значимости результатов экспертизы.

3.4.1. Оценка индивидуализирующего значения ПДАФ-профиля

Для того, чтобы определить индивидуализирующее значение выявленного геномного профиля нужно определить его распространенность в популяции. Исходным параметром популяционных выкладок, касающихся оценки распространенности признака служит величина, называемая вероятностью признака. В нашем случае - это вероятность аллеля, которая обозначается символом (p). По определению эта величина равна отношению числа аллелей данного типа к общему числу аллелей исследуемого локуса в наблюдаемой выборке. Величину (p) называют также аллельной частотой. Ее определяют эмпирически - на основании результатов популяционных исследований.

Помимо вероятности аллеля, другой важной характеристикой является частота встречаемости аллеля в популяции - так называемая статистическая частота аллеля. Она часто обозначается символом (q). Обращаем внимание, что этот параметр, хотя и созвучен аллельной частоте, отличается от нее как по величине, так и по смыслу. Для популяций, находящихся в условиях равновесия Харди-Вайнберга, величина (q) связана с величиной (p) соотношением:

q = 2p - p2.

Она также может быть определена на основании данных популяционных исследований: статистическая частота аллеля - это отношение числа генотипов, в которых присутствует данный аллель, к общему числу всех возможных генотипов в популяционной выборке.

Из этого определения следует, что, например, в экспертизе спорного отцовства именно статистическая частота аллеля (q) должна фигурировать как мера распространенности в популяции индивидуализирующего признака, присущего сравниваемым субъектам (ребенку и предполагаемому отцу) и используемого в целях идентификации биологического отца ребенка. Иными словами, это и есть мера индивидуализирующего значения признака, в данном случае - аллеля: величина (q) служит тем параметром, который определяет шансы любого (случайного) мужчины, имеющего данный аллель в генотипе, считаться биологическим отцом любого ребенка, у которого этот конкретный аллель был идентифицирован как отцовский.

В случае же экспертизы идентификации личности, в качестве индивидуализирующего признака, имеющего идентификационное значение выступает уже не отдельный аллель, а целиком генотип. Напомним, что для каждого отдельного локуса это - комбинация двух аллелей, которые могут быть разными (a1; a2 - гетерозиготное состояние), а могут оказаться и одинаковыми (a1; a1 - гомозиготное состояние). Поэтому здесь для количественной оценки индивидуализирующего значения признака используют статистическую частоту генотипа, а именно - частоту встречаемости конкретного профиля ДНК в популяции. Эту величину иногда обозначают символом (Q); ее определяют эмпирически на основании данных популяционных исследований или же рассчитывают, исходя из величины вероятности каждого аллеля (pa1 и pa2) на основании закономерностей менделеевского наследования. Для гетерозиготного и гомозиготного генотипов расчетные величины (Q) соответственно таковы:

Q = 2 х pa1 х pa2,



Важно однако подчеркнуть, что в современной мировой практике для расчета статистической частоты гомозиготных профилей вместо выражения:



обычно применяют искусственную, но более консервативную оценку:

Q = 2p.

Это делается для компенсации эффекта ложной гомозиготности. (Приведенные формулы справедливы только для популяций, находящихся в условиях равновесия Харди-Вайнберга).

Таким образом, в случае идентификационного исследования величина (Q) служит параметром, который определяет шансы любого (случайного) человека, имеющего данный генотип, считаться именно тем лицом, от которого произошла любая ДНК с этим генотипом.

Если индивидуализация объекта экспертизы осуществляется по нескольким независимым (несцепленным) ПДАФ-системам, то для целей совокупной оценки индивидуализирующего значения выявленного комплекса признаков их статистические частоты могут быть перемножены. Следовательно, количественная оценка индивидуализирующего значения нескольких геномных профилей, полученных для панели несцепленных полиморфных локусов, будет определяться как произведение статистических частот всех генотипов - в идентификационной экспертизе или всех отцовских аллелей ребенка - в экспертизе спорного отцовства. Иными словами, для совпадения, зарегистрированного по нескольким несцепленным локусам: a, b,...n:

Q = (Qa х Qb х Qc х...Qn),

где Qn - статистическая частота n-го локального генотипа.

Аналогично, при вероятностной оценке результатов экспертизы спорного отцовства, когда по нескольким локусам не получено исключения ложноуказанного отца:

q = (qa х qb х qc х...qn),

где q - общая статистическая частота всех отцовских аллелей, выявленных в генотипе ребенка.

3.4.2. Вычисление вероятности генетической идентичности объектов экспертизы и вероятности отцовства

Стандартные в зарубежной судебно-экспертной практике величины "инкриминирующее значение" (англ. - Incriminating Value, IV) и "индекс отцовства" (англ. - Paternity Index, PI), математически - суть отношения правдоподобия, которые призваны ответить на вопрос: во сколько раз более вероятно, что выявленные в ходе анализа индивидуализирующие признаки совпадают закономерно (например, когда исследуемые образцы ДНК произошли от одного человека), а не случайно (то есть, когда они принадлежат двум разным членам популяции).

В количественном выражении:

IV = 1 / Q.

Аналогичная по смыслу величина - индекс отцовства PI:

PI = 1 / q.

Однако, строго говоря, вычисление PI и IV не дает ответа на главный вопрос, призванный количественно охарактеризовать доказательственное значение экспертизы: если совпадение признаков установлено, то какова вероятность, что это совпадение закономерно, а не произошло по воле случайности? Ответить на этот вопрос можно, используя формулу вычисления условной вероятности, выведенную Байесом (Bayes). Общий смысл этой формулы в том, что зная так называемую априорную ("до опыта") вероятность интересующего нас некоего события (например, происхождения ДНК от этого или же от другого человека), мы можем определить величину постериорной ("после опыта") вероятности этого же события при условии, что уже произошло другое событие, имеющее определенное отношение к первому (например, амплификационные профили испытуемой ДНК и ДНК этого идентифицируемого человека совпали).

Априорную вероятность в общем случае принято считать равной 0,5. (Надо подчеркнуть, что хотя эта величина и не является бесспорной, изменение оценки априорной вероятности не входит в компетенцию эксперта и является прерогативой суда). Можно показать, что подставляя это и другие соответствующие рассматриваемому случаю значения величин в формулу Байеса, мы получим выражение, определяющее конечную постериорную вероятность того, что при наблюдаемом совпадении геномных профилей исследованные образцы ДНК идентичны. Эта байесова вероятность генетической идентичности геномных профилей иногда называется инкриминирующей вероятностью IP от англ.: Incriminating Probability:

IP = 1 / (1 + Q),

где Q - это частота генотипа.

(Следует оговориться, что подобный расчет приемлем только в том случае, если происхождение генетического материала от подозреваемого не исключается другими методами, и если следы оставил один человек.)

Аналогично, в случае неисключающей экспертизы спорного отцовства, байесова постериорная вероятность того, что при наблюдаемом совпадении отцовского аллеля в геномном профиле ребенка с одним из аллелей предполагаемого отца этот мужчина является его биологическим отцом, называется вероятностью отцовства PP (англ. - Paternity Probability) и выражается формулой:

PP = 1 / (1 + q),

где q - статистическая частота отцовского аллеля, выявленного в геномном профиле ребенка.

Обе эти вероятности часто выражают в процентах: PP х 100 = %.

Эффективность использования метода и показания к применению

В настоящее время экспертные исследования биологических объектов с использованием методов молекулярно-генетической индивидуализации человека прочно вошли в арсенал судебно-медицинских служб большинства развитых стран мира. Более чем десятилетний мировой опыт внедрения этих технологий в практику работы правоохранительных органов убедительно свидетельствует о том, что благодаря им эффективность расследования многих тяжких преступлений против личности может быть существенно повышена.

С точки зрения задач судебно-медицинской экспертизы использование анализа ПДАФ наиболее эффективно в двух случаях: это идентификация личности и установление биологического родства.

Речь может идти об идентификации личности при расследовании убийств, тяжких телесных повреждений, изнасилований и других преступлений против личности, требующих судебно-медицинского исследования вещественных доказательств, а также при опознании расчлененных, сильно деформированных, обгоревших трупов - в случае массовых катастроф, взрывов, землетрясений и военных конфликтов.

В то же время, геномная "дактилоскопия", как иногда называют вышеописанный анализ ПДАФ, в отличие от традиционной криминалистической дактилоскопии позволяет не только однозначно устанавливать личность, но также определять кровное родство лиц. Это делает ее незаменимым экспертным методом в сложных случаях подмены, утери, похищения детей, определения родства малолетних или потерявших память лиц, выявления фактов кровосмешения. Метод также весьма эффективно используется и при решении гражданских дел - для установления отцовства или материнства.