الجمع بين تحاليل المتواليات المتكررة على الصبغيات الجسمية والصبغي Y في تأكيد نسب الأطفال الذكور في حالة سفاح الأقارب (تقرير حالة)

سحر الياس* **محمد علي السطلي****

غيثاء منصور*** **بسام المحمد******

الملخص

خلفية البحث وهدفه: إظهار قوة تأكيد النسب بالجمع بين أنظمة الـ STRSs على الصبغيات الجسمية والصبغي Y.

مواد البحث وطرائقه: درست حالات لتأكيد النسب في المخبر، باستخدام كيت Powerplex16 وأضيف إليها الكيت Y-Plex. استخرج الـ DNA من العينات باستخدام كيت كياجين DNA Mini Kit بحسب التعليمات المرافقة للكيت، وأجري التضخيم بتقانة الـ PCR بجهاز الحرارة الدورية Thermocycler والترحيل بجهاز ABI PRISM 310 Genetic Analyzer ثم قُرِئَتِ النتائج ببرنامج GeneMapper ID v3.0 software.

حُسِبَ مؤشر الأبوة واحتمال صحة النسب باستخدام برنامج بحسب وصف AABB، كما اِسْتُخْدِمَتْ قاعدة بيانات أنماط الصبغي Y (YHRD) الأكبر الحاوية حتى تاريخه على أكثر من 112003 نمط مختلف.

النتائج: وجد خلال الدراسة باستخدام نمط أنظمة المتواليات المتكررة القصيرة STRs على الصبغي Y Short tandem repeat (Y STRs) لتأكيد النسب في حالة السفاح فضلاً عن استخدام أنظمة الصبغيات الجسمية Short tandem repeats (STRs) ارتفاع مؤشر الأبوة إِذْ وصلت إلى احتمالية الأبوة إلى >99,997%.

الاستنتاج: تقدم أنظمة الـ STRs الموجودة على الصبغيات الجسمية المستخدمة في وقتنا الحالي معلومات مفيدة جداً، إلا أن الأنظمة الموجودة على الصبغي Y تقدم - في أحيان كثيرة - معلومات مهمة في بعض حالات النسب لا يمكن الحصول عليها باعتماد أنظمة الصبغيات الجسمية وحدها.

كلمات مفتاحية: نمط أنظمة المتواليات المتكررة القصيرة STRs على الصبغي، Yحالات طبية شرعية، فحص الأبوة. أنظمة الـ STRSs على الصبغيات الجسمية، سفاح الأقارب، قاعدة بيانات.

* قسم الطب الشرعي- كلية الطب البشري- جامعة دمشق.

** قسم النسج والتشريح والجنين - كلية الطب البشري- جامعة دمشق.

*** قسم النسج والتشريح والجنين - كلية الطب البشري- جامعة دمشق.

**** رئيس دائرة الطب الشرعي بمديرية الصحة في حمص- سورية.

Combining Autosomal and Y-Chromosomal Short Tandem Repeat Data in Paternity Testing with Male Child incest case (case report)

Sahar Elias[*] **Mohamad Ali Alsatli**[**]
Ghaytha Mansour[***] **Bassam ALmohammad**[****]

Abstract

Background & Objective: The aim of the study is to demonstrate the power obtained by combining autosomal and Y

Methods & Materials: cases examined to confirm the ratios in the laboratory, using Kit Powerplex16, Y-Plex. DNA was extracted from blood samples using QIAmp1 DNA Mini Kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions and the PCR products were typed using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. The results were analyzed using GeneMapper ID v3.0 software. In the case scenario, Paternity index LH and corresponding posterior probability WH were calculated using an excel worksheet implementing the method

described by American Association of Blood Banks AABB. We used haplotype frequencies from YHRD database (all populations), which is by far the largest Y Short tandem repeats(Y-STR) database available with more than 112,005 different haplotypes

Results: During the study we found using the existing systems on the chromosome Y STRs haplotype to confirm the ratios in the case of incest in addition to the use of somatic chromosomes systems Short tandem repeats (STRs) high paternity index, reaching to the possibility of paternity to <99.997%

Conclusion: The systems provide STRs on somatic chromosomes and used at the present time very useful information, but that the existing regulations on the Y chromosome often provide important information in some cases ratios can not be obtained the adoption of somatic chromosomes systems alone.

Keywords: Y(STRs) Short tandem repeats haplotype, Forensic casework, Paternity testing, Short tandem repeat (STRs) ,Incest case, Database .

[*] Department of legal medicine- Faculty of Medicine- Damascus University.
[**] Department of histology Embryology and Anatomy- Faculty of Medicine- Damascus University.
[***] Department of histology Embryology and Anatomy- Faculty of Medicine- Damascus University.
[****] President of Forensic Medicine Center, Ministry of Health, Homs, Syria

مقدمة:

بدأ استخدام المادة الوراثية في تحاليل النسب منذ ثلاثينيات القرن الماضي، وأصبح استخدام أنظمة المتواليات الترادفية القصيرة STRs في تسعينيات القرن الماضي هو الشكل الأكثر شيوعاً لهذا الاستخدام [1,2] حيث تُوَرَّثُ المادة الجينية للابن التي يعود نصفها من والده البيولوجي، ونصفها الآخر من والدته، وذلك بحسب قوانين ماندل؛ وذلك ينطبق على الأنظمة الموجودة على الصبغيات الجسمية (A-STRs) [3,4,5] .

وقد اكتسبت الأنظمة على الصبغي الجنسي Y خلال الأعوام القليلة الماضية كثيراً من الأهمية فيما يتعلق بتطبيقها في المجالات الشرعية [6]؛ ذلك أن النمط الجيني للأب ينقله بشكل كامل إلى أبنائه الذكور كلّهم دون تغيير. ومن أهم استخدامات الأنظمة على الصبغي الجنسي Y هي في تحري الآثار البيولوجية الشرعية [7] ولاسيّما حالات الاعتداءات الجنسية، وفي تحديد النسب للأولاد الذكور وتحري حالات القرابة المعقدة، وخصوصاً في حال كان الأشخاص ذو القرابة المباشرة غير موجودين[8]، وقد وجد Jankova[9] عام 2010 أن الأخ هو من قام بالاعتداء على أخته، وذلك بسبب التشابه الكبير في بروفيل الطفل مع أمه ليتم بذلك تبرئة المتهم الأول في القضية. كما تفيد في التحري عن الأشخاص المفقودين ولاسيّما الحوادث الكبيرة والكوارث والحروب. وحالياً تُسْتَخْدَمُ في دراسات علوم التطور (مقارنة التغيرات الحادثة بمرور الأجيال)، وفي تحديد أصول الشعوب وتحركاتها وهجراتها عبر الأجيال. وقد أجريت كثير من الدراسات في مجال استخدام أنظمة STRs على الصبغي الجنسي Y في المجالات الشرعية كما في دراسة Buckleton [10] عام 2011، وأظهرت هذه الاستخدامات القوة التمييزية العالية التي تملكها هذه الأنظمة والتي تصل >99% [2]. وتقوم هذه التحاليل على المقارنة بين الأنماط من حيث التشابه التام أو الاختلاف، ففي حالة النسب يكون وجود الاختلاف بين نمط الأب المفترض والابن هو لصالح نفي النسب. وبحساب مؤشر الأبوة لكل من مواضع المتكررات الترادفية الجسمية Autosomal Short Tendem Repeats Loci (A-STRs) ومواضع الصبغي الجنسي Y Ychromosome Short Tendem Repeats Loci (Y-STRs) كما هو في توصيات (ISFG) International Society of Forensic Genetics [11] نحصل على قوة عالية لتأكيد الأبوة سواء كانت الأم موجودة أم غير موجودة.

مواد البحث وطرائقه:

مواد البحث:

ماسحات قطنية معقمة

كيت DNA Mini Kit من شركة Qiagen لاستخلاص الـ DNA

كيت Powerplex16 وكيت Y-Plex من شركة Promega

مثفلة، جهاز PCR، جهاز ABI 310

عرض الحالة Case presentation

وصل إلى مخبر البحوث والاستشارات الوراثية في كلية الطب البشري من القضاء عينات دم مأخوذة من السيدة ر المصابة بدرجة من التخلف العقلي والمتهم خ المتهم باعتداء جنسي على السيدة المذكورة مع عينة دم الطفل الذي أنجبته السيدة ر، وطلب من المخبر تحديد هل كان المتهم خ هو الوالد البيولوجي لهذا الطفل؟ وبعد نفي النسب للطفل حُلِّلَتْ عينة أخ الأم بطلب من القاضي.

طرائق البحث:

استخلاص الـ DNA وقياسه:

أخذت عينات دم من قبل الطبيب الشرعي الموكل من قبل القضاء، وأجري عليها عملية استخراج الـ DNA باستخدام كيت (MiniAmp) من انتاج شركة (Qiagen)، بحسب بروتوكول العمل المرفق بالكيت، باستخدام أعمدة السيليكا [12,13,14]. وضبط تركيز الـ DNA المستخلص

باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 260 و 280 نانومتراً، وكان متوسط تركيز العينات 24 نانوغراماً/ ميكروليتر [15].

تحضير تفاعل الـ PCR

ضُخِّمَ الـ DNA باستخدام كيت PowerPlex16 وكيت Y-Plex لشركة Promega

الدراسة الإحصائية:

حُسِبَ مؤشر الأبوة باعتماد أنظمة الـ STRs على الصبغيات الجسمية والصبغي Y [16,17] باستخدام نظام إكسل وباعتماد نسب توارد الألائل لأنظمة الـ STRs المدروسة لدى الشعب السوري 15 وحُسِبَتْ نسبة توارد النمط الجيني على الصبغي Y باعتماد قاعدة البيانات YHRD.

النتائج:

حددت النتائج باعتماد أنظمة الـ STRs على الصبغيات الجسمية كما في الجدول (1)

جدول (1) يوضح نتائج الحالة المدروسة باستخدام كيت PowerPlex16

اسم النظام	الأب المفترض السيد ح	الأب المفترض أخ الوالدة	الابن	الأم السيدة ر
D3S1358	16/17	14/16	14/14	14/16
TH01	6/6	9/10	9/9.3	9.3/10
D21S11	31.2/31.2	29/31.2	29/29	29/32.2
D18S51	14/15	12/16	12/16	13/16
PentaE	7/12	16/16	16/16	16/16
D5S818	10/12	10/13	10/13	11/13
D13S317	8/8	12/12	9/12	9/12
D7S820	8/8	11/12	8/12	8/11
D16S539	9/12	12/13	12/13	12/13
CSF1PO	10/12	10/10	10/12	10/10
PentaD	12/13	9/11	10/11	10/11
Amelogenin	XY	XY	XY	X/X
VWA	15/17	15/17	15/18	17/18
D8S1179	12/12	15/15	15/15	15/15
TPOX	8/11	8/9	8/9	8/9
FGA	25/26	21/23	21/23	21/23

نلاحظ من خلال الجدول (1) أن السيد ح لم يمتلك في الأنظمة D3S1358, THO1, D21S11, D18S51, PentaE, D13S317, PentaD, D7S820, D8S1179, FGA الأليلات التي يجب أن يحملها الأب البيولوجي للطفل، وبذلك نُفيِ النسب[18]. وبدراسة الأنماط الجينية للسيدة وطفلها باعتماد الأنظمة FGA, TPOX, D8S1179, PentaD, D16S539, D13S317, PentaE, D21S11, D3S1358 نلاحظ أن الأب البيولوجي للطفل يجب أن يحمل في نمطه الجيني في الأنظمة المذكورة أليلاً مشتركاً مع النمط الجيني للأم، أي إنَّ هناك احتمالاً كبيراً لوجود درجة من القرابة بين الأب البيولوجي للطفل والأم، وقد تصل إلى درجة قرابة من الدرجة الأولى لوجود التشابه في أكثر من نصف عدد الأنظمة 9 أنظمة من أصل 15 نظاماً. أُخْبِرَ الطبيب الشرعي بنتيجة التحليل وبالتوقعات المحتملة ولذلك رُوجِعَتْ شهادات الأطباء المشرفين على السيدة لدى وجودها في المشفى التي تذكر أن السيدة ر قالت أن أخاها هو من كان يعتدي عليها، والتي لم يُؤْخَذْ بها في بادئ الأمر لأنَّ السيدة مصابة بدرجة من التخلف العقلي، وازداد اهتمام القضاء بالحالة بعد وفاة المولود نتيجة الإهمال الشديد له وقلة الاعتناء به، وقام القاضي بطلب أخذ عينة دم من الأخ المتهم وإرسالها للمخبر لتحليلها وتحري نسب الطفل بالنسبة إلى أخ الأم.

بنتيجة مقارنة الأنماط الجينية للطفل مع الأخ (الخال) تبيّن أنه يمكن أن يكون هو الأب المفترض، وهذا يتفق مع

دراسة Jankova[10] عام 2010 أن الأخ هو من قام بالاعتداء على أخته وذلك بسبب التشابه الكبير في الأنماط الجينية الطفل مع أمه ليجري بذلك تبرئة المتهم الأول في القضية. ولكن لوجود درجة القرابة العالية مع الأم يصبح حساب مؤشر الأبوة والاحتمالية ضعيف القيمة، لذا كان لابدَّ من دعم ذلك باستخدام نمط آخر هو النمط على الصبغي Y اِستُخْدِمَ الكيت التجاري Y-Plex من شركة Promega لدراسة النمط الوراثي للأب المفترض الخال والطفل كما هو موضّح في الجدول (2) لنرى تطابقاً تاماً في النمط بين الخال والطفل.

جدول (2) يوضح نتائج النمط الجيني للطفل والخال باعتماد أنظمة الصبغي الجنسي Y باستخدام كيت Y-Plex

اسم النظام	الأب المفترض (الخال)	الطفل
DYS391	10	10
DYS389I	13	13
DYS439	12	12
DYS389II	28	28
DYS438	10	10
DYS437	16	16
DYS19	13	13
DYS392	11	11
DYS393	12	12
DYS390	23	23
DYS385	13/16	13/16

اعتُمِدَ في حساب نسبة توارد هذا النمط الجيني على الصبغي Y لدى الشعوب على قاعدة بيانات YHRD [19] إذْ أظهرت عدم وجود تشابه بين هذا النمط والأنماط الأخرى الموجودة في قاعدة البيانات المؤلفة حتى تاريخه من 112005 نمط جيني من مجموع الدراسات التي أجريت حتى الآن على شعوب العالم .

المناقشة:

أظهر استخدام أنظمة الـ STRs على الصبغيات الجسمية في رسم النمط الجيني للسيد ح والطفل والأم خلافاً في 10 أنظمة، وهذا يتنافى مع أن يكون السيد ح هو الأب البيولوجي للطفل.

ووجود التشابه في النمط الجيني للطفل مع والدته، ومن ثَمَّ وجود تشابه في النمط الجيني للأب البيولوجي مع الأم في أكثر من نصف الأنظمة دفع لرفع احتمال وجود القرابة بين الأب البيولوجي والأم؛ وذلك أن احتمال التشابه في النمط الجيني على الصبغيات الجسمية بين الأخوة الأشقاء قد يحدث بنسبة تتجاوز 50% [18,19]. ساعد هذا الاحتمال على التدقيق في ظروف الحادث وتوجيه أصابع الاتهام إلى (الخال).

أظهرت دراسة النمط الجيني للخال باستخدام أنظمة الـ STRs ومقارنته بنمط الطفل الجيني أنه لم يكن ممكناً نفي الأبوة، ولكن كان من الصعب الحصول على مؤشر أبوة مقنع بالشكل الكافي رغم قيمته التي وصلت 43,019,034 واحتمال أبوة 99,999997% وذلك بسبب القرابة بين الأم و الأب، ومن هنا كان استخدام النمط الجيني على الصبغي Y للأخ والطفل ضرورياً لدعم احتمال الأبوة بعد القيام بالدراسة الإحصائية [20,21] التي أظهرت ندرة النمط الجيني على الصبغي Y الذي يحمله الخال والطفل لِتُثْبَتَ حالة سفاح الأقارب باستخدام القوة التمييزية العالية لدراسة أنماط الصبغي Y. إذْ كانت نسبة التوارد المقترحة هنا بحسب القانون الذي طرحه Dawid et al [22] هي 0.0027% و من هنا كان مؤشر الأبوة 37335 ومن ثَمَّ كان الاحتمال بأن يكون الخال هو الأب البيولوجي للطفل يصل 99,997% مؤكداً بذلك جريمة حالة السفاح بين الأقارب.

التوصيات:

إن تطبيقات العلوم الجينية في المجالات الشرعية منذ نهايات القرن الماضي في إثبات هوية تارك الأثر وتحري النسب والبحث عن هوية الأشلاء والجثث أدت إلى قفزة كبيرة في تقدم العلوم الجنائية.

ولعل إدخال تطبيقات لأنظمة الـ STRs على الصبغي Y قد ساعد في حل كثير من الحالات الصعبة من حالات تحري النسب.

ولهذا من المفيد القيام بدراسة أكبر عدد ممكن من أنظمة الـ STRs على الصبغي Y لدراسة تكرارات الأنماط الجينية لدى أفراد الشعب السوري لاستخدامها في حساب احتمال الأبوة. وربما من المفيد التعاون مع دول الجوار في وضع قاعدة بيانات أنماط الصبغي Y للشعوب في هذه الدول أسوة بقواعد البيانات العالمية في:

YHRD, YFiler Haplotype Database, PowerPlex® Y Haplotype Database, Y-STR Haplotype Reference Database for U.S. Populations.

References

1. Kayser M, Coagli_ A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. Int J Legal Med 1997;110:125–33
2. Roewer L, Kayser M, de Knijff P, Anslinger K, Betz A, Caglia A, et al. A new method for the evaluation of matches in non-recombining genomes: application to Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males. Forensic Sci Int 2000;114:31–43
3. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics1992;12:241–53.
4. Budowle B, editor. Studies for selecting core STR loci for CODIS. Proceedings of Chambridge Healthech Institute's Second Annual Conference on DNA Forensics: Science Evidence Future Prospects; 1997 Nov 17–18. McLean, VA. Needham, MA: Cambridge Health Tech Institute,1997.
5. Ayadi I, Mahfoudh N , Makni H, Keskes A and Reba A Combining Autosomal and Y-Chromosomal Short Tandem Repeat Data in Paternity Testing with Male Child: Methods and Application J Forensic Sci, September 2007, Vol. 52, No. 5
6. Iida R, Kishi K. Identification, characterization and forensic application of novel Y-STRs. Leg Med 2005;7:255–58.
7. Fukshansky N, Bar W. DNA mixtures: biostatistics for mixed stains withhaplotypic genetic markers. Int J Legal Med 2005;119:285–90.
8. Budowle,.Ge, J. and Chakraborty R. Choosing relatives for DNA identify ication of missing persons , Journal of Forensic Sciences (2011) 56:S23 - S28.
9. .Jankova-Ajanovska R., Jakovski Z., Janeska B., Simjanovska L., Duma A. Inherited Alleles Revealing An Incestuous Paternity Contributions, Sec. Biol. Med. Sci.(2010), MASA, XXXI, 2, p. 261–266
10. Buckleton, J., Krawczak, M.,and Weir, B. The in terpretation of lineage markers in forensic DNA testing , Forensic Science International:Genetics (2011) 5:78 - 83.
11. Morling N, Allen RW, Carracedo A, Geada H, Guidet F, Hallenberg C, et al. Paternity testing commission of the international Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. Forensic Sci Int 2002;129:148–57.
12 . Vogelstein B, Gillespie D. Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A. 1979;76:615-619.
13. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PM, van der NJ. Isolationof human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA from feces by a simple Journal of Clinical Microbiology 1990;28:495-503.
14. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML,Turek AA. QIAamp Spin Colums as aMethod of DNA Isolation for Forensic Casework Journal of Forensic Sciences 1998;43: 1024-1030.
15. Tereba AM, Bitner RM, Koller SC, Smith CE, Kephart DD, Ekenberg SJ. Simultaneous isolation and quantitation of DNA. U.S.Patent 2004;6: 631-6730
16. Rolf B, Keil W, Brinkmann B, Roewer L, Fimmers R. Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability for paternity in cases of mutations. Int J Legal Med 2001;115:12–5.
17. Gjertson DW, Lee SC, Maha GC, Pritchard J, Teddie JA. Standards for parentage testing laboratories (standards 5.3.1 and 6.4.1), 6th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2003;15,28.
18.Abdin L, Shimada I, Brinkmann B, and Hohoff C Analysis of 15 short tandem repeats reveals significant differences between the Arabian populations from Morocco and Syria 2003
19. http://www.yhrd.org/
20.Gusmlio L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. Forensic Sci Int 2006;157:187–97.
21. Kayser M, Kruger C, Nagy M, Geserich G, Roewer L. Y-chromosomal DNA-analysis. In: Olaisen B, Brinkmann B, Lincon PJ, editors. Paternity testing: experiences and recommendations. Progress in forensic genetics, Vol 7. Amsterdam: Elsevier, 1998;494–96.
22. Dawid, A.P , Mortera, J, Pascali, V.L . Non-fatherhood or mutation? A probabilistic approach to parental exclusion in paternity testing, Forensic Sci. Int. 124 (2001) 55–61.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2013/8/18.
تاريخ قبوله للنشر 2015/4/2.