

ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΑΜΦΙΣΒΗΤΟΥΜΕΝΗΣ ΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

*Κουνιάκη Διαμάντω, Ταράση Αικατερίνη, Κίτσιου Βασιλική,
Μαρούγκας Παναγιώτης, Αθανασιάδης Θεόφιλος, Μπλέτσα
Αναστασία, Γαλάζιου Γεωργία, Σταμάτη Βαΐα,
Τστρογιάννη Αλεξάνδρα*

Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός»



ΕΝΩΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ
Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ» (Ε.Ε.Π.Ν.Ε.)

25^ο ΕΤΗΣΙΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ
ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»

Δεν υπάρχει σύγκρουση συμφερόντων με τις Χορηγούς Εταιρείες:



διερεύνηση γονικότητας (parentage testing)

συνίσταται στον έλεγχο:

αμφισβητούμενης πατρότητας (*disputed paternity*)

αμφισβητούμενης μητρότητας (*disputed maternity*)

διεξάγεται για την ανάδειξη νομικής ευθύνης ενός παιδιού και αφορά:

- είτε τον προβληματισμό ατόμων σε καθαρά **προσωπικό επίπεδο**
(ανεπίσημη πραγματογνωμοσύνη)

- είτε **επιβεβλημένη διερεύνηση**

Ποινικό Δίκαιο

(σεξουαλική κακοποίηση κατά την οποία προκύπτει εγκυμοσύνη, αιμομιξία)

Αστικό Δίκαιο

(αναγνώριση εξώγαμου τέκνου, αποποίηση πατρότητας, επιμέλεια, υποθέσεις υιοθεσίας, δικαιώματα κοινωνικής ασφάλισης, ασφαλιστικές παροχές, θέματα κληρονομιάς)

- **υποβοηθούμενη αναπαραγωγή**
(δότες ωαρίων, παρένθετες μητέρες, εξωσωματική γονιμοποίηση)
- **περιπτώσεις μετανάστευσης ή ελέγχου εθνικότητας**

autosomal Short Tandem Repeats (aSTRs)

TCCCAAGCTCTTCC**GATAGATAGATAGATAGATATACAGATGC**

6 GATA repeats

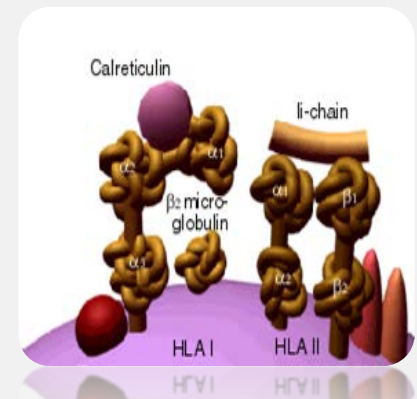
- εντοπίζονται σε non coding-intron region (Sir Alec Jeffrey και συν. 1985)
- παγκόσμιο πρότυπο στην ανάλυση συγγένειας
 - υψηλός πολυμορφισμός
 - υψηλά ποσοστά ετεροζυγωτίας
 - εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα
- εμφανίζουν **υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων** (10^{-6} έως 10^{-2} nt vs 10^{-9} λοιπό γονιδίωμα)

η ανάλυση του ανθρώπινου g-DNA ως προς τα αλληλόμορφα aSTRs
ονομάστηκε με τον όρο «**γενετικό προφύλ**»

MHC-Major Histocompatibility Complex

στην περίπτωση καταγραφής aSTR μεταλλάξεων

- αύξηση του αριθμού aSTRs (16 → 21 ή 25)
- έλεγχος Y-STRs
- έλεγχος μιτοχονδριακού DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA)
- έλεγχος μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)
- έλεγχος του MHC (Major Histocompatibility Complex) γνωστά στον άνθρωπο ως HLA



International Society for Forensic Genetics (ISFG)

- Αποκλεισμός: αλληλική ανομοιότητα μεταξύ του παιδιού και του ΦΓ σε >2 aSTRs
- Επιβεβαίωση γονεϊκής γενετικής σχέσης: ο αριθμός των αλληλικών aSTRs ανομοιοτήτων <3 και $CPI \geq 10.000$

Γενετική **ασυμβατότητα** σε **ένα** τουλάχιστον **HLA αλλήλιο** μεταξύ γονέων και απογόνων δεικνύει **αποκλεισμό**

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της **συμβολής 16 aSTRs** γενετικών τόπων στην επίλυση περιστατικών αμφισβητούμενης γονικότητας

252 περιπτώσεις (634 άτομα)
ελέγχου αμφισβητούμενης γονικότητας
Αστικού Δικαίου

Τμ. Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός»
από το 2014 έως 2019

✓ **243** έλεγχο **πατρότητας** / **9** έλεγχο **μητρότητας**)

- ✓ **218** διενεργήθηκαν με **DNA** μητέρας, παιδιού και **ΦΠ** (**trio υποθέσεις**)
- ✓ **34** διενεργήθηκαν απουσία **DNA** πατέρα ή μητέρας (**duo υποθέσεις**)
(**32 motherless - 2 fatherless**)

- **απομόνωση DNA** : περιφερικό αίμα ή/και παρειακό επίχρισμα

μεθοδολογία ελέγχου

- **16 aSTRs** γενετικοί πολυμορφισμοί (*PCR-Fragment Analyses*)

D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33, Amelogenin marker HUMAMEL

ABI 3130 γενετικός αναλυτής (Applied Biosystems)

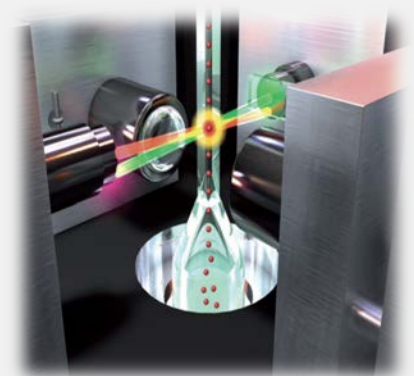
DNA profiling: *GeneMapper® ID Software IDX1.3*

- **HLA τάξης I** (*HLA-A*, -B*, -C**)

HLA τάξης II (*HLA-DRB1*, -DQB1*, -DPB1**)

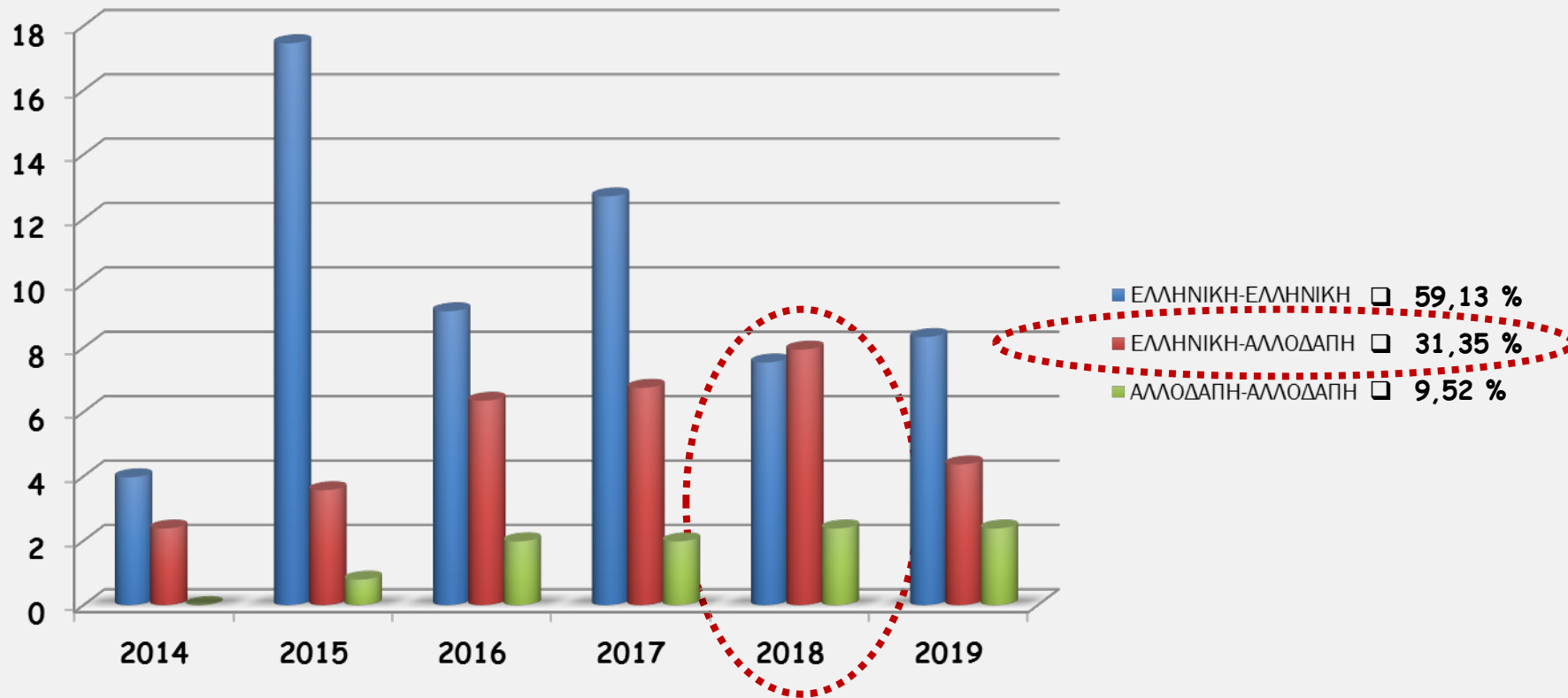
σε επίπεδο *High-Resolution (HR)*

μοριακές DNA τεχνικές (*PCR-SSOP/-SSP*)

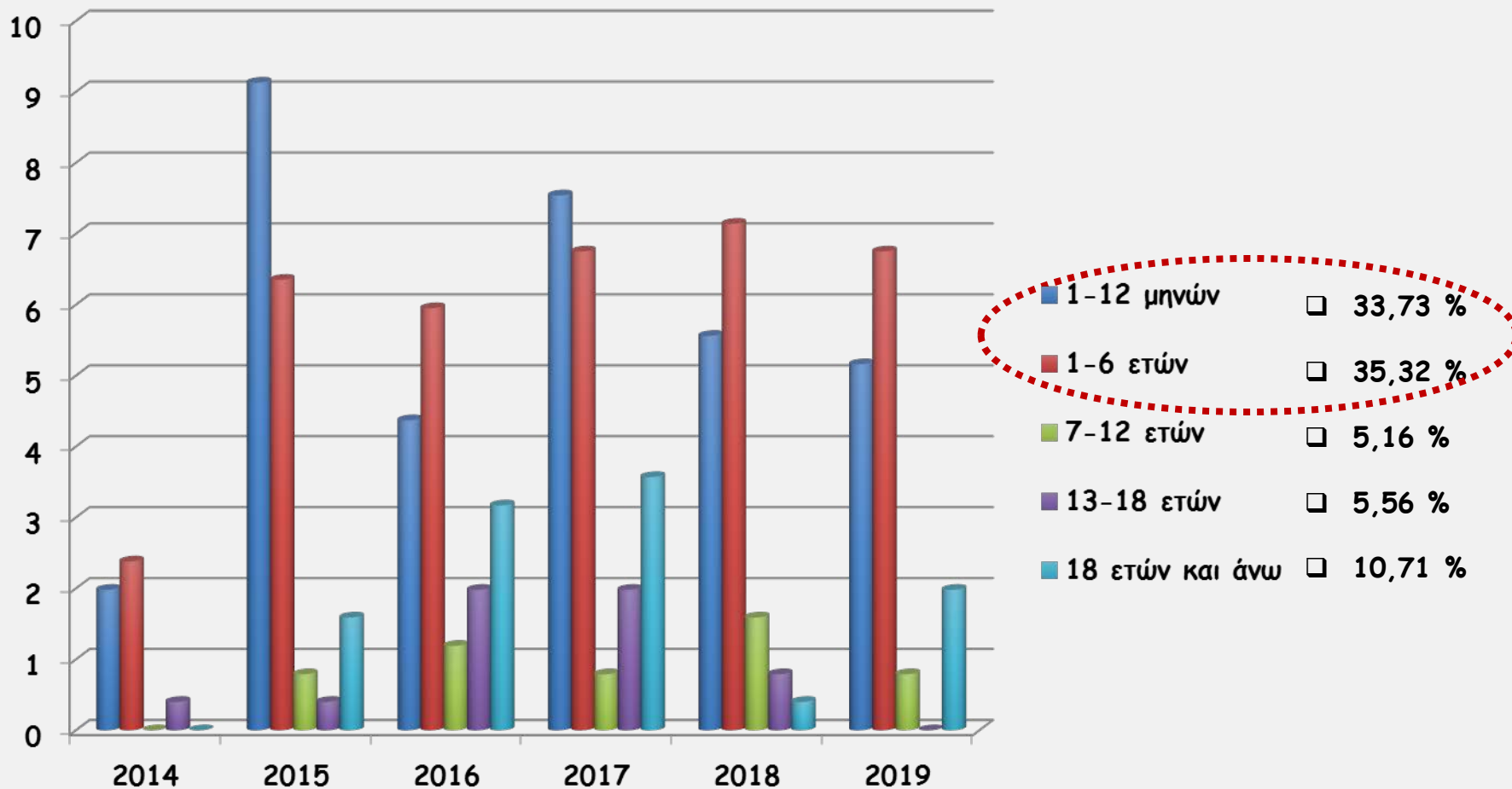


- ο εξισώσεις κατά **Buckleton (aSTRs)**
 - ***Genepop 4.0.10***
(Power of Exclusion, **PE** / Random Man not Excluded, **RMNE**)
 - **Familias program**
(Combined Paternity Index, **CPI** / Probability of Paternity, **W**)
- ο εξισώσεις κατά **Essen-Möller (HLA)**
(Paternity Index, **PI** / Probability of Paternity, **W**)

αποτελέσματα Ιθαγένεια



αποτελέσματα ηλικία παιδιών



αποτελέσματα αποκλεισμοί vs μη αποκλεισμοί

❑ 47/252

(33 trio και 14 duo)

αποκλεισμός

με τεκμήρια αποκλεισμού
σε ≥ 3 αSTRs γεν.τόπους



❑ 205/252

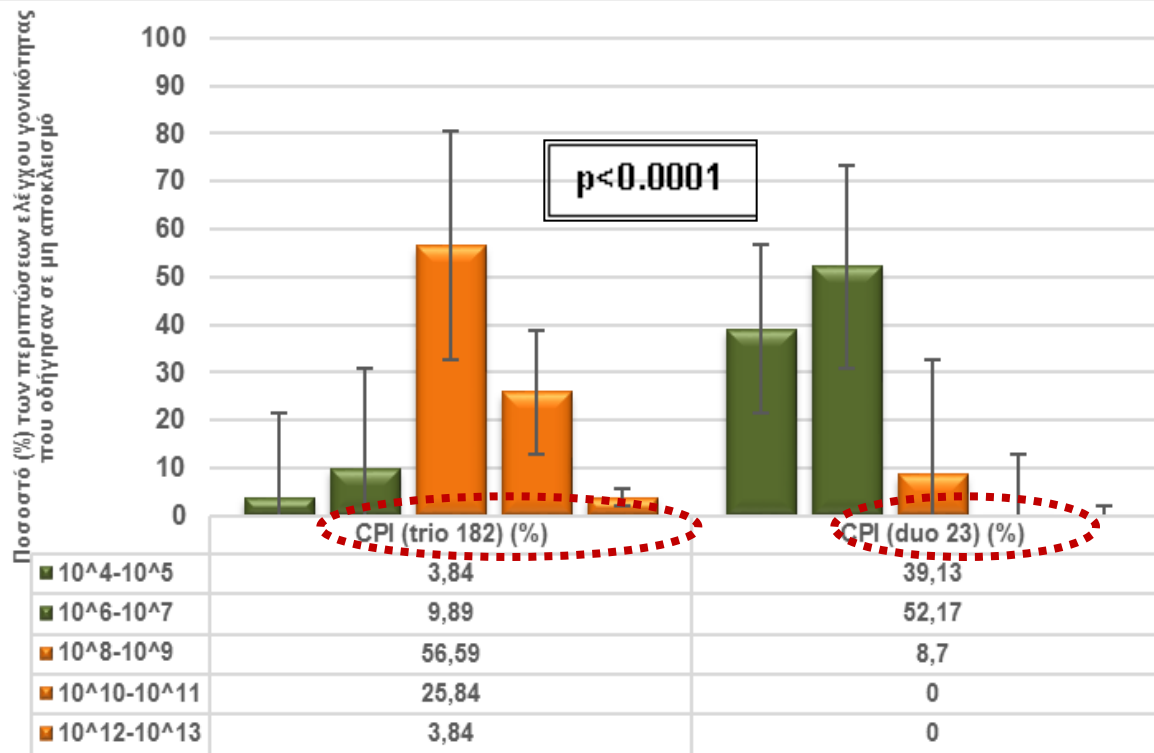
(182 trio και 23 duo)

η γονικότητα δεν

αποκλείστηκε

αποτελέσματα CPI (trio vs duo)

205 περιπτώσεις (182 trios vs 23 duos) μη αποκλεισμού



PE : Power of Exclusion

0.999983230348 (duo)

έως 0,999999999999

(trio)

Θετική/ισχυρή απόδειξη
συγγένειας

RMNE: Random Man
not Excluded

1,14 × 10⁻⁵ (duo) έως

9,64 × 10⁻¹³ (trio)

(p< 0.0001),

(RMNE< 0,01 για κάθε

aSTR)

υποστηρίζουν την

υπόθεση της συγγένειας

ο δείκτης CPI κυμάνθηκε από 4,39 × 10⁴:1 (duo περίπτωση)

έως 6,76 × 10¹³:1 (trio περίπτωση)

στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ duo και trio (p<0,0001)

ποσοστό CPI με τιμές ≥10⁸:1 ήταν το μόλις 8,7% (duo) έναντι 86,27% (trio)

αποτελέσματα

aSTR αλληλικές ανομοιότητες

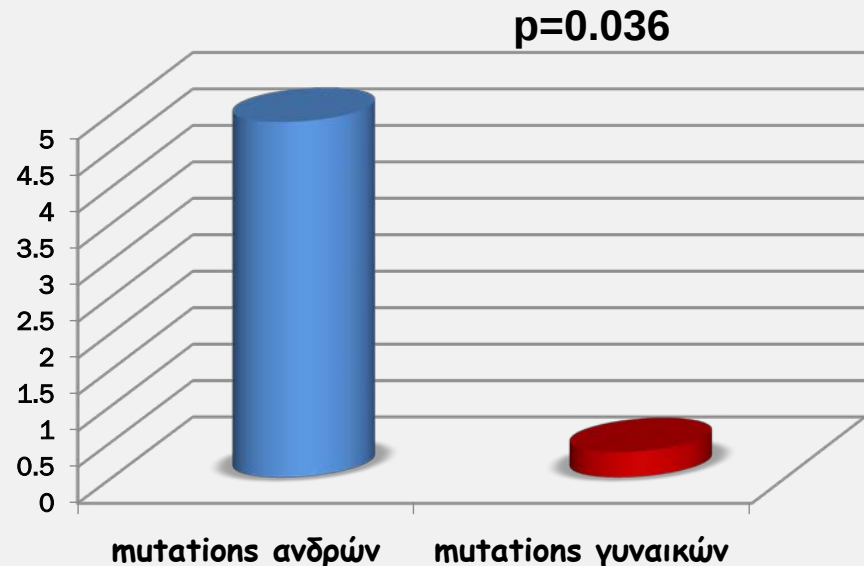
	STR γενετικός τύπος	Γεν. προφίλ Πατέρα	Γεν. προφίλ Μητέρας	Γεν. προφίλ Παιδιού	Πιθανή Μετάλλαξη	Προσθήκη/ Απώλεια τετρανουκλ. Χρωμοσωμιακή εντόπιση	Μετατοπίσεις (step mutation)	Φύλο/Ηλικία (έτη)
1	D12S391 (mutation)	22, 24	19.3, 22	19.3, 23	22→23 ή 24→23	AGAT complex 12p13.2	single-step	άνδρας/28
2	D12S391 (mutation) motherless	21, 24		20, 20	21→20	AGAT complex 12p13.2	single step	άνδρας /35
3	vWA (mutation)	16, 19	16, 17	17, 18	19→18	TCTA complex 12p13.31	single-step	άνδρας /35
4	D10S1248 (mutation)	14, 17	15, 15	15, 16	17→16	GGAA 10q26.3	single-step	άνδρας /45
5	SE33 (mutation)	18, 20	20, 34	19, 34	18→19 ή 20→19	AAAG complex 6q14	single-step	άνδρας /45
6	D2S1338 (mutation)	24, 25	16, 24	23, 25	24→23	TGCC complex 2q35	single-step	γυναίκα/27
7	vWA (mutation) motherless	17, 20	-	18, 19	17→18 ή 20→19	TCTA complex 12p13.31	single-step	άνδρας /33
8	SE33 (null allele)	35, 35	12, 16	16, 16	-	AAAG complex 6q14	-	άνδρας/29
9	D8S1179 (mutation)	13, 13	12, 12	12, 14	13→14	TCTA complex 8q24.13	single-step	άνδρας /47
10	vWA (mutation)	17, 19	16, 18	18, 20	19→20	TCTA complex 12p13.31	single-step	άνδρας /41
11	FGA (mutation)	19, 23	20, 23	22, 23	23→22	TTTC complex 4q28	single-step	άνδρας /35
12	SE33 (mutation)	17, 25.2	19, 28.2	19, 24.2	25.2→24.2	AAAG complex 6q14	single-step	άνδρας /39
13	D3S1358 (mutation)	15, 18	18, 18	18, 19	18→19	TCTA complex 3p21.31	single-step	άνδρας /41
14	SE33 (mutation)	28.2, 33.2	22.2, 28.2	28.2, 32.2	33.2→32.2	AAAG complex 6q14	single-step	άνδρας /41
15	D12S391 (mutation)	16, 21	22, 22	20, 22	21→20	AGAT complex 12p13.2	single-step	άνδρας /31

αποτελέσματα aSTR αλληλικές ανομοιότητες

15/205 (7,32%)

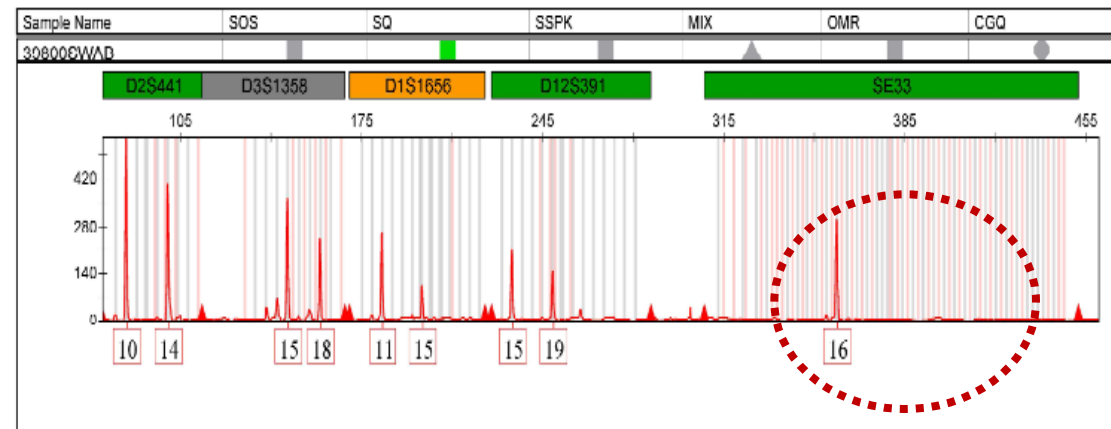
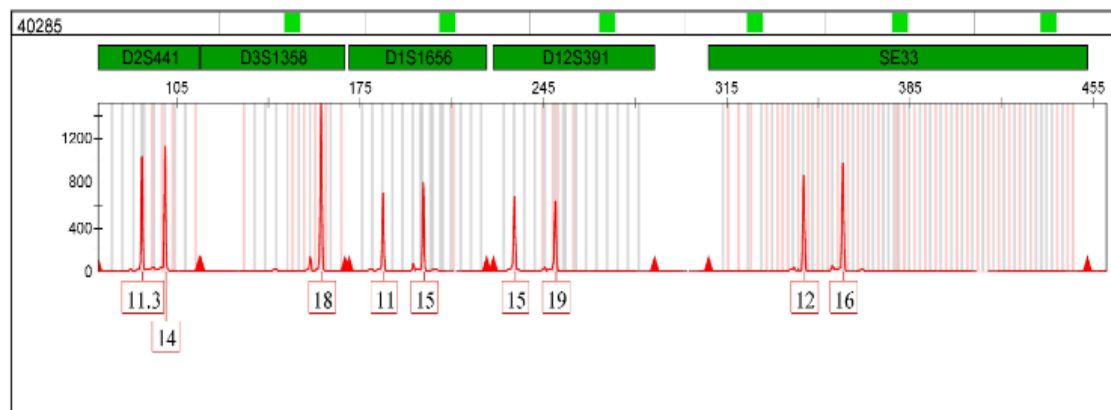
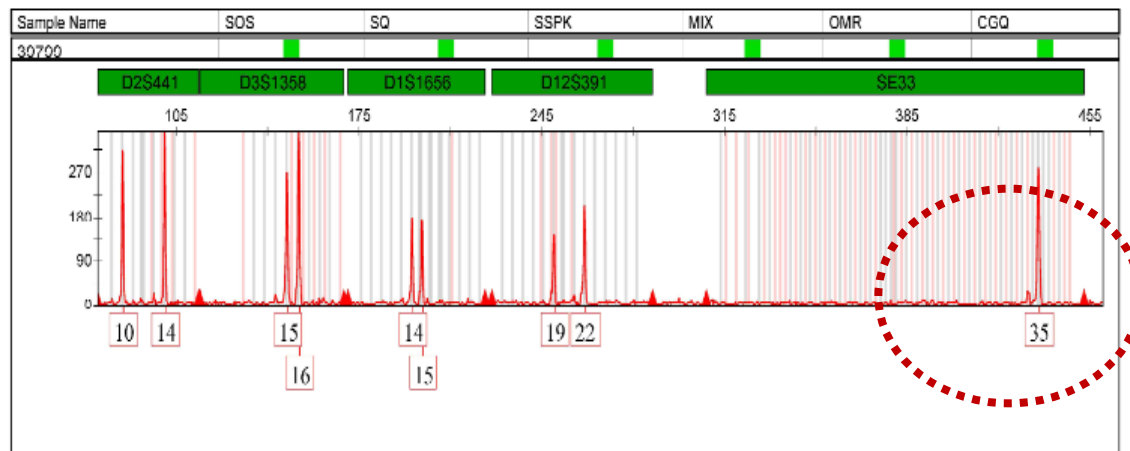
διαφορά πατρικής vs μητρικής
aSTR μετάλλαξης στο σύνολο
των ελεγχθέντων ατόμων

Μεταλλάξεις ανδρών n (%)	Μεταλλάξεις γυναικών n (%)	p-value
14 (4,88%)	1 (0,35%)	0.036



Πιθανή διαφορά πατρικής vs μητρικής μετάλλαξης

total = 287



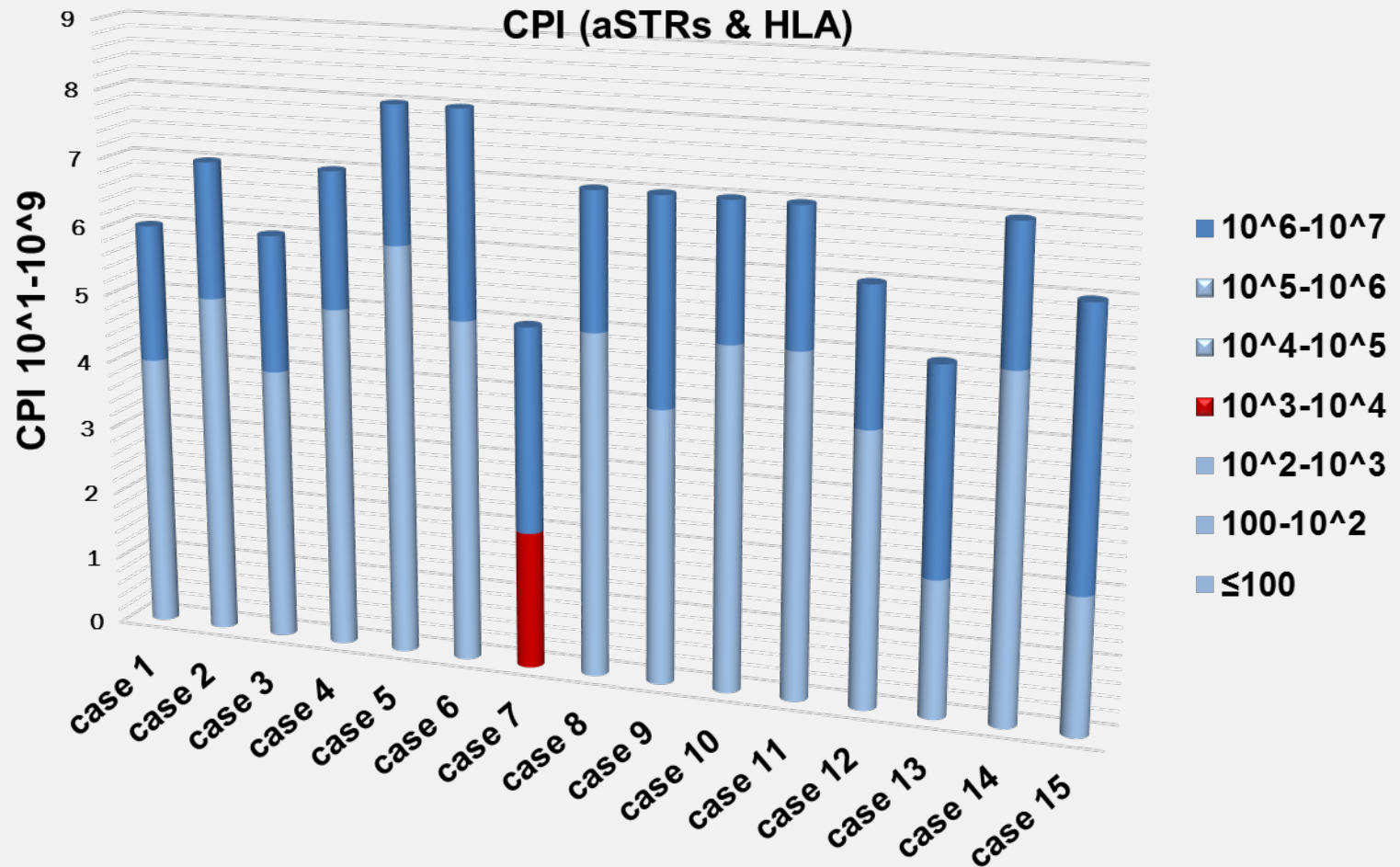
Αλληλική ανομοιότητα στον SE33 αSTR γενετικό τόπο μεταξύ του "Φερόμενου ως Πατέρα, ΦΠ" (ID:39799) και του παιδιού (ID:39800SWAB).

(Πιθανό **σιωπηλό (null)** αλληλίο: SE33 35→16).

Βιολογική μητέρα (ID:40285).

Η πατρότητα δεν αποκλείεται

αποτελέσματα aSTR αλληλικές ανομοιοότητες



η ανάλυση του DNA γενετικού προφίλ

✓ σπουδαίο εργαλείο:

διελεύκανση υποθέσεων αμφισβητούμενης γονικότητας

παρέχει επαρκώς τεκμηριωμένα δεδομένα για trio δοκιμασίες

με δυνατότητα επίλυσης περιπτώσεων συγγένειας έως και 2^{ου} βαθμού

✓ **16 aSTRs:**

- ακριβής, γρήγορη, αναπαραγώγιμη, υψηλής ευαισθησίας, χαμηλού κόστους δοκιμασία
- απλούστερη, ταχύτερη, με μεγαλύτερη ακρίβεια ελέγχου vs HLA

ο συνδυασμός των δύο συστημάτων (HLA & STRs) παρέχει

- υψηλότερη πληροφόρηση
- μειώνει την πιθανότητα ψευδούς αποκλεισμού
(λόγω *aSTRs* μεταλλάξεων/σιωπηλών αλληλίων)
- ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο εσφαλμένου μη αποκλεισμού
(λόγω απουσίας του γενετικού προφίλ του ενός γονέα)

**προτείνεται ο έλεγχος και των 2 γονέων
σε όλες τις περιπτώσεις**

Ευχαριστώ για την προσοχή σας

