

EXAMENUL DE LABORATOR AL PROBELOR BIOLOGICE

- 14.1. Examenul petelor de sânge - biol. **Elisabeta Vasilescu** — 640
 - 14.1.1. Reacții de probabilitate — 640
 - 14.1.2. Reacții de certitudine — 641
 - 14.1.3. Determinarea speciei din probele biologice — 643
 - 14.1.4. Determinarea grupei sanguine ABO în petele de sânge, sânge de calavru, țesuturi, secreții — 645
- 14.2. Examenul petelor de spermă-biol. **Elisabeta Vasilescu** — 652
 - 14.2.1. Examenul macroscopic — 652
 - 14.2.2. Examenul petelor de spermă în lumina ultravioletă — 652
 - 14.2.3. Reacții microcristalografice — 652
 - 14.2.4. Reacția fosfatazei acide — 653
 - 14.2.5. Metodele de certitudine — 653
 - 14.2.6. Stabilirea grupei sanguine în petele de spermă — 655
- 14.3. Examenul altor pete biologice-biol. **Elisabeta Vasilescu** — 656
 - 14.3.1. Pata de meconiu — 656
 - 14.3.2. Petele de secreție glandulară — 656
 - 14.3.3. Alte pete - excreții — 657
- 14.4. Examenul firelor de păr-biol. **Elisabeta Vasilescu** — 658
 - 14.4.1. Stabilirea speciei firului de păr — 659
 - 14.4.2. Firele de păr uman - particularități — 660
 - 14.4.3. Determinarea caracterelor individuale — 661
- 14.5. Identificarea după amprenta dentară - Conf. Dr. **V. Panaiteșcu** — 661
- 14.6. Tehnologia ADN în practica medico-legală - Prof. dr. **VL Bellș**, conf. dr. **V. Panaiteșcu** — 662
 - 14.6.1. Noțiuni preliminare — 662
 - 14.6.2. Principii generale de lucru — 663
 - 14.6.3. Etapele tehnice ale analizei amprentei genetice prin enzime de restricție — 665
 - 14.6.4. Problemele medico-legale privind amprenta genetică — 669
 - 14.6.5. Metoda reacției în lanț a polimerazei — 670
 - 14.6.6. Controverse și critici actuale — 672
 - 14.6.7. Concluzii — 675

Examenul de laborator al diferitelor probe biologice are deosebită importanță în elucidarea multor cauze judiciare, fiind

necesar să se determine pe diferite obiecte, reprezentând corpurile delictive, prezența sângelui, apartenența de specie și grupă

sanguină, prezența spermei sau a altor produse biologice pe de o parte și determinarea grupei sanguine a fragmentelor sau cadavrelor neidentificate.

Pentru ca rezultatele examenelor de laborator să reflecte în măsura posibilului adevărul, este necesară respectarea unor reguli în ceea ce privește recoltarea și conservarea urmelor biologice (în special cele de sânge). De la locul faptei trebuie reținute obiectele care prezintă semnificații pentru anchetă, iar cele purtătoare de pete suspecte a fi de sânge trebuie ambalate separat. De asemenea este esențial ca obiectele să fie ambalate numai după o uscare totală, care să se facă departe de surse de căldură directe. Petele de pe suporturi ce nu pot fi deplasate se vor ridica pe cât posibil cu așchii din suport, sau dacă natura acestuia nu permite, prin raclare cu o lamă de ras sau bisturiu. Este neindicată recoltarea prin ștergere cu fragmente de tifon sau vată-umectată, deoarece astfel se favorizează distrugerea substanțelor de grup sanguin.

Pentru fiecare caz este necesară recoltarea în paralel și a unei probe de sânge de la cadavru, victimă și bănuț când există, constând în 2-5 ml sânge intravenos (la persoanele vii sau din cord (la cadavre), fără anticoagulant. Nu este indicat să se compare rezultatele cu grupele de sânge din buletinele de identitate, acestea putând fi greșit menționate în buletin.

14.1. EXAMENUL PETELOR DE SÂNGE

Biol. ELISABETA VASILESCU

O bună expertiză presupune în primul rând orientarea expertului asupra petelor de pe corpurile delict. Acestea trebuie fotografiate color iar petele de sânge descrise și localizate. Forma, dimensiunile și aspectul petelor sunt foarte importante pentru orientarea anchetei.

Aprecierile asupra vechimii petelor de sânge sunt relative, deoarece transformările

depind și de natura substratului și a condițiilor de conservare. S-a încercat stabilirea vechimii petelor de sânge prin metode spectrofotometrice (cercetându-se transformările hemoglobinei) sau tehnici de electroforeză, dar rezultatele nu au dat rezultate precise.

În cercetarea corpurilor delict se impune o ordine a examenelor efectuate și anume: reacțiile de probabilitate, reacțiile de certitudine, apartenența de specie și determinarea grupei sanguine în pata de sânge.

14.1.1. Reacții de probabilitate

Reacțiile de probabilitate se caracterizează prin sensibilitate, rapiditatea de execuție și se bazează pe următorul principiu: unele substanțe colorante sunt incolore în stare redusă (leucobaze), iar în prezența unui sistem de oxidare format dintr-un peroxid (apă oxigenată) și o peroxidază (pigmentul sanguin - hemoglobina - format din patru nucleu pirolici legați prin fier), se recolorează. Reacțiile nu sunt toate absolut specifice pentru sânge, respectiv pot da rezultate pozitive și cu alte substanțe ca peroxidazele din diverse vegetale, lapte etc., cu unii catalizatori ca săruri de fier, cupru, nichel, cobalt, cu mulți compuși oxidanți (permanganati, bicromați etc.). Folosind două (minimum) sau trei reacții de probabilitate (mai sensibile și strict specifice) se elimină erorile prin apariția unor rezultate fals pozitive, concluzia trasă putând avea valoare de certitudine.

Prin testarea reacțiilor cu sânge cunoscut pentru a compara intensitatea și timpul de producere a reacției și prin folosirea de probe din suport nepătat, se poate diferenția o reacție pozitivă produsă datorită prezenței sângelui, de o reacție pozitivă obținută prin contact cu substanțe din categoriile menționate. De altfel și colorația unei reacții produse de alte substanțe decât sângele este mai slabă. O altă caracteris-

tică a acestor metode este cantitatea foarte mică de sânge utilizată, dat fiind marea lor sensibilitate.

a) **Reacția Adler.** Este o reacție extrem de sensibilă, fiind cea mai uzitată metodă în reacțiile de sânge. Ea poate da reacții pozitive în prezența oxidazelor vegetale (fragmente de plante, fructe etc.), a pământului, gunoiului (activitate bacteriană), a ruginii, permanganat de potasiu, formol etc.

Reactivul constă dintr-o soluție saturată de benzidină în acid acetic glacial și se folosește adăugându-se în părți egale picături de apă oxigenată 10%. În acest amestec se introduce fie o crustă sau fragment din materialul pătat, fie o picătură din maceratul din pată. Colorația obținută este albastru intens.

b) **Reacția Guarino.** Mai puțin sensibilă decât reacția Adler, are însă specificitatea mai mare. Reactivul se obține din 0,5 ml dimetil-anilină, 1 ml acid acetic glacial și 100 ml apă distilată. Adăugate în părți egale picături de reactiv și apă oxigenată 10% și apoi materialul de cercetat, se obține colorația galbenă.

Se lucrează cu martori pozitivi și negativi pentru diferențierea reacțiilor specifice de cele nespecifice.

c) **Reacția Kastle-Meyer.** Reacția cu phenolphaleină redusă: se observă o virare foarte rapidă și o colorație în roșu a soluției în mediu alcalin, ceea ce constituie o reacție pozitivă. Reacția este foarte sensibilă, iar reactivul se prepară din 2 g phenolphthaleină, 20 g hidroxid de potasiu anhidru, dizolvate în 100 ml apă distilată. Se introduc 20 g pulbere de zinc și se fierbe până se obține reducerea phenolphthaleinei. Reactivul este ușor incolor, și se păstrează pe depozitul de pulbere de zinc.

Reactivul mai poate da reacție pozitivă cu: compuși de fier, potasiu, nichel, iod etc.

d) **Reacția cu verde de leucomalachit** (Von Furth, Michel, modificată de Pierre Medinger).

Colorația pozitivă obținută este verde, foarte specifică. Poate da reacție pozitivă și cu compuși de nichel, fier, plumb, permanganat de potasiu, dar este negativă cu lichide organice ca salivă, spermă, urină, lapte, cu produse de origine vegetală.

e) **Reacția Van Deen cu tinctură de guaiac** dă o colorație pozitivă albastră în câteva secunde, dar are dezavantajul de a fi puțin specifică putând da reacții pozitive cu unele lichide organice (salivă, lapte), unele săruri minerale (sulfat de fier, potasiu), unele produse de origine vegetală (cartofi, făină, salată, prune).

Aceste reacții sunt importante pentru depistarea petelor de sânge, în efectuarea lor consumându-se o mică cantitate de sânge. De asemenea, ele sunt toate reacții de colorare, au o valoare de orientare în identificarea petelor de sânge, dar ele preced reacțiile de certitudine, care singure pot afirma prezența sângelui.

14.1.2. Reacțiile de certitudine

Acestea sunt: examenul microscopic, reacțiile cristalografice, spectroscopice, care pun în evidență elementele figurate ale sângelui, formarea cristalelor de anumiți derivați ai hemoglobinei, sau proprietăți spectroscopice ale acestora.

Proba morfologică

Examenul direct la microscop a petei de sânge de expertizat este metoda clasică, dar prezintă dezavantajul lizării rapide a hematiilor, mai ales în situația diluării în ser fiziologic, macerării și evaporării produsului de cercetat. Examinarea se face cu epimicroscopul (tip Ultropak), utilizând diverse soluții pentru regenerare.

Proba microcristalografică

Este una din metodele mai des folosite și se bazează pe proprietatea derivaților hemoglobinei de a forma, în anumite condiții, cristale caracteristice. După reactivii folosiți, această probă se poate realiza în mai multe variante specifice sângelui.

Reacția Teichmann. Se bazează pe formarea cristalelor de clorhidrat de hematină, care apar prin reacția dintre clorura de sodiu din sânge și hematină (rezultată din descompunerea hemoglobinei), în prezența acidului acetic. Metoda cuprinde trei timpi: macerarea petei, concentrarea acesteia prin uscare la cald (60°C) și cristalizarea după acțiunea acidului acetic glacial.

Maceratul foarte concentrat din pată se usucă pe lamă prin încălzirea la 60°C, fără a se ajunge la punctul de fierbere. După evaporarea completă se adaugă o picătură de acid acetic glacial și se acoperă cu o lamelă încălzindu-se ușor până la evaporarea incompletă a acidului acetic. Apoi lama se lasă la răcit proces care se produce rapid. Se repetă operația și se mai adaugă o picătură de acid acetic glacial pe marginea lamelei încă caldă. Apoi se răcește în aer și se observă la microscop.

Cristalele formate sunt brune închis sau brun-roșcate, translucide, având forma de prisme alungite (de 1-20 μ) sau romboidale, cu vârfurile ascuțite, unele grupate în formă de stea. Volumul lor depinde de modul de preparare, iar apariția cristalelor Teichmann denotă prezența sângelui. (fig. 14.1)

O altă metodă bazată pe formarea cristalelor de clorhidrat de hematină este metoda *Gabriel Bertrand*. Se realizează folosind reactivul Bertrand în locul acidului acetic glacial. Reactivul Bertrand conține: 1 gram clorură de magneziu cristalizată, 1 ml apă distilată, 5 ml glice-

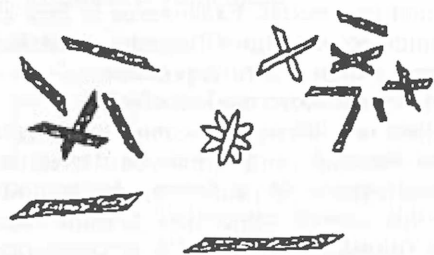


Fig. 14.1. - Cristalele Teichmann.

rină și 20 ml acid acetic glacial. Metoda de obținere a cristalelor este aceeași cu cea descrisă mai sus.

Reacția Stryzowski - pune în evidență prezența sângelui prin formarea cristalelor de iodhidrat de hematină, sub forma unor prisme mici romboidale. Reactivul trebuie preparat proaspăt și se utilizează asemănător tehnicilor descrise mai sus. Cristalele de hemocromogen (sau hematină alcalină redusă) se evidențiază prin metodele Lecha-Marzo sau Takayama sub forma unor cristale de culoare roșie, rombice sau ca ace inegale, grupate în diferite forme.

Metoda spectroscopică. Principiul metodei se bazează pe proprietatea de a absorbi din spectrul luminii anumite zone caracteristice de diferite lungimi de undă de către hemoglobină și derivații acesteia, observate cu ajutorul spectrofotometrului din maceratul petei de cercetat.

Hemoglobina produce o bandă de absorbție cuprinsă între zonele D și E cu lungimile de undă de 5893 Å și 5269 Å.

Oxihemoglobina prezintă două benzi de 5769-5770 Å distincte, iar carboxihemoglobina două benzi de absorbție cu lungimea de undă cuprinsă între 5709 și 5308 Å mai aproape de extremitatea violetă a spectrului.

În petele de sânge mai vechi se poate forma methemoglobina, cu patru benzi de absorbție, două cuprinse între 5800 - 5385 Å asemănătoare oxihemoglobinei, o alta la 6300 Å în zona roșu și ultima mai slabă 5000 Å

Hematina se găsește de asemenea în sângele din petele vechi. Spectrul său este mai greu vizibil, benzile având lungimea de undă cuprinse între 6300 Å și 5180 Å.

Hemocromogenul formează două benzi intense și foarte nete spre cele două extremități ale zonei galbene a spectrului, în zonele 5590 Å - 5600 Å și 5300 Å spre porțiunea verde.

Acestea apar și la diluții ale hemocromogenului de 1:17 000. (fig. 14.2)

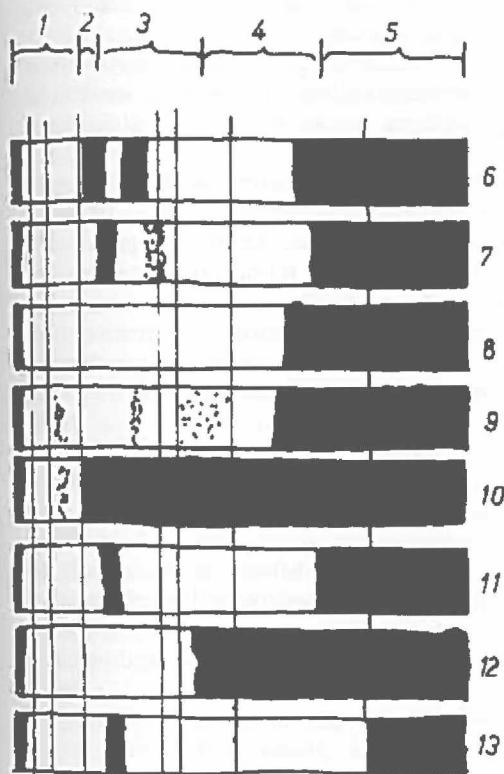


Fig 14.2. - Examenul spectroscopic pentru hemoglobină și derivați: 1- roșu; 2- portocaliu; 3- verde; 4- albastru; 5- violet; 6- oxihemoglobină; 7- carboxihemoglobină; 8- hemoglobină redusă; 9- metemoglobină; 10- sulfhemoglobină; 11- porfirină acidă; 12- hematina acidă; 13- hemocromogen.

În situația când cantitatea materialului de analizat este foarte mică se poate utiliza microspectroscopul, adaptat la orice microscop, în locul ocularului.

Metoda cromatografică propusă de Fiori se bazează pe cromatografia ascendentă (pe hârtie) pentru identificarea petelor de sânge prin evidențierea hemoglobinei și derivaților săi. Benzile se colorează cu benzedină, apă oxigenată 3%, de asemenea și fenoltaleină. Existența hemoglobinei și a derivaților săi se evidențiază prin apariția unui spot albastru

caracteristic sau roșu. Se lucrează cu probe martor de hemoglobină cunoscută.

Metoda electroforetică

Prezența sângelui în pete se poate demonstra și prin electroforeza pe hârtie a maceratului din pată. Această metodă necesită o concentrație a hemoglobinei de cel puțin 0,45%. Colorarea benzilor se face cu benzidină și apă oxigenată.

14.1.3 Determinarea speciei din probele biologice

O dată probată prezența sângelui în petele de cercetat se trece la cercetarea apartenenței de specie a sângelui. Aceasta se poate realiza prin mai multe metode, dintre care cele mai utilizate sunt cele imunologice.

Reacția de imunoprecipitare Uhlenhuth

Introdusă pentru prima dată de Uhlenhuth în 1901, ea se bazează pe reacția antigen-anticorp, metoda de preparare a serurilor constând în imunizarea iepurilor cu seruri normale ale speciei respective. Animalul inoculat cu o proteină de la un animal din altă specie produce anticorpi specifici antiproteinei care a fost inoculată. Se obțin astfel seruri anti-om, anti-bou, anti-pasăre, anti-oaic, anti-cal, anti-porc, anti-câine etc. care sunt puse în contact cu un macerat dintr-o pată de sânge. La nivelul dintre cele două apare un inel de precipitare alb lăptos. Serurile folosite trebuie să fie absolut specifice și să aibă titrul de minimum 1:20 000.

Tehnica de lucru: Fiecare antiser înainte de lucru se testează cu un martor pozitiv (macerat de sânge de aceeași specie) și cu martor negativ (macerat dintr-o specie diferită sau ser fiziologic simplu).

Se fac macerate în ser fiziologic din pata de cercetat până se obține aceeași colorație cu a antiserului. În situația când sângele este mai vechi, macerarea se face până la 24-48 ore, iar când sângele nu se dizolvă se adaugă 1 picătură amoniac.

Macerarea se face numai din pete uscate, prezența apei putând da reacții nespecifice. O colorație mai intensă a maceratului poate inhiba reacția, iar un macerat tulbure împiedică vizibilitatea inelului de precipitat. În această situație maceratul se filtrează sau se centrifughează.

Maceratul din pata de sânge (1 ml) se introduce într-o eprubetă cu un diametru cât mai mic (cca 5 mm). Cu o pipetă Pasteur efilată se introduce serul anti-om fie la fundul eprubetei, fie se prelinge pe peretele umețat al eprubetei, într-o cantitate de 0,5 ml. După timpul de reacție indicat în prospectul însoțitor al antiserului, la 15-20 minute, apare un inel de precipitare alburiu la limita de separare dintre antiser și macerat în cazul prezenței sângelui uman. Timpul de reacție poate fi prelungit în situația unor macerate foarte diluate de la 1 - la câteva ore. În eprubeta cu martor negativ nu se va obține nici un inel la limita de separație, iar martorul pozitiv indică calitatea serului în funcție de timpul de apariție a inelului. Uneori este necesar să se lucreze cu martori din substratul nepătat, ex. cenușa care poate da reacție de precipitare nespecifică.

În situația când în pata de cercetat nu s-a evidențiat sânge uman și este necesară precizarea speciei sângelui, se repetă reacția cu antiseriuri antianimale.

Specificitatea antiseriurilor se manifestă pozitiv în situația mai multor specii înrudite. Astfel, cu ser anti-om se obțin reacții de precipitare cu proteine de om și mai-muțe antropoide, cu ser anti-cal se obțin precipitări cu proteine de cal și măgar ș.a.

Reacția Uhlenhuth de imunoprecipitare, din punct de vedere al rapidității, siguranței rezultatelor și simplității tehnicii, este cea mai indicată dintre reacțiile biologice ce permit să se determine dacă petele de sânge sunt de origine umană sau animală.

Se poate efectua și *micrometoda Huber* care evidențiază reacția de precipitare între

lamă și lamelă la nivelul dintre picătura de macerat și picătura de antiser homolog.

În cazurile când maceratele sunt impure sau colorate cu taninuri, inelele de precipitare nu se pot vizualiza sau pot apare precipitări nespecifice. În această situație se pot executa alte metode dintre care mai indicată este metoda Ouchterlony de imunoprecipitare în geloză. În geloza turnată pe un suport se practică godeuri în care se introduc antiseriurile de diferite specii și maceratul din pată. La nivelul contactului antigenului din pată cu anticorpusul homolog va apare inelul de imunoprecipitare.

Tehnica de lucru este următoarea:

Se toarnă geloza 1,5% în plăci Petri cu diametrul de 10 cm, în strat de 3 mm grosime.

În geloza solidificată se decupează cu ajutorul unui perforator de dopuri, godeuri de 0,5 cm diametru, unul central și mai multe în jurul acestuia, distanța dintre ele fiind de 1 cm.

În fundul godeurilor se picură puțină geloză topită pentru a realiza cavități etanșe. În cavitatea centrală se introduce serul anti-om (sau alt antiser), iar în godeurile din jur se introduc maceratele de cercetat plus martorii (diluție de sânge uman cunoscut, diluție de sânge animal, macerat din suport nepătat).

Între godeul care conține antiserul și godeurile care conțin antigene homologe se produc arcuri de precipitare, după cca 36 ore, dar se pot citi după 2-3 zile (în acest interval plăcile trebuie să rămână umede, iar godeurile reumplute). Dacă plăcile trebuie păstrate, după terminarea reacției se spală în ser fiziologic 24 ore, pentru îndepărtarea proteinelor ce nu au intrat în reacție, se usucă în vase acoperite, la 37°C, pentru a nu se forma crăpături și se colorează cu Amidoschwartz, albastru de bromfenol sau azocarmin. Pentru a rămâne doar arcurile de precipitare colorate se înlătură restul colorației de fond prin spălări repetate cu

acid acetic, metanol, apă distilată. Apoi plăcile se usucă și pot fi păstrate.

Metoda imunoelectroforetică

Presupune obținerea de arcuri de precipitare ale proteinelor umane cu poziție caracteristică, utilizându-se ca substrat geloză tamponată, ser anti-om, martor pozitiv (ser uman), martor negativ (ser de animale) și maceratele respective.

Se execută godeuri în geloză de o parte și de alta a unor rezervoare longitudinale. În godeuri se introduc probele de cercetat și martorii. Probele sunt supuse unei migrări electroforetice timp de 4 ore. Se umplu apoi rezervoarele longitudinale cu ser anti-om și se lasă la incubat 1-2 zile, în camera umedă, timp în care între serul anti-om și fracțiunile proteice de origine umană se formează arcuri de precipitare. Citirea se face în funcție de martori.

Metoda inhibiției antiglobulinei a lui Coombs

Bazată pe principiul reacției antiglobulinice a lui Coombs metoda constă în aglutinarea hematiilor O Rh (D) pozitive învelite, de către serul antiglobulinic uman, serul Coombs. Dacă serul antiglobulinic este pus în contact cu un macerat de sânge uman, anticorpii din ser se saturează, iar serul antiglobulinic nu mai aglutinează eritrocitele învelite.

Metoda este mai laborioasă necesitând într-o fază inițială învelirea hematiilor O Rh (D) pozitive cu ser anti-D incomplet. Se spală apoi hematiile de 2-3 ori.

Se lucrează cu proba de cercetat, martor de sânge uman cunoscut și martor de sânge animal. Aceste probe se pun în contact cu ser Coombs până a doua zi. Adăugându-se eritrocitele învelite se observă că în prezența sângelui uman, eritrocitele nu mai sunt aglutinate, reacția putându-se evidenția până la o diluție a sângelui de 1:128.000, (după Dérobert). Aplicarea acestei metode este însă laborioasă, necesitând învelirea hematiilor.

Alte metode menționate în literatura de specialitate pentru determinarea originii

umane a sângelui sunt: metoda aglutinării hematiilor tanate în care acestea pot fixa antigene umane ce se pot detecta prin reacții de aglutinare, în prezența anticorpilor homologi din serul antiglobulinic uman (Coombs); metoda fixării complementului în care un antigen uman reacționează cu un antiser homolog cu fixarea complementului (în prezența complementului, serul hemolitic anti-ovine hemolizează eritrocitele ovine); metoda evidențierii proprietăților fibrinolitice sau metoda denaturării alcaline a hemoglobinei. Toate acestea sunt metode care folosesc reactivi numeroși, tehnici laborioase, ceea ce le face improprii în lucrul de rutină, având o aplicație mai mult în domeniul cercetării.

14.1.4. Determinarea grupei sanguine ABO în petele de sânge, sânge de cadavru, țesuturi și secreții

Determinarea grupelor sistemului ABO are o mare importanță în medicina legală, pe baza lor putându-se elucida multiple cazuri cu implicații între victime și agresori, în cazul petelor de sânge decelate pe diferite obiecte sau la fața locului. Pe baza lor se poate exclude o persoană, victimă sau agresor, atunci când prin determinarea antigenelor și aglutininelor acestea pot lipsi la una din părțile implicate. Sistemul ABO, caracterizat prin prezența antigenelor și aglutininelor este sistemul cu cea mai mare eficiență în cercetările medico-legale, aceste componente putând fi determinate și după intervale mai mari de timp. Pentru menținerea antigenelor și aglutininelor în petele de sânge sunt esențiale câteva elemente: vechimea petelor de sânge, condițiile de păstrare și natura suportului. Cu cât corpurile delictive sunt examinate mai repede, sunt uscate, ferite de surse de căldură, de umiditate, deci păstrate corespunzător, sunt șanse crescute de a putea

determina mai multe elemente. De asemeni un rol important îl are și natura suportului, printre suporturile conservante fiind supra-fețele lucioase ca: sticla, metalele inoxidabile etc. la fel și unele țesături, iar prin-tre cele neconservante, țesăturile de nylon, pământul, obiectele poroase etc.

În privința alterării aglutininelor și aglutinogenelor, unii autori afirmă că aglutininele se distrug mai repede, comparativ cu antigenele, însă se constată că în funcție de caracterele individuale ale celui care a produs pata de sânge, acestea pot să se distrugă diferit. Când nu se mai pot evidenția aglutinine, prin metode mai sensibile se pot determina antigenele. De asemenea, dintre antigene cel mai sensibil este antigenul H, urmat de antigenul A, pentru ca antigenul B să fie decelat chiar când celelalte s-au distrus.

În sângele de cadavru hemolizat, în timp ce se pot determina aglutininele, din cauza hemolizei antigenele se evidențiază mai slab.

În țesuturi determinarea antigenelor este legată de starea de conservare a acestora, antigenele putând fi determinate cu succes în țesuturi osoase cu o vechime de peste 100 de ani, în fanere și în țesuturi parenchimotoase (mușchi, piele) etc.

Aceasta are mare importanță în cazul cadavrelor neidentificate, exanghinate, a diferitelor schelete sau în cazul cadavrelor exhumate.

În secreții, în condiții bune de conservare (uscarea, suporturi absorbante) antigenele se mențin foarte bine, putând fi evidențiate chiar după o perioadă de câțiva ani.

În petele de sânge grupa sanguină se stabilește prin determinarea aglutininelor și a antigenelor. Aglutininele pot fi determinate prin metoda Lattes - o tehnică simplă, fiind puse în evidență cu ajutorul eritrocitelor test A și B. Eritrocitele A și B sunt aglutinate în prezența sângelui din

grupa O, care posedă ambele aglutinine, alfa și beta. Eritrocitele B sunt aglutinate de aglutinina beta din pată, ea caracterizând grupa A. Aglutinarea eritrocitelor A este realizată de aglutinina alfa, care caracterizează grupa B. Eritrocitele test A și B nu sunt aglutinate în prezența grupei AB, aceasta fiind lipsită de aglutinine. Ca tehnică de lucru metoda se realizează foarte ușor și anume: pe lama de sticlă notată se pun: fie 2 cruste de sânge raclate cu o lamă de bărbierit sau bisturiu, de pe suport, fie fragment de suport îmbibat cu sânge (țesături) etc. peste care se adăugă câteva picături de hematii (în suspensie 0,5% în ser fiziologic) A în stânga și B în dreapta. Deasupra se pune lamela, eliminând bulele de aer. Citirea se face după cca 15 minute la microscop. În acest interval de timp în jurul crustei se formează un halou roșcat, în jurul lui grupându-se aglutininele corespunzătoare grupelor de sânge din pată.

În situația evidențierii aglutininelor alfa și beta se poate aprecia (dacă nu este amestec de sânge) că sângele din pată aparține grupei O. Dacă se evidențiază o singură aglutinină fie alfa fie beta, pentru precizarea grupei trebuie pus în evidență antigenul corespunzător, efectuându-se metoda absorbției eluției (sau altă metodă) de evidențiere a antigenelor. De asemenea, dacă nu s-a evidențiat nici o aglutinină, se efectuează metoda absorbției-eluției pentru a se preciza dacă este grupa AB sau aglutininele din pată s-au distrus. Când nu se pot evidenția nici aglutinine nici antigene, grupa sângelui din pată nu se poate preciza. Sângele provenit de la nou născuți nu conține aglutinine (acestea apar în primele luni de viață extrauterină); de asemenea titrul aglutininelor scade cu vârsta. (fig.14.3).

Metoda absorbției-eluției se bazează pe proprietatea antigenelor din pete de a absorbi anticorpii homologi din ser. Antigenele se pun în evidență prin elu-

darea anticorpilor și reacționarea corespunzător cu suspensiile eritrocitare A, B și O adăugate.

56°C. Se scot apoi fragmentele textile și se adaugă suspensie eritocitară A, B, și O 5 % albuminată (1 %), (pentru O suspen-

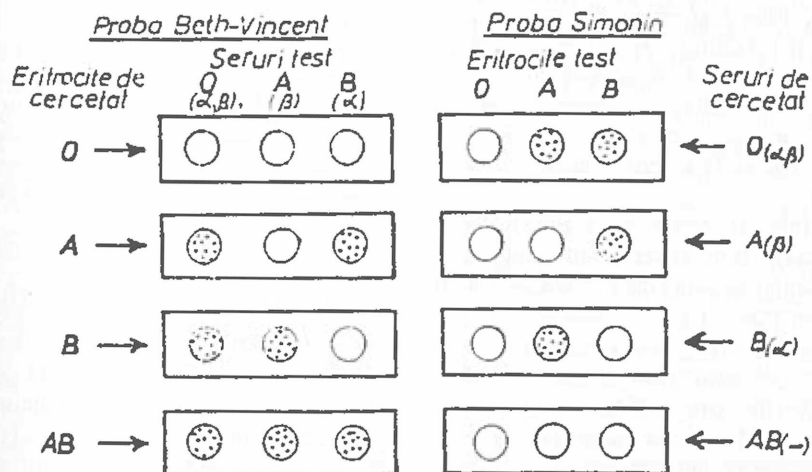


Fig. 14.3. - Apartenența de grup a petei de sânge (legenda la desen).

Tehnica absorbției-eluției este îmbunătățită de Kind, iar Nickolls și Pereira (1962) utilizează cea mai avantajoasă metodă necesitând cantități mici de material pătat.

Se poate efectua fie în tub, fie pe o placă cu godeuri, timpul de absorbție la metoda în tub fiind de 24 ore la +4°C.

Pentru metoda în tub, fragmentele de material pătat, precum și fragmentul nepătat se fixează cu alcool metilic. Se lucrează în paralel cu probele de cercetat și cu martori cunoscuți de grupă O, A, B și AB. Fragmentele fixate se introduc în tuburi, apoi se pun seruri anti-A, anti-B și fitaglutinina anti-H pentru absorbție. (Metoda se poate efectua și fără evidențierea antigenului H avându-se în vedere că el este conținut de fiecare grupă sanguină și se degradează primul dintre antigenele sistemului ABO). A doua zi se îndepărtează serurile, se spală probele cu ser fiziologic rece de 7-8 ori, se adaugă 2 picături de ser fiziologic și se pun la eluat timp de 20 minute la temperatura de

sia se face în apă sărată). Aglutinările se citesc după 1-2 ore, ele corespunzând aceluiași antigen ca și cel prezent pe hematiile adăugate.

Pentru metoda în godeuri, fibre din suportul pătat, precum și fibre martor nepătat, ca și martori de probe O, A, B, AB cunoscute, sunt fixate și plasate în godeurile unor plăci de sticlă. Se adaugă antiserurile anti-A, anti-B și anti-H. Se lasă la absorbit timp de 2-3 ore, se îndepărtează antiserurile și se spală de 3-5 ori cu ser fiziologic rece. Se adaugă suspensii eritocitare corespunzătoare 5% cu adaus de albumină bovină 1%. Se acoperă, se eluează 20 minute la 56°C. Se lasă la temperatura camerei 60 minute, pentru a favoriza aglutinarea eritrocitelor test în contact cu aglutininele homologe eluate. Citirea se face la microscop sau cu ochiul liber.

Metoda absorbției-eluției este o metodă extrem de sensibilă, necesită puțin material de cercetat, dar suportul pe care s-a produs pata uneori poate fi murdar,

îmbibat cu alte produse biologice sau materialul ca atare putând să absoarbă nespecific. O atenție deosebită trebuie acordată îmbibării cu transpirație, care nu este determinată de gena secretoare, și se pune în evidență suprapusă peste pata de sânge de pe țesătură. De aceea o condiție esențială este lucrul în paralel cu martori nepătați din același material care să conțină aceleași substanțe organice sau minerale, sau să fi suferit aceleași infestări biologice.

Metodele de absorbție-eluție și aglutinarea mixtă precizează apartenența unei pete de sânge la una din grupele A sau B putându-se preciza grupa când s-au determinat prin metoda Lattes și aglutinele homologe; de asemenea grupa AB când prin Lattes nu s-au evidențiat aglutinine, iar prin absorbție-eluție antigenele A și B.

În cercetarea petelor de sânge adesea intervin factorii de degradare a unor elemente caracteristice grupelor sanguine. De aceea interpretarea expertului trebuie făcută cu multă prudență abia după efectuarea metodei de determinare a aglutininelor, coroborată cu rezultatele corespunzătoare obținute prin metoda absorbției-eluției de determinare a antigenelor.

Alte metode de determinarea antigenelor bazate pe principiul absorbției sunt metoda Siracusa și metoda Holzer. Metoda absorbției folosește capacitatea aglutinogenelor existente în maceratele din petele de cercetat de a absorbi specific izoaglutininele din serurile test. Se poate aprecia prezența unui aglutinogen prin scăderea semnificativă a titrului aglutininei corespunzătoare, după ce proba cu pata biologică a fost în contact cu serurile A, B, și H și s-a produs absorbția.

Se utilizează seruri cu titrul de 1/256 și reactiv anti-H obținut din Eronymus europaeus.

Această metodă se aplică asupra fragmentelor pătate cu sânge dar mai ales asupra fragmentelor cu secreții organice.

Titrul antigenelor din sânge (1/8-1/32) fiind mult mai mic decât al antigenelor din secreție (1/128-1/1024), acestea se evidențiază mai greu prin această metodă. Ea se aplică cu rezultate foarte bune la evidențierea antigenelor din secreții: salivă, spermă, secreție traheo-bronșică ș.a.

Metoda se lucrează în paralel cu martori de ser A, B și H și cu martori nepătați din fragmentele de material. Se poate lucra și cu macerat din petele respective, în acest caz putându-se renunța la martorul nepătat.

Se pun în contact fragmentele de material pătat cu aceste seruri și după 24 ore de contact, în care se realizează absorbția, se litrează serurile pe 8 sau 12 trepte. O scădere a titrului aglutininelor de cel puțin 3-4 trepte denotă prezența antigenului.

În cazul metodei Holzer se folosește ser de grup O, atât în locul serului A cât și al serului B, aglutininele din serul O reacționând în funcție de hematiile test adăugate și absorbția obținută. Este recomandabilă metoda Siracusa, cu seruri A și B deoarece serurile din grupa O pot conține unele fracțiuni de anticorpi, putând da absorbții nespecifice.

Determinarea grupei sanguine în sânge de cadavru se poate efectua prin metodele Beth Vincent, Lattes și absorbție-eluție. Metoda Beth Vincent de determinare a antigenelor utilizează anti-seruri cunoscute A, O și B, peste care se adaugă hematiile de cercetat. Prezența aglutinărilor indică antigenul din hematiile de cercetat care au reacționat cu aglutininele din serul respectiv. După evidențierea antigenului se cercetează și aglutinina corespunzătoare prin metoda Lattes. Numai coroborând cele două rezultate expertul poate face interpretarea. În probele de sânge putrefiate sau hemolizate, în care se obține numai o aglutinină, fără a fi detectat și antigenul respectiv prin metoda Beth Vincent, se efectuează și altă metodă de determinare a antigenelor, de exemplu metoda absorbției-eluției. Un fragment de

material (care nu absoarbe nespecific) se îmbibă cu sânge, se usucă la temperatura camerei, se fixează și se practică metoda absorbției-eluției. Aceasta fiind mult mai sensibilă poate evidenția antigenul corespunzător aglutininei găsite. În situația când prin metoda Lattes nu s-au evidențiat aglutinine, iar prin metoda Beth-Vincent nu s-au evidențiat antigene, metoda absorbției-eluției poate pune în evidență fie un antigen, fie ambele antigene în cazul grupei AB.

Determinarea grupei sanguine în țesuturi se realizează cu ajutorul metodei absorbției-eluției evidențiindu-se antigenele localizate la nivelul membranei celulare.

Tehnica de realizare a metodei se aplică în funcție de țesutul cercetat, acesta putând fi țesut osos, țesut parenchimatous sau fanere. O condiție esențială este îndepărtarea din fragmentele de țesut supuse expertizării a surplusului de grăsimi, lichide biologice, sau factori microbieni și impurități. Fragmentele bine degresate, decupate pe măsura eprubetelor sau a godeurilor în care se lucrează, se pun la absorbit timp de 24 ore la + 4°C cu seruri anti-A, anti-B și fitaglutinina anti-II. A doua zi se fac 7-8 spălări cu ser fiziologic rece, se adugă 2-3 picături de suspensie eritocitară A, B și O 3% cu adaos de albumină bovină 1%. Se eluează la 56°C timp de 20'. Se îndepărtează fragmentul de țesut. Se lasă la temperatura camerei și se citește după 1 oră.

Aglutinările denotă prezența antigenelor care se evidențiază corespunzător hematiilor adăugate.

Determinarea grupei sanghine în firele de păr se efectuează de asemenea prin metoda absorbției-eluției în modul următor: firele de păr cu lungime de minimum 6 cm pentru fiecare probă se degresează cu apă și săpun, se trec prin amestec în părți egale alcool etilic, eter etilic timp de 10 minute. Se decolorează cu o soluție de 30 ml perhidrol, 15 ml amoniac, 30 ml apă distilată timp de 15 minute, se usucă

pe hârtie de filtru, se spală de 3 ori cu apă distilată, de fiecare dată absorbindu-se pe hârtie de filtru.

Firele de păr se strivesc cu pistil de agat pe un suport de oțel inoxidabil, bine lustruit. Unii autori indică și o metodă de șmirgheluire a suprafeței firelor înainte de strivire. Fragmentul de păr strivit se despică cu un ac spatulat în 3-4 părți, și se detașează fragmente de 2-3 mm, până la terminarea întregului fir. Se pregătesc eprubete pentru ser anti-A și ser anti-B și pentru martori de fire de păr de grupe cunoscute O, A, B, AB. Se introduc câte cca 3 cm de fir de păr strivit în eprubete. Se adaugă câte 3 picături de ser anti-A și anti-B. Se lasă la absorbit 24 ore la +4°C. A doua zi se fac 5-7 spălări cu ser fiziologic rece. Se adaugă suspensie de hematii A și B 3%, albuminate, câte 2 picături. Se eluează 20 minute la 56°C. Se scoate supernatantul și se citesc aglutinările după 2-3 ore la temperatura camerei. Evidențierea antigenelor în firele de păr ridică unele probleme întrucât chiar în probele experimentale există rezultate incerte. Interpretarea rezultatelor trebuie să se facă cu multă prudență, de ex. dacă nu s-au evidențiat antigene s-ar putea aprecia că firul de păr poate aparține grupei O, dar este posibil ca antigenele să nu fie evidențiate. O altă metodă de determinare a grupei sanguine în firul de păr propusă de Boettcher și Kay (1973) o constituie tehnica tratării firelor de păr cu anticorpi marcați și fixarea imaginii pe film, după dezvoltare obținându-se imagini individuale caracteristice.

Sursa antigenelor ABO în firele de păr nu este clară. Ele pot fi identificate prin aceeași metodă și în foliculii părului, în teaca externă a rădăcinii. Testându-se indivizi nesecretori s-a concluzionat că prezența antigenelor ABO în firele de păr este independentă de statusul secretor, ceea ce corespunde și cu rezultate obținute de Yada ș.a. (1966).

În afara grupelor sistemului ABO în petele biologice se cercetează și alte grupe

eritrocitare, care formează obiectul multor cercetări, găsindu-se tehnici cât mai adecvate caracterului fiecărui antigen.

* *Antigenele M și N* sunt bine detectate în petele de sânge prin metoda absorbției-eluției propusă de Pereira (1971), care a întreprins ample studii privind această problemă semnalând și dificultățile întâmpinate în determinarea acestor factori. Fragmente de pată sunt puse la absorbit cu seruri anti-M și anti-N. Antigenele din pată absorb anticorpii din ser, care prin eluare reacționează cu hematiile M și N adecvate. Antigenul din pata de sânge va fi cel corespunzător hematiilor adăugate cu care au aglutinat.

O atenție deosebită trebuie acordată interpretării, avându-se în vedere posibilitatea unei ușoare reactivități încrucișate. În acest sens se lucrează cu martori cunoscuți, seruri bine selectate și se iau în considerație doar aglutinările puternice.

* *Antigenele din sistemul Rhesus* deși mai slabe și mai sensibile decât cele din sistemul ABO și MN se pot detecta prin metoda absorbției-eluției (Pereira și Bargagna, 1966) în mediu albuminat. Eritrocitele test trebuie să fie proaspete și recoltate de la indivizi homozigoți. S-au pus astfel în evidență toate antigenele acestui sistem: C, CW, c, D, E și e.

* *Antigenul Kell* a fost demonstrat în pete de sânge de Jones și Diamond, (1955) și apoi de Ducos (1957). Acesta a cercetat influența diferiților parametri asupra rezultatelor (cantitatea sângelui din pată, titrul serului anti-Kell, vechimea petelor, utilizând metoda absorbției la 37°C. S-a reușit detectarea antigenului K în pete vechi de până la 60 zile.

Prin aceeași metodă s-a reușit detectarea antigenelor din sistemele Duffy și Kidd. Rezultatele sunt însă relative.

Enzime eritrocitare. Fosfataza acidă eritrocitară

Hopkinson, Spencer și Harris au descoperit în 1963 polimorfismul electroforetic al acestei enzime.

Prezintă șase fenotipuri: A, AB, B, AC, BC și C cu frecvențe care fac utilă cercetarea lor în scopuri medico-legale.

Decelarea lor în pete este slabă, putându-se obține rezultate pozitive în pete care au o vechime de numai 6-10 zile.

Este de remarcat că activitatea enzimatică variază cantitativ de la un fenotip la altul, cea mai scăzută fiind cea a fenotipului A, urmat de AB.

* *Fosfoglucomutaza (P.G.M.)*

Spencer, Hopkinson și Harris, în 1964 au descoperit polimorfismul electroforetic al acestei enzime. Ea este caracterizată de cele 3 fenotipuri P.G.M.1, P.G.M.2 și P.G.M.2-1. Se poate determina atât în sânge proaspăt, cât și în sânge lichid conservat mai multe zile, chiar câteva săptămâni, fiind mai stabilă decât fenotipurile fosfatazei acide. În pete se poate determina până la o vechime de 1-3 luni, în funcție de natura suportului.

Adenilatkinaza

Este de asemenea o enzimă care prezintă polimorfism electroforetic, demonstrat de Fildes și Harris (1966), prezentând 3 fenotipuri: AK 1, AK 2, AK 2-1.

Ea prezintă un grad mai mare de conservare ca PGM, putând fi determinată în pete cu o vechime până la 5 luni.

Proteine serice

Sistemul de grupe *gamaglobulinice Gm* a fost descoperit de Grubb și Laurell în 1956 și cuprinde 27 factori.

Dintre factorii sistemului Gm în scopuri medico-legale prezintă importanță factorii Gm (1) și Gm (2).

Determinarea factorului Gm (1) în petele de sânge se realizează prin metoda inhibiției hemaglutinării (după Ducos) cu seruri anti-Gm (1) și hematii O Rh (D) pozitive, învelite.

Se efectuează un macerat din pată, făcându-se mai multe diluții. Aplicându-se metoda pe diluții în funcție de concentrația serului anti Gm (1), în prezența martorilor pozitivi și negativi cunoscuți, se constată care este diluția din pată optimă pentru obținerea rezultatului bun. În funcție de

natura suportului, factorul Gm (1) se poate evidenția în pete de la 1-3 săptămâni. Foarte rar mai poate fi evidențiat în pete mai vechi.

Frecvența factorului Gm (1) în populație [Gm (+1) = 34,33% și Gm (-1) = 65,67%] precum și stabilitatea lui permit utilizarea în expertizele cu profil de serologie medico-legală.

Interpretarea rezultatelor trebuie făcută cu prudență, un rezultat negativ putând să reprezinte lipsa factorului Gm (1), dar și o posibilă neevidențiere a lui sau distrugere.

De asemenea trebuie luate în vedere posibilele reacții nespecifice, datorate îmbibării suportului cu anumite substanțe organice sau anorganice.

Sistemul haptoglobinic este reprezentat printr-o alfa 2 globulină caracterizată prin capacitatea de a fixa hemoglobina.

Smithies a demonstrat, folosind metoda electroforezei în gel de amidon, că haptoglobinele prezintă trei fenotipuri, deosebite după numărul benzilor și viteza de migrare: Hp 1, Hp 2 și Hp 2-1.

S-au făcut multe cercetări privind determinarea haptoglobinelor în petele de sânge, rezultatele pozitive însă scăzând în funcție de timp și conservarea petei. De exemplu Heifer a putut evidenția tipul haptoglobinic după 2 zile de conservare la 13 din 20 de probe, iar după 14 zile la 8 din 20 probe.

Tehnica de determinare a haptoglobinelor în pete este electroforeza în gel de amidon sau acrilamidă.

Se efectuează un macerat din pată în hemoglobină, folosindu-se un tampon borat cu pH 8,4-9,1. Pereira (1971) făcând considerații asupra metodelor utilizate în decelarea grupelor haptoglobinice în petele de sânge, arată că unul din inconveniente principale îl constituie excesul de hemoglobină, care are un efect de mască, deformând schema electroforetică.

Unii autori recomandă metoda imuno-electroforezei care permite obținerea unor arcuri definite, atunci când sunt cercetate

pete proaspete, dar nu dă rezultate în cazul petelor vechi.

Mai indicată este metoda electroforezei în coloană de gel de acrilamidă, care permite o separare a haptoglobinelor de excesul de hemoglobină care migrează spre extremitatea plăcii.

Un alt sistem de grupe serice Gc (*grup specific component*) descoperit de Hirschfeld (1959) se evidențiază prin imuno-electroforeză. Se folosește ca ser anti-Gc un ser preparat prin imunizarea pe iepuri.

Proteina Gc este o alfa 2-globulină. Fenotipul Gc 1 produce față de un ser anti-Gc un arc de precipitare departe de punctul de start, fenotipul Gc 2 un arc de precipitare în apropierea startului, iar fenotipul Gc 2-1 un arc de precipitare dublu. Grupele Gc prezintă aceeași specificitate antigenică, dar diferă prin viteza de migrare în câmpul electric reacția antigen-anticorp servind la localizarea proteinei.

Globulinele Gc sunt foarte labile în petele de sânge total, putând da arcuri cu poziție mai anodică, care slăbesc o dată cu învechirea sângelui, până la dispariție. Este necesar ca extractul de pată să conțină o concentrație în globulină Gc apropiată de cea existentă în mod normal în ser.

Pe plan mondial cercetările pentru a se găsi noi metode privind identificarea individuală sunt imense.

Astfel pentru determinarea grupelor ABO în țesuturi se poate aplica cu foarte mari succese metoda imunofluorescenței.

Trebuie subliniat faptul că, dacă prin aplicarea tehnicilor curenți de determinare a unei grupe sanguine sau a unui anumit factor, s-a putut doar restrânge cercul de bănuși, întărindu-se o anumită presupunere, în coroborare cu alte date ale anchetei, fără a putea duce la o concluzie de certitudine privind apartenența petelor de pe corpurile delictate. Prin aplicarea metodei de tipizare a ADN-ului în pete se pot determina în segmentele genomice caracterele individuale.

14.2. EXAMENUL PETELOR DE SPERMĂ

Biol. ELISABETA VASILESCU

Cercetarea petelor de spermă are deosebită importanță în medicina legală, ele fiind singurele care persistă în urma unui viol, viol cu deces, perversiuni sexuale etc. fie pe obiectele de îmbrăcăminte sau alte corpuri delictive, cât și în secreția vaginală a victimei. În petele de spermă rezultate în urma unui raport sexual, de obicei se pot determina antigenele atât ale victimei cât și ale învinutului. Cunoscându-se grupa sanguină și statusul secretor al victimei, din antigenele evidențiate se poate deduce grupa sanguină a învinutului, care ulterior este determinată eritocitar și salivar prin recoltarea de sânge și salivă de la învinuit.

În situația unui raport sexual se cercetează petele de spermă de pe îmbrăcămintea victimei; de asemenea se recoltează secreție vaginală, anală și bucală, pe lame și tampon, în funcție de caz, concomitent cu sânge și salivă, pentru stabilirea grupei sanghine și a statusului secretor.

În cazul unui viol cu deces, de la victimă se recoltează pe lângă secreție vaginală pentru evidențierea spermei pe lame și tampon, sânge și tampon cu secreție bucală sau traheo-bronșică pentru determinarea statusului secretor.

Dintre obiectele de la locul faptei se cercetează cearceafurile de pe pat, fotoliile, petele de pe dușumea sau alte obiecte unde s-a produs agresiunea.

14.2.1. Examenul macroscopic

Pata de spermă recentă are o culoare alb-gălbuie, cu aspect mat, scrobit pe un suport absorbant, cu marginile bine delimitate. Petele de pe obiectele spălate prezintă o culoare mai gălbuie, difuză, fără a avea consistența de scrobit. Pe suporturile lucioase pata de spermă formează o peliculă scuamoasă, ușor strălucitoare.

albicioasă. Localizarea, poziția, dimensiunile și forma petei pot da date asupra poziției relative a victimei și a inculpatului.

14.2.2. Examenul petelor de spermă în lumină ultravioletă

Pata de spermă este examinată direct pe suport cu un fascicul de raze ultraviolete, imaginea având o fluorescență caracteristică ce se întinde de la nuanța de violet spre albastru-verzui și un spectru continuu, începând de la 4000 Å, până la 4559 Å.

Alte metode, pentru diagnosticul de pată de spermă, pun în evidență diferiți constituenți ai spermei, care se găsesc într-o concentrație relevantă în aceasta, ceea ce o poate deosebi de alte lichide biologice. Aceste metode se bazează pe proprietățile chimice, enzimaticice și imunologice ale spermei, punându-se în evidență spermina, colina, calciul și fosfataza acidă.

Metodele enumerate, deși dau o bază de *probabilitate* asupra petelor de spermă, în condițiile când nu se găsesc spermatozoizi în pată, fie din cauza unei recoltări sau conservări improprie, fie în situațiile de azoospermie sau oligozoospermie severă, ele pot singure constitui dovada prezenței spermei în pată.

14.2.3. Reacții microcristalografice

Aceste reacții se bazează pe principiul formării cristalelor caracteristice componentelor spermei în contact cu diferiți reactivi. În cazul petelor de spermă se efectuează un macerat din pată care se pune în contact cu reactivii specifici.

Reacția Florence

Pune în evidență prezența colinei în spermă, care are o concentrație în aceasta mai mare decât în alte țesuturi și umori ale organismului. Este descrisă în literatura de

specialitate ca cea mai sensibilă reacție pentru spermă.

Florence a pus-o în evidență în 1897, arătând că sperma sau maceratul din pata de spermă puse în contact cu un reactiv iodo-iodurat determină imediat formarea cristalelor de periodură de colină. Reactivul este constituit din iodură de potasiu 1,56 g, iod metalic 2,54 g și apă distilată 30 g și poate fi păstrat mai mult timp.

Pe lamă se pune o picătură de macerat din pata de spermă și o picătură de reactiv, acoperindu-se cu lamela. În preparatul observat la microscop se pot distinge cristalele Florence caracteristice, brun-acașou, alungite sub formă de lance, cu unul din capete despicate în coadă de rândunică, de dimensiuni variabile, solitare sau dispuse în grupuri stelate. Această reacție nu se produce în spermă imediat după ejaculat, ci după 15-20 minute, întrucât colina se formează progresiv, plecând de la precursori. Prezența sângelui, a urinei sau a florei microbiene într-o proporție ridicată împiedică formarea reacției. Reacția cu producere de cristale Florence poate fi pozitivă și cu saliva, secreția vaginală, mucus uterin, bilă, unele sucuri vegetale, în acestea găsindu-se într-o oarecare proporție colină (fig. 14.3).

Reacția Barberio

Barberio a arătat că o soluție apoasă saturată de acid picric produce formarea cristalelor în contact cu spermina, de picrat de spermină, colorate în galben, sub formă aciculară, sau prisme mici rombice, cu o linie refringentă pe mijloc. Cristalele sunt grupate în cruci, mai rar în formă stelară.

Reacția Lecha Marzo utilizează acidul fosfomolibdenic 10 p. 100 pentru caracterizarea spermei. El a obținut la rece cristale sub formă de lame hexagonale sau rombice, incolore, galbene sau verzui.

14.2.4. Reacția fosfatazei acide

Fosfataza acidă a spermei umane este secretată de prostată. Este o fosfomonoesterază de tip 2 ce catalizează la un pH

5,5 transferul fosfatului din beta glicerofosfat și fosfocreatină către glucoză. Produsul obținut este glucozofosfatul care va fi transformat în fructozo-6-fosfat de către izomerază, care va fi sursa de fructoză seminală. Fructoliza anaerobă este procesul metabolic care permite spermatozoizilor să subziste în absența oxigenului. Bogăția spermei în fosfatază a fost utilizată pentru demonstrarea prezenței spermei pe substratul cercetat.

Prin metoda calitativă a lui Welker, se obține o colorație roșie a petei de spermă de pe suport folosind ca substrat alfanafțilfosfatul de sodiu într-o soluție tampon pH 5. Alfanafțolul eliberat sub acțiunea enzimei - fosfataza acidă - dă prin cuplare cu o sare de diazonium culoarea roșie cu spermă.

Metoda determinării calitative a fosfatazei acide din spermă este însă considerată inexactă, avându-se în vedere prezența acestei enzime și în alte produse ca ficat, rinichi, eritrocite, lapte, cartofi, etc.

Unii autori recomandă determinarea cantitativă a fosfatazei acide prin măsurarea fotometrică a intensității culorii apărute într-un volum de extras din pată.

Rasmussen a arătat că la temperatura obișnuită fosfataza acidă diminuează repede în timpul primelor 10-20 zile pentru ca apoi să dispară repede. Un rezultat negativ nu permite o concluzionare, însă un nivel de fosfatază acidă egal sau superior cu 20 unități King-Amstrong pe centimetru, semnaleză prezența spermei în pată.

Metode ca electroforeza și imuno-electroforeza pentru determinarea electroforetică a fracțiunilor proteice ale spermei, ca și metoda cu serurile imunoprecipitante obținute pe iepuri, au o aplicabilitate redusă.

14.2.5. Metodele de certitudine

Metoda de certitudine în determinarea unei pete de spermă constă în evi-

dențierea microscopică a spermatozoizilor. Aceștia pot fi examinați pe frotiuri vaginale recoltate de la victimă sau pe maceratele din petele de pe corpurile delictive. Prezența unui singur spermatozoid găsit pe un frotiu, poate da confirmarea prezenței de spermă.

Spermatozoizii proveniți din celulele germinale ale epiteliului seminifer au o structură filiformă, fiind constituiți din cap, gât, piesă intermediară și coadă.

Capul este aplatizat, oval, cu o lungime de 4,6 microni și conține nucleul format din ADN, un acrozom constituit din mucopolizaharide și un capșon cefalic (fig. 14.4.).

Colorația spermatozoidului se bazează pe afinitatea diferită față de coloranți a capului și cozii. Acrozomul compus din mucopolizaharide se colorează mai palid față de nucleul cu cromatină care se colorează intens.

În cazul în care într-o pată de spermă se evidențiază numai capete de spermatozoizi, aceștia sunt suficienți pentru diagnosticul de spermă. Cozile mai palide la culoare nu pot fi evidențiate după detășarea de cap.

Pentru efectuarea frotiurilor din pete se macerează fragmente din acestea, timpul de macerare variind în funcție de vechimea petei. Pe o lamă se efectuează frotiul. Se usucă, se fixează 20 minute în alcool metilic și se colorează.

Sunt mai multe metode de colorare a frotiurilor cu spermă, cea mai frecvent utilizată fiind metoda cu *hematoxilină-eosină*, preparată după următoarea rețetă:

1) Soluția A - 1 g hematoxilină + 10 cc. alcool etilic absolut; Soluția B - 20 g alaiu de potasiu + 200 cc. apă distilată. Soluția A+B se amestecă după 24 ore, flaconul lăsându-se pentru maturarea colorantului la lumina soarelui 10 - 15 zile. 2) Eozină apoasă- yellow 1,50 g + eozină alcoolică (rot) 1,50 g + orange G 0,30 + alcool 70° 100ml. Se fierbe 10', după răcire se adaugă 1 cc. acid acetic

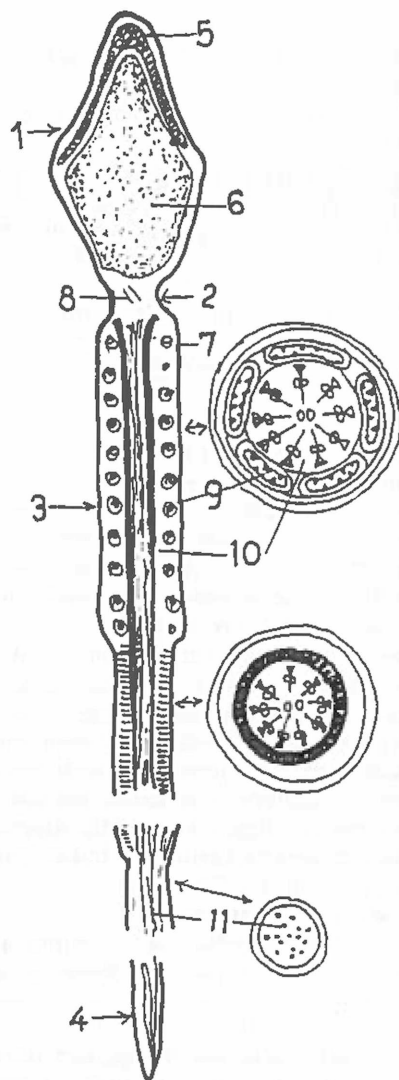


Fig. 14.4. - Spermia umană

1- cap; 2- gât; 3- corp; 4- coadă; 5- acrosom; 6- nucleu; 7- plasmalemă; 8- centrioli; 9- mitocondrii; 10- filament axial; 11- microfibrile.

glacial și 20 cc. soluție apoasă saturată de carbonat de litiu. Se filtrează.

Frotiul se fixează în alcool metilic 30 minute. Se usucă. Se colorează 5 minute în hematoxilină, se spală cu apă de robinet, se colorează în 1-2 băi de eozină, se spală, se usucă. Se observă la microscop

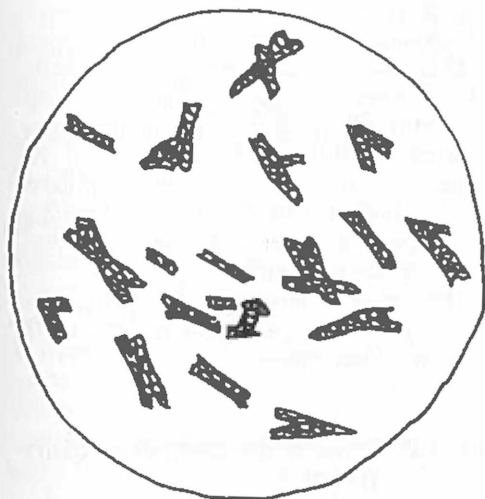


Fig. 14.5. - Microcristale de spermă.

cu obiectivul cu imersie. Capetele spermatozoidelor apar bicolore - baza în albastru violet, vârful în roz, iar coada în roșu spre roz.

Mai amintim alte colorații : verde-metyl, eritrozină și colorarea fibrelor de țesături cu pete de spermă (colorarea cu eritrozină).

14.2.6. Stabilirea grupei sanguine în petele de spermă

După precizarea prezenței spermei în pata biologică, se trece la determinarea grupei sanguine în petele de spermă. Este necesar să se precizeze că antigenele de grup sunt localizate în plasma seminală și sunt determinate de gena secretoare. În populația țării noastre proporția de secretori este de 80% față de 20% cei nesecretori. Indivizii secretori secretă antigenele de grup sanguin în toate lichidele corpului, saliva, sperma, secreția vaginală, secreția bronșică, având titrul cel mai ridicat. Important de remarcat este faptul că toți indivizii secretori prezintă antigenul H, indi-

ferent de grupa ABO din care fac parte.

Metoda cea mai uzitată în determinarea antigenelor AB și H în spermă este metoda absorbției. Se pot aplica și alte metode de determinare a antigenelor ca: absorbție eluție (Pereira, 1962), aglutinare mixtă (Edwards, 1964) și inhibiție.

Principiul metodei absorbției este următorul: antigenul prezent în pată va absorbi specific aglutinina corespunzătoare din serul cu care este pus în contact. Scăderea titrului acestei aglutinine este evidențiată prin titrarea serului după absorbție. Citirea se face după 30 - 60 minute și se ia în considerație scăderea de minim 3 trepte a aglutinărilor din ser, care corespund prezenței antigenului. Astfel scăderea titrului serului anti-A și fitaglutininei anti-H, denotă prezența antigenelor A și H; scăderea titrului serului anti-B și fitaglutininei anti-H, denotă prezența antigenelor B și H; scăderea titrului serului anti-A, anti-B și fitaglutininei anti-H, denotă prezența antigenelor A, B și H iar scăderea titrului fitaglutininei anti-H, denotă prezența antigenului H. Pentru grupa 0 este deci caracteristic numai antigenul H.

Dacă nu a scăzut titrul nici unui ser, rezultă că în pată fie că nu sunt antigene și pata provine de la nesecretori, fie cantitatea de secreție a fost insuficientă pentru evidențierea lor sau în cazul petelor vechi, antigenele s-au distrus.

Prezența sângelui în pată nu interferează cu antigenele A, B și H din secreții, titrul antigenelor eritrocitare fiind mult mai scăzut decât al celor din secreție.

În general petele de spermă nu se găsesc individualizate decât în anumite situații, ci sunt amestecate și cu secreția vaginală a victimei. De aceea, pentru a interpreta corect rezultatele obținute trebuie determinate grupa sanguină și statusul secretor atât al victimei, cât și al agresorului. Pentru interpretare se va avea în vedere în cazul unui raport vaginal sau oral suprapunerea antigenelor victimei și a învinuitului. În schimb într-un raport anal, ținându-se seama că secreția victimei este

minimă în contaminarea petei seminale, grupa determinată în pata de spermă va fi mai posibil a agresorului.

Pentru determinarea prezenței spermei și a antigenelor ABH în conținutul vaginal se va recolta, pe lângă frotiurile pentru decelarea spermatozoizilor, un tampon de tifon sau vată îmbibat cu secreția vaginală. De asemenea, se vor recolta 2-3 ml de salivă, care se fierbe pe baia de apă 30 de minute, iar în cazul cadavrelor, tampon cu secreție salivară sau traheo-bronșică. Tamponele trebuie uscate pentru evitarea distrugerii antigenelor ABH.

Persistența spermatozoizilor intravaginali depinde de mai mulți factori: pH-ul, flora microbiană sau ciclul ovular, fiind lizați după 24, 48 sau 72 de ore dacă este vorba despre femeie vie și cu o persistență de până la 3 săptămâni, dacă se vorbește despre conservabilitatea intravaginală la cadavru.

14.3. EXAMENUL ALTOR PETE BIOLOGICE

Bfcl. ELISABETA VASILESCU

14.3.1. Pata de meconiu

Meconiul este constituit din toate substanțele care se acumulează în cursul gestației în tubul intestinal al fătului.

Cercetarea petelor de meconiu și identificarea lor pot furniza probe importante pentru datele de anchetă în pruncucidere, întreruperea sarcinii sau tănuirea nașterii.

Meconiul conține elemente provenind din trei origini - origine gastro-intestinală: mucus, granulații grase cu tentă galbenă, celule epiteliale cu nuclei vizibili proveniți din descuamarea tubului digestiv; origine hepatică: mucus, celule cilindrice de descuamare a căilor biliare, corpusculi brunii, cristale de colesterină plate, lamelare transparente, cristale de bilirubină; origine amniotică: celule epidermice descuamate, peri fetali fini, fără canal medular.

Ca morfologie pata de meconiu este vâscoasă, de culoare brun-gălbuie, cu

nuanță verde, aderentă și nemirosoare.

Examenul petelor de meconiu se poate face chimic - evidențierea fosfatazei acide, (dar fără rezultate precise) sau prin reacții cu seruri precipitante obținute prin imunizarea iepurilor cu meconiu uman; valoarea cea mai mare o are examinarea microscopică a petei de meconiu, constând în cercetarea diverselor elemente constituente ale meconiului.

Prin metoda absorbției se pot determina antigenele de grup ABO în meconiu la persoanele secretoare.

14.3.2. Petele de secreție glandulară

Patu de salivă prezintă o culoare alb-gălbui spre gri, pe unele suporturi cu aspect strălucitor. Examenul microscopic pune în evidență celule epiteliale pavimentoase, mucus bucal și faringian, celule cilindrice cu cili vibratili ale căilor respiratorii, elemente care sunt însă greu de diferențiat într-o pată uscată de salivă. Puneră în evidență a petei se poate face prin metode chimice privind constituenții salivari, dar importanță deosebită o prezintă evidențierea antigenelor hidrosolubile AB și H ale salivei. Secreția acestor antigene este determinată de gena secretoare, ele găsindu-se în lichidul salivar.

Titrul mare - 1/1024 al antigenelor salivare permite determinarea statusului secretor și a grupei sanguine a persoanei care a produs pata de salivă. Acest lucru are deosebită importanță în medicina legală, permițând determinarea apartenenței individuale pe diferite substraturi: țigări, timbre lipite sau unele corpuri folosite la sufocare (căluș) etc. De asemenea, saliva se utilizează la determinarea statusului secretor al unui individ, de exemplu în cazurile de viol, perversiuni etc.

Determinarea antigenelor din salivă se face prin metoda absorbției: se pun în contact antiseruri adecvate anti-A, anti-B

și fitaglutinina anti-H cu salivă sau fragmente din țigări sau alte corpuri delice îmbibate cu salivă.

Se lucrează cu martori nepătați din corpurile delice și cu martori din serurile cu care s-a lucrat.

Se pun la absorbit 24 de ore la +4° C. Se titrează și se adaugă hematii A, B și O (hematiile O se suspendă în apă sărată 3%) în suspensie 2%, corespunzător. Se citește după 30-60 minute. O scădere de cel puțin 3 trepte a titrului aglutininelor denotă prezența antigenului respectiv. Pe baza determinării antigenelor în salivă se poate identifica grupa sanguină a unui individ în urma de salivă lăsată pe o țigară.

În expertizarea urmelor biologice pot fi menționate și metodele de aglutino-inhibare și imunofluorescență, iar în ultimii ani metoda ampretei genetice de tipizare a ADN, care permite identificarea indivizilor după caracterele individuale înscrise în ADN genomic. Aplicând metoda PCR (polymerase chain reaction) de amplificare in vitro a secvențelor ADN, sunt suficiente 1-10 ng de material. Astfel este suficientă o singură moleculă de ADN, care poate fi amplificată și pe baza căreia poate fi tipizat un individ.

Pata de mucus bronșic are o culoare albicioasă, uneori verzuie, cu un contur net. Examenul microscopic evidențiază celule mucoase bronșice, celule prismatice cu cili vibrațili, celule pavimentoase din cavitatea bucală și faringe, polinucleare, microbi, unele hematii. Are importanță în determinarea statusului secretor la cadavrele de la care nu se mai poate recolta salivă sau alte secreții, datorită titrului mare al antigenelor pe care le conține.

Pata de mucus nazal colorată fie în alb sau galben, fie gri, conține celule cu cili vibrațili din căile respiratorii, leucocite etc.

Pata de lapte și colostrum

Examenul secreției mamare - lapte și colostrum are importanță în medicina legală în situațiile de pruncucidere sau întrerupere a sarcinii. Macroscopic, petele

de lapte au un aspect ușor cenușiu, îmbibat în suport, cu un contur puțin delimitat. Se pot evidenția doar prin examenul microscopic al constituenților săi. Examenul se face pe lamă cu o colorație May-Grünwald-Giemsa, a maceratului din pete. Se pot distinge în pata de lapte celule lactogene sau lactoblaste, resturi celulare, globule albe polinucleare, picături de grăsime, particule de cazeină, corpusculi butirici, iar în colostru pe lângă elementele menționate se pot observa corpusculi granuloși Donné, corpusculi muriformi și formațiuni de corpusculi degenerați. Citologia secreției mamare se modifică în cursul gestației, post-partum și post-abortum.

Ca și în alte secreții se pot determina antigenele de grup sanguin și în petele de lapte provenite de la persoane secretoare. Acestea sunt însă mult mai slabe decât antigenele salivare.

14.3.3. Alte pete - excreții

Pata de materii fecale este uneori cerută pentru expertizare în medicina legală. Ea are un aspect galben-marونی, sub formă de crustă pe suport. Poate fi identificată prin examen microscopic și chimic. Se efectuează un macerat din pata de materii fecale. Observată la microscop se pot distinge: fibre musculare, țesut conjunctiv, granulații galbene sau albicioase; resturi vegetale ca: granule de amidon (se colorează în albastru în soluție Lugol), resturi de fragmente vegetale cu vase spirale, circulare sau scalariforme, peri vegetali, incolori, celule vegetale; de asemenea se pot observa: celule pavimentoase intestinale, mucus, corpusculi colorați în brun de către bilă, cristale de bilirubină, colesterină, cristale de oxalat de calciu, pigmenți de stercobilină (specfici materiilor fecale) care le colorează și în unele cazuri se pot găsi spori, bacterii și ouă de paraziți.

Pentru a face mai vizibile fibrele striate alimentare, pe preparat se poate adăuga o picătură de acid acetic.

Granulațiile de grăsimi neutre sunt solubile în alcool sau eter, colorându-se în negru cu acid osmic.

Stercobilina poate fi pusă în evidență în modul următor: o picătură din maceratul din pată se aplică pe o hârtie de filtru, se adaugă o picătură dintr-o soluție saturată de sublimat (clorură mercurică 1/4 în alcool etilic). Stercobilina se colorează în roșu.

În materiile fecale nu se pot evidenția substanțe de grup specifice care să permită stabilirea apartenenței individuale.

Pată de urină

Petele de urină pe corpurile delictu au o formă întinsă, neregulată, mai mult sau mai puțin galbene. Întrucât prin examinarea la microscop în maceratul de pată se pot evidenția cu greu unele elemente citologice, V. Baltasard și Rojas au experimentat două metode chimice de punere în evidență a petei de urină.

Reacția cu acidul fosfotungstic (1 g acid fosfotungstic, 50 cc. apă distilată) de evidențiere a acidului uric. Această reacție însă este pozitivă și cu salivă, serul sanguin, materii fecale.

Reacția pentru xanthyloree. Se utilizează soluție concentrată 10% de xanthydrool în alcool de 95° și acid acetic glacial. Pe o picătură de macerat din pată uscată se adaugă o picătură de amestec în părți egale de xanthydrool și acid acetic. Se observă la microscop cristalele de dixanthyloree sub formă de ace adesea grupate în formă de stea. Reacția este caracteristică ureei, dar poate fi pozitivă și cu serul sanguin. Ea este negativă cu sângele, sperma, laptele, materiile fecale.

Urina prezintă substanțe de grup sanguin A, B, și H sub formă hidrosolubilă, dar întrucât titrul lor este foarte mic (1/2 - 1/4), în diluția din petele de urină se evidențiază mai greu.

Pată de lichid amniotic este solicitată în unele cazuri de pruncucidere, tănuirea nașterii.

Ea are o culoare gălbuie, cu contur definit. Se pot pune în evidență în maceratul din pete examinat la microscop celulele epiteliale și păr fetal.

Este dificil de precizat prezența lichidului amniotic.

La persoanele secretoare se pot determina substanțele de grup A, B și H, care corespund de obicei antigenelor fătului.

14.4. EXAMENUL FIRELOR DE PĂR

Biol. ELISABETA VASILESCU

Firele de păr constituie indicii importante, fiind găsite la fața locului, adesea intacte, chiar atunci când alte elemente de identificare s-au pierdut.

Expertiza firelor de păr poate da date asupra *provenienței* firelor de păr (sintetică, umană sau animală), asupra *particularităților* firelor de păr găsite (secționate, smulse, cu anumite depozite pe cuticulă) sau *circumstanțelor*.

Pe baza acestor indicii se poate identifica agresorul, fie prin găsirea firelor de păr ale acestuia pe îmbrăcămintea sau în mâna victimei, fie prin găsirea firelor de păr ale victimei pe hainele învinutului; de asemenea în cazul unor accidente de circulație pot fi găsite fire de păr ale victimei prinse pe caroseria mașinii, iar în cazul cadavrelor neidentificate se pot găsi indicii prin cercetarea firelor de păr pe obiectele victimei.

Diferențierea firelor de păr se face pe baza examenului macroscopic și în special cel microscopic.

Firele de păr se caracterizează printr-o extremitate liberă - tija, de formă filamentoasă și rădăcina cu bulbul său înserat într-o papilă dermică.

Filamentul firului de păr prezintă spre exterior cuticula prevăzută cu solzi (lamele) omogeni, transparenti, imbricați foarte strâns. Urmează corticala care pre-

zintă pigmenții de culoare ai firului de păr, cu o textură fibrilară, iar în interior se află medulara sub formă unei coloane continue sau fragmentate, implantată până la nivelul bulbului, constituită din elemente globuloase dispuse mai dens sau mai rarefiate, uneori unite între ele, spre vârful firului de păr apărând doar sub formă de rare bule aerifere. Medulara nu este constantă, uneori putând să lipsească. Ea prezintă pigmenți de culoare, negri sau mai deschiși. Bulbul firului de păr poate fi de formă ovoidală sau ratatinată, iar în cazul căderii în urma unei tracțiuni poate antrena teci epiteliale, care îl înconjură ca un manșon.

Diagnosticul firului de păr se face pe baza descrierii lungimii, grosimii, cuticulei, corticalei, medularei, vârfului și bulbului; de asemenea forma și aspectul firului la examenul secțiunii transversale, diferențiindu-se firele de păr uman de firele animale, fibrele vegetale, fibrele artificiale și sintetice.

Examenul microscopic al firului de păr se face pe preparate microscopice montate de obicei în glicerină sau fixate în balsam de Canada. În situația firelor foarte pigmentate, de culoare neagră, pentru a se putea observa caracteristicile se procedează la o decolorare a lor cu apă oxigenată și amoniac (2 părți perhidrol, o parte amoniac și două părți apă distilată), iar pentru montarea în balsam de Canada se procedează la deshidratarea lor cu alcool, xilol și apoi se montează. Pentru efectuarea secțiunilor transversale în firul de păr acestea se includ în parafină sau coloidină și se secționează la microtom (fig. 14.6 și fig 14.7).

Măsurarea grosimii firelor de păr necesită folosirea micrometrului cu ajutorul căruia, în urma stabilirii indicelui microscopic pentru fiecare obiectiv și ocular, se calculează numărul de microni.

Firele de păr pot fi examinate cu lumina albă, la microscop, cele închise la

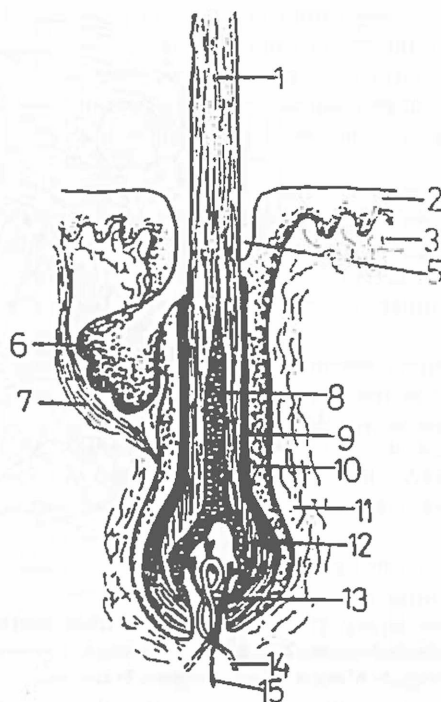


Fig. 14.6. - Firul de păr

1- Tulpină, 2- Epiderm, 3- Derm 5- Colul foliculului; 6- Glandă sebacee; 7- Mușchi arector; 8- Rădăcină, 9- Teacă epitelială internă; 10- Teacă epitelială externă, 11- Teacă fibroasă; 12- Bulb, 13- Papilă; 14- Vas sanguin; 15- Nerv.

culoare pot fi fotografiate cu raze infraroșii sau pot fi examinate la microscopul electronic.

14.4.1. Stabilirea speciei firului de păr

Analizând caracteristicile firelor de păr uman față de cel animal se pot compara lungimea și grosimea firelor de păr umane și animale. Se poate afirma că firele de păr uman sunt în general mai lungi decât cele animale, dar în expertiză se pot întâlni lungimi diferite. Grosimea firelor de păr uman este cuprinsă în medie între 50-125 microni, cu aspect uniform pe lungimea

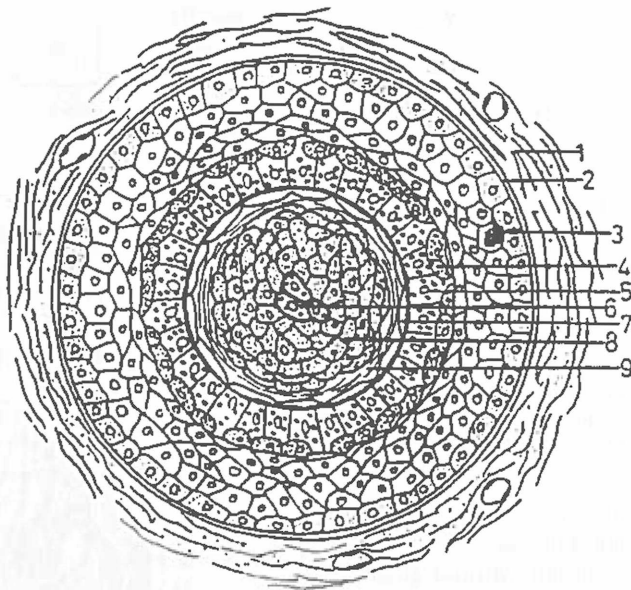


Fig. 14.7. - Secțiune transversală prin rădăcina firului de păr

1- Teaca fibroasă; 2- Membrana bazală; 3- Stratul bazal al tecii epiteliale externe; 4- Stratul Henle; 5- Stratul Huxley; 6- Măduva (canal medular); 7- Epidermicula tecii epiteliale interne; 8- Scoarța; 9- Epidermicula părului.

firului, cele de animale putând fi mai groase sau mai subțiri în funcție de animal și cu grosimea variind de-a lungul firului de păr.

Corticala care prin pigmentii săi dă culoarea firului de păr uman este diferită față de cea a animalelor, fără a avea însă o valoare absolută. **Medulara** și **cuticula** sunt însă diferite. Medulara la firul de păr uman poate să lipsească, să fie dispusă sub formă fragmentată sau se prezintă ca un canal uniform, cu o valoare a indicelui medular mai mic de 0,30 din lungimea diametrului firului. La firul de păr animal, medulara, în general prezentă, are un aspect mai larg al veziculelor aerifere și o grosime de peste 0,50 din diametrul firului. Cuticula la firul de păr uman este formată din solzi rotunjiți, ușor crenelați, bine imbricați, față de firul de păr animal care are solzii rombici, sau alungiți, dispuși ca țiglele pe acoperiș.

14.4.2. Firele de păr uman - particularități

După stabilirea apartenenței firului de păr, pentru firele de păr uman se precizează locul de origine, în funcție de aspect, grosime, lungime, caracteristicile corticalei, medularei, a vârfului și bulbului. Parametrii firelor de păr uman diferă în funcție de regiunea corporală, sex și vârstă.

Lungimea, aspectul și structura microscopică dau indicii asupra regiunii firului de păr: capilară, pubiană, axilară, gene, sprâncene sau altă zonă corporală.

Sexul în firele de păr se poate stabili în afara comparării lungimii și grosimii firelor și prin punerea în evidență prin tehnici de colorare specifice a cromatinei sexuale și a dramsticks-urilor în bulbul firului de păr.

Vârsta. Precizarea vârstei după aspectul morfologic al firelor de păr este relativă. Dacă la nou-născuți firele de păr sunt

subțiri, fără medulară, cu pigmentație redusă, iar la persoanele după 40 de ani poate apare încărunțirea, părul alb dintr-o probă poate da indicații că persoana este trecută de această vârstă.

Alte particularități. Firele de păr pot cădea spontan, pot fi smulse sau secționate. Diferențierea se face după aspectul bulbului, care la firul de păr căzut spontan este cornificat, gol, fără teacă epitelială, pe când cel smuls prezintă tecile epiteliale care înconjură bulbul ca un deget de mânășă. Firul de păr desprins în urma unei lovituri cu un corp contondent are aspectul de secționat sau rupt neregulat, iar în cazul unui fir de păr căzut în urma unei împușcături, acesta prezintă la suprafața cuticulei pulberi ale armei cu care s-a tras.

În cazul firelor de păr calcinate, acestea prezintă modificări în funcție de temperatură, începând cu o brunificare roșcată, pentru ca apoi să apară bule de aer în canalul medular al firelor de păr, lipirea firelor între ele și carbonizarea lor.

În intoxicații se observă că anumite substanțe toxice rămân un timp în firele de păr. Dintre acestea menționăm arsenicul, plumbul ș.a. Ele pot fi evidențiate prin tehnici toxicologice.

14.4.3. Determinarea caracterelor individuale

În probele de păr corp delict determinarea caracterelor individuale este deosebit de importantă, întrucât acestea nu pot fi individualizate numai după caracterele morfologice.

Determinarea grupei sanguine în firele de păr. Ca și în alte țesuturi, substanțele de grup sanguin ABO pot fi determinate în firele de păr prin metoda absorbției-eluției, atât la persoanele secrete cât și nesecretoare.

După degresare, decolorare, și îndepărtarea keratinei, se efectuează metoda absorbției-eluției. Citirea rezultatelor și

interpretarea se face cu multă prudență, întrucât rezultatele obținute nu întotdeauna sunt certe. Sursa antigenelor ABO și localizarea lor în firul de păr nu este clară. Ele se pot identifica în filamentul firului de păr și în teaca bulbului.

Altă metodă de determinare a grupei sanguine în firul de păr o constituie tehnica tratării firelor cu anticorpi marcați și fixarea imaginii pe film. Impresiunile lăsate sunt caracteristice pentru grupele sistemului ABO.

Cea mai complexă determinare asupra firului de păr privind stabilirea particularităților individuale este *metoda amprentei genetice* de tipizare a ADN din tecile bulbului de păr, în segmentele de ADN genomice fiind înscrise caracterele fiecărui individ.

Dacă până acum expertizele medico-legale puteau stabili doar originea umană sau animală a unui fir de păr și grupa sanguină în sistemul ABO, în urma aplicării metodei amprentei genetice, de tipizare a ADN, probabilitatea ca un individ să fie identificat după firele de păr corp delict devine certitudine.

14.5. IDENTIFICAREA DUPĂ AMPRENTA DENTARĂ

Conf. dr. V. PANAITESCU

Identificarea prin amprente dentare se poate reproduce după mușcăturile lăsate pe corpul uman (persoană sau cadavru) sau de pe diferitele corpuri delictive care de regulă sunt semidure (fructe, pâine, brânză, etc.). Morfologia leziunilor este condiționată de forța aplicată prin mușcare și de caracteristicile obiectului mușcat (consistență, formă). Amprenta lăsată de mușcătură are două componente: mușcătura propriu-zisă și urma lăsată de desprinderea corpului mușcat (asociată uneori cu smulgeri din acesta).

Fotografia mușcăturii trebuie să se facă cât mai rapid, deoarece în timp amprenta

poate suferi modificări datorate elasticității pielii, cicatrizării, alterării corpurilor mușcate. Se efectuează fotografii color și alb-negru din diferite incidențe. Aceste fotografii dau date asupra alinierii și morfologiei dinților (formă, dimensiuni, aspectele marginilor ocluzale și ale fețelor laterale ale dinților) asupra formeii arcadei dentare și asupra tipului particular de ocluzie dentară.

În timpul următor se procedează la ridicarea și confecționarea amprenteii dentare. Se folosesc substanțe de tipul silicilor și alginatilor, caracterizate prin vâscozitate și elasticitate mare, solubilitate, capacitatea de a reda detaliile dentare, manipulabile ușor și cu capacitatea de a nu deteriora țesuturile. Apoi, amprentele obținute se toarnă în gips.

Materialul obținut se compară cu amprentele, obținute de la persoana învinuită, care va mușca în ceară de modelat sau rășină, după care se realizează mularul mușcăturii în gips.

La interpretarea rezultatelor trebuie avut în vedere că amprenta dentară nu reproduce niciodată absolut fidel toate caracteristicile dentare ale persoanei care mușcă. Aceasta se datorează pe de o parte substratului asupra căruia se acționează, iar pe de alta faptului că în mușcare sunt implicați în special dinții frontali. De asemenea, acțiunea de smulgere este susceptibilă de a crea dificultăți în comparare. Se apreciază că existența a cel puțin 4-5 coincidențe între probă și martor pledează pentru rezultatul pozitiv al identificării.

structură similară prezente în structura ADN, A. Jeffreys (1985) a arătat că fiecare sistem de benzi este strict specific pentru fiecare individ. Metoda numită amprenta genetică (DNA fingerprinting) a dovedit că aduce mai multe informații pentru identificare decât toate metodele clasice la un loc. Așa se și explică acceptarea unanimă a aplicării ei imediate în multe domenii ale medicinei legale, precum și perfecționarea ei într-un interval de timp extrem de scurt.

Noțiunile de bază ale acestei metode sunt achizițiile clasice ale geneticii moleculare în sensul că ADN este format din patru nucleotide (A, C, G, T), care prin dispoziția lor permit stocarea tuturor informațiilor referitoare la construcția organismului cu toate caracterele sale. Cele două lanțuri din structura ADN sunt legate pe baza complementarității între A-T și G-C (fig. 14.8).

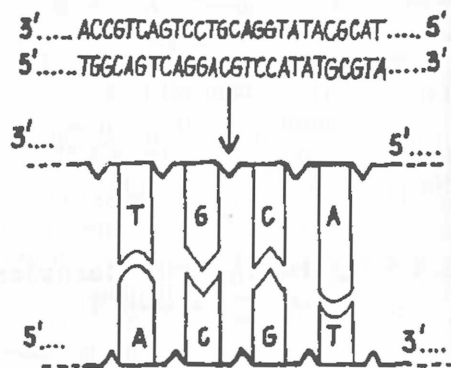


Fig. 14.8. - Fragment din lanțul de ADN (de remarcat legăturile specifice A-T, G-C).

14.6. TEHNOLOGIA ADN ÎN PRACTICA MEDICO-LEGALĂ

Prof. dr. VL. BELIȘ, conf. dr. V. PANAITESCU

14.6.1. Noțiuni preliminare

Pornind de la constatarea existenței unor familii de secvențe repetitive cu

S-a arătat că după proprietățile funcționale, genomul eucariotelor este format din două tipuri de regiuni:

-*regiuni codificatoare* caracterizate prin localizarea lor precisă într-o singură genă, (reprezentând secvențe unice sau nerepetitive), alcătuind cea mai mare parte a ADN, cu rol în sinteza proteinelor identice

sau izomere: aceste regiuni sunt constante pentru fiecare specie;

-*regiuni necodificatoare* - care se pot găsi într-o singură copie (DNA spacer) între precedentele sau în mai multe copii (ADN repetitiv sau satelit); funcția acestor segmente de ADN este puțin cunoscută; ele reprezintă 20-30% din genom, nu se transcriu și nu se traduc, existând în tandemuri sau în unități izolate; secvențele cele mai înalt repetitive sunt legate de heterocromatină, fiind situate în zonele pericentromerice ale cromozomilor; variabilitatea lor individuală (= polimorfismul ADN) conferă baza studiului amprentei genetice, permițând diferențierea a două persoane cu condiția să nu fie gemeni monoziagoți.

La rândul său, ADN repetitiv este de două feluri:

-*satelitul clasic "alphoid" (sateliții I-IV)* situat în apropierea centromerului sau în centrozom, separabil prin ultracentrifugare în CsCl;

-*repetiții tandemice simple* dispersate în tot genomul sau grupate în una sau mai multe regiuni; tandemurile pot consta din repetiții scurte (STRs = short tandem repeats).

Minisateliții sunt localizați în special spre extremitățile cromozomilor (proterminal). Se apreciază că în genomul uman există circa 1500 minisateliți.

Fiecare minisatelit este format dintr-un miez (microsatelit, engl. = core) care poate conține de la 3-16 bp. C. T. Caskey (1991) a evidențiat astfel de miezuri tetranucleotidice (AGAT). Miezurile sunt bogate în GC și AT. Separarea lor se realizează cu endonucleaze (Hin f-I, Hae III) care pot cliva specific chiar secvențe de 4 bp. Regiunile pe care le ocupă miezul sunt recunoscute specific prin sonde.

Rolurile miezurilor constau în: generarea de minisateliți (prin duplicarea în tandem a unei singure secvențe de ADN), funcționează ca semnale de recombinare și

conferă polimorfism minisateliților prin numărul variabil de repetiții (minisatelit = VNTRs = variable number of tandem repeats).

Minisateliții prezintă un mare polimorfism care se datorează:

- dispersiei mari a minisateliților în genom, tandemurile putând fi *unice* (ocupând deci un singur locus hipervariabil) sau *dispersate*;

- mării variabilități a numărului de repetiții ale miezului, care condiționează lungimea fragmentului de restricție (RFLPs), ajungând la secvențe cu lungimi între 16-64 bp;

- ratei mari de mutații (cu inserții sau deleții) sau crossing over-ului inegal, care modifică numărul repetărilor tandemice și realizează grade înalte de heterozigotism;

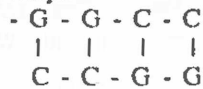
- numărului de nucleotide dintr-un miez: la eucariotele superioare și în special la om se întâlnesc frecvent secvențe (dA-dC și dG-dT).

Datorită acestui înalt polimorfism, minisateliții reprezintă regiuni hipervariabile cu strictă specificitate individuală, oferind potențial crescut de discriminare. Pentru a putea folosi în identificare ca marker, VNTR trebuie să prezinte pe lângă polimorfism calitatea de a se transmite independent de alți VNTR, iar datele din populație asupra alelelor să fie semnificative pentru a permite analiza statistică a rezultatelor. Minisateliții sunt reproductibili, stabili iar caracteristicile lor se transmit conform legilor lui Mendel.

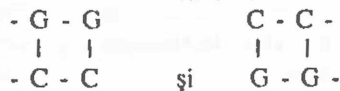
14.6.2. Principii generale de lucru

ADN supus acestui examen este secționat în zone specifice cu ajutorul *enzimelor de restricție*. Enzimele de restricție sunt de origine bacteriană. Ele se fixează pe ADN numai în locurile în care găsește o secvență de baze care le este specifică.

O astfel de zonă se numește *situs de restricție*. Astfel, cu ajutorul acestor enzime lanțul de ADN este fragmentat (digerat) în milioane de fragmente. De exemplu, enzima Hae III (folosită de FBI ca enzimă standard) va secționa moleculele de ADN numai la nivelul lanțurilor cu secvențe:



rezultând



La locul de secțiune molecula de ADN poate prezenta o extremitate rigidă (la nivelul căreia bazele sunt impare) sau o extremitate terminată bont (ale cărei baze sunt perechi). Principiul utilizării acestor enzime este că cei mai mulți minisateliti sunt bogați în GC, or această enzimă așa cum rezultă din cele prezentate mai sus recunoaște tocmai secvențele GG CC.

A. Jeffreys utilizează enzima de restricție Hin I cu ajutorul căreia a izolat minisatelitul pMS₅₁ utilizat pentru controlul intern al calității fragmentelor de ADN obținute.

Fragmentele de ADN rezultate se numesc *fragmente de restricție* și se caracterizează prin polimorfismul lungimii lor (RFLPs = *polimorfismul lungimii fragmentului de restricție*). Enzimele de restricție se caracterizează prin: (1) precizia cu care secționează ADN în anumite secvențe, (2) concentrația ionică și temperatura precisă la care se execută digestia și (3) precizia cu care o probă de ADN va hibridiza cu aceste fragmente.

Sondele ADN sunt secvențe de ADN cu secvență cunoscută, izolate și clonate. Ele se pot sintetiza sau se pot izola dintr-un fragment de ADN provenind dintr-o sursă biologică (de regulă bacteriană). Aceste sonde sunt utilizate pentru recunoașterea fragmentelor de restricție. Fenomenul de recombinare a sondelor cu

fragmentul de restricție se numește hibridare. Realizarea hibridării presupune un înalt nivel de omologie pe baza complementarității exacte între perechile de baze AT și GC. Verificarea acestei omologii se va realiza ulterior prin reapariția spectrului în ultraviolet original. Prealabil utilizării, sondele sunt marcate radioactiv sau chimic. Marcajul permite ca ulterior să se identifice fragmentul de restricție (fragment țintă). În acest fel se pot localiza una sau mai multe secvențe de bază din structura ADN.

Accidental se pot realiza și recombinări între fragmente de ADN a căror complementaritate este imperfectă, dar legăturile care se stabilesc în astfel de cazuri sunt mai puțin stabile.

Pentru detectarea polimorfismului ADN se folosesc două tipuri de sonde (sisteme):

- *sisteme sau sonde monolocus (SLS = single-locus systems)* care identifică o singură regiune variabilă (deci o singură secvență repetitivă a unui singur locus) situată pe o singură pereche de cromozomi și vizualizând astfel maximum două alele; avantajele utilizării acestor sonde constau în marea lor sensibilitate și în tehnica simplă pe care o solicită; la același preparat se pot utiliza succesiv mai multe sonde monoculare; SLS permit identificarea ADN de diferite origini dintr-o probă (secreție vaginală, sânge de la diverse persoane), dar nu permit identificarea sângelui uman de sângele animal și de produsele bacteriene (așa cum se poate întâlni frecvent în probele supuse analizei pentru identificare); cea mai mare variabilitate și cele mai multe informații ne oferă prin aplicarea acestei metode locusul MS₁, ale cărui alele au lungimi între 1-23 kb; unitatea repetitivă are lungime egală 9 pb, rezultând 2400 stări alelice de lungimi diferite. Prin această metodă la om nu s-au detectat alele comune la același locus (A. Jeffreys, 1991); exemple de sonde monolocus: sonda izolată din gena umană

a mioglobinei, corespunzând fragmentului care are rol în sinteza pigmentului, sonda de pe brațul scurt al cromozomului 11 din apropierea genei pentru insulină (secvența 5'), sonda din regiunea telomerică a brațului lung al cromozomului 14 care este strâns legat de gena imunoglobinei, sondă specifică pentru cromozomul Y etc.;

- *sisteme sau sonde multilocus (MLS = multi-locus systems)* care identifică simultan mai multe secvențe genomice VNTR distribuite în tot genomul, pe un ansamblu de cromozomi (exceptând cromozomii sexuali). În acest fel, sunt hibridate simultan un număr de regiuni înalt variabile și sunt vizualizate numeroase alele; rezultă mai multe benzi hipervariabile provenind din circa 30 loci autozomali independenți, care corespund unei familii repetitive (de ex. sondele multilocus 33.06, 33.15 utilizate de A. Jeffreys).

14.6.3. Etapele tehnice ale analizei amprentei genetice prin enzime de restricție

În scurtul timp care a trecut de la imaginarea metodei amprentei genetice, s-au pus la punct multe tehnici fiecare vizând obținerea unor avantaje cât mai importante și înlăturarea deficiențelor constatate pe parcurs. Dintre acestea menționăm: metoda radioactivă, colorarea cu Br-ethidium sau argint, metode care utilizează fluorescența, chimioluminiscența, bioluminiscența, metoda cu biotină-avidină etc. Menționăm că metodele neradioactive au aceeași sensibilitate cu metodele radioactive.

Etapele tehnicii clasice constau din:

Izolarea ADN - izolarea ADN constă în separarea lui de toți ceilalți constituenți ai eșantionului. Prima condiție pe care trebuie să o îndeplinească o probă supusă examenului pentru amprenta genetică este să conțină ADN în cantitate suficientă, deși această cantitate este cu mult mai

mică decât în cazul efectuării testelor clasice. Deși ADN este cea mai stabilă proteină, trebuie avut în vedere că este supus deteriorării în condiții de umiditate crescută, căldură, praf și expunere la raze ultraviolete. De aici rezultă importanța ca eșantioanele prelevate să fie protejate de factorii mai sus menționați, iar transportul să se efectueze spre laborator cât mai rapid.

Extracția trebuie să fie perfectă; în caz contrar, din două probe identice se pot obține imagini cu benzi diferite de ADN, ceea ce arată că una din cele două probe nu a fost complet purificată de componentele substratului de pe care s-a extras.

În principiu, pentru extracția ADN din celulele eșantionului se procedează la solvirea probei, la izolarea și purificarea ADN cu un detergent (dodecil sulfat de sodiu) și proteinează K (enzimă cu mare specificitate). Materialele pe care se lucrează sunt:

- *sânge prelevat de la persoane sau cadavre* - se prelevează 5-10 ml sânge în tuburi de plastic, pe EDTA, fără adaos de heparină conservat la 4° C (fără congelare) transportul putându-se face la gheață sau chiar la temperatura ambiantă (în funcție de vechimea petei); 1 ml de sânge conține 30 de micrograme ADN (hematiile neavând nucleu, cantitatea de ADN este mai mică), fiind necesari circa 20 microlitri sânge pentru sondele multilocus și cantități mai mici pentru sondele monolocus; probele de sânge prezintă dezavantajul că nu sunt omogene, cheagul fiind mai bogat în ADN;

- *secreția vaginală* - se recoltează 3 probe în tuburi de plastic, care se păstrează la loc uscat; se va avea în vedere că secreția vaginală supusă expertizei este de regulă amestecată cu spermă, precum și de faptul că în timp devine dificilă identificarea chiar și prin sistemul ABO; separarea spermei de secreția vaginală se face tot prin incubarea eșantionului în soluție SDS/protează K, enzima având propri-

etatea de a liza celulele vaginale, care sunt mai fragile, dar nu afectează nucleii spermilor datorită marelui lor conținut în legături S-S. Punțile S-S din nucleii spermilor pot fi dissociate cu dithiotreitol, după care urmează centrifugarea; în interpretarea rezultatelor trebuie avute în vedere eventualele cazuri de azoospermie sau de viol neurnat de ejaculare; 3 microlitri de spermă conțin circa 0,5 micrograme ADN (cantitate suficientă dacă se utilizează sonde multilocus); sondele unilocus pot fi folosite cu succes și pentru identificarea mai multor participanți la un viol, lucrându-se pe cantități de circa 200-500 ng ADN;

- *petele de sânge și spermă* trebuie să aibe diametrul de cel puțin 0,5-1 cm; probele se păstrează la loc uscat;

- *fire de păr* se recoltează cel puțin 10-20 fire cu rădăcină, urmând a fi ambalate în plastic și conservate la loc uscat;

- *fragmente de organe* (piele, mușchi, os, viscere, provenind chiar de la cadavre combustionate); ADN-ul conținut în acestea este supus degradării datorită condițiilor de mediu, cum ar fi umiditatea și temperatura crescute, care permit înmulțirea bacteriilor și astfel accelerarea autolizei și putrefacției; sub acțiunea exo și endonucleazelor se produce hidroliza atipică a ADN, rezultând fragmente de lungimi variate, susceptibile de a constitui surse de eroare în interpretarea rezultatelor; utilizarea sondei 33.15 a evidențiat o scădere până la dispariție a fragmentelor lungi de ADN (15-25 kb.), dar nu s-au pus totuși în evidență benzi care să ducă la concluzii eronate; oricum, în probele supuse acțiunii factorilor de mediu cantitatea de ADN scade; astfel, degradarea ADN (ca și a altor fragmente tisulare) este condiționată în mai mică măsură de timpul scurs de la deces (dovadă este obținerea de fragmente de ADN de 3,4 kb. de la mumiile egiptene, de la creier vechi de 7000 ani și de la oase cu o vechime de până la 5000 ani); în cazul

unor persoane dispărute, probele prelevate de la cadavru pot fi comparate cu acelea provenite de la membrii familiei, având în vedere transmiterea mendeliană a caracterelor, amprentelor ADN; referitor la conservarea ADN în funcție de organul din care se execută prelevarea s-a arătat că durata cea mai scurtă de conservare post-mortem este în ficat (24-36 ore, datorită bogăției în apă și enzime). Din splină și glanda tiroidă s-a putut recolta ADN în condiții satisfăcătoare după 5 zile, din scoarța cerebrală, ganglioni limfatici și mușchiul psoas după 3 săptămâni, iar din sânge până la 4 ani; din organe se prelevează fragmente cubice de cca 2-3 cm³ în flacoane de plastic, fără adaos de formol, evitând pe cât posibil zonele putrefiate; conservarea se face la 4°C; ADN se găsește în cantitate mai mare în oasele spongioase (pentru testare sunt suficiente 10 mg de țesut osos spongios), decât în osul compact; aplicarea metodei amprentei genetice pe oase a dus la crearea unui nou capitol în identificare, acela al "arheologiei moleculare"; cele mai bune rezultate în identificarea pe oase s-au obținut prin testarea ADN mitochondrial (R.E. Gaemsselm, H.C. Lee).

- *unghii, salivă, spută și chiar urină;*

- *pulpă dentară*, din care se poate extrage ADN cu greutate moleculară convenabilă chiar de la dinții care au fost supuși unor factori de mediu extrem de defavorabili pentru conservarea materialului biologic.

La fragmentele prelevate de la cadavrele combustionate s-au identificat în mod frecvent fragmente (GTG)₅ și mai rar fragmente (GACA)₄ și (GATA)₄. Aceste fragmente sunt consecința denaturării ADN la temperaturi ridicate. Alteori, inexplicabil s-a constatat prezența unor situsuri care au necesitat cantități foarte mari de enzime pentru digestie (J.T. Epplen și colab., 1991).

Digestia ADN constă în secționarea lui cu ajutorul enzimelor de restricție în frag-

mente cu talii diferite în funcție de poziția șiturilor de restricție. Aplicarea unei tehnici imperfecte duce la artefacte de digestie parțială, caracterizate prin apariția de benzi neprecise și neîmperecheate.

Electroforeza. Fragmentele de ADN obținute sunt încărcate negativ. Ele se separă într-un gel de agaroză sub efectul câmpului electric, migrând cu o viteză invers proporțională cu dimensiunile lor de la polul negativ la polul pozitiv; astfel gelul de agaroză are rol comparabil cu al unei site, care permite delimitarea fragmentelor după lungimea lor. De regulă, electroforeza se realizează pe gel de agaroză 0,8% la 90 V., timp de 1-2 ore. Rezultatul constă în apariția de striuri albișoare în agaroză, care corespund fragmentelor de ADN. În timpul acestei etape se poate verifica digestia. Migrarea electroforetică este controlată prin compararea valorilor lungimilor alelelor ADN cercetat cu acelea ale ADN martor. În caz de discordanță apare o migrare anormală. ADN marker utilizat în acest scop trebuie să fie format din fragmentele cele mai adecvate și trebuie plasat la intervale regulate pentru a arăta eventualele neomogenități ale gelului.

Transferul (Southern Blotting) constă în transferul fragmentelor rezultate din electroforeză pe o membrană de nylon (încărcată cationic) sau de nitrat de celuloză (stabilind cu aceasta o adezivitate covalentă). Mediile pe care se realizează transferul au aceleași dimensiuni cu gelul pe care s-a executat electroforeza.

Denaturarea ADN constă în ruperea punților de hidrogen dintre bazele complementare. Aceasta se realizează prin încălzire la temperatura de topire sau prin iradiere cu ultraviolete. Procesul de denaturare este controlat prin modificările apărute în spectrul de absorbție în ultraviolet.

Hibridarea ADN constă în *renaturarea (reunirea)* ADN. Pentru aceasta, membrana pe care s-a realizat transferul se introduce într-o soluție care conține sonda ale cărei secvențe sunt complementare cu

acelea ale fragmentului studiat. Prealabil acestei etape, membranele sunt hibridate cu sonde bacteriene pentru a evidenția eventuala contaminare cu ADN bacterian. Prezența contaminării bacteriene duce la imposibilitatea efectuării amprentei genetice (fig. 14.9).

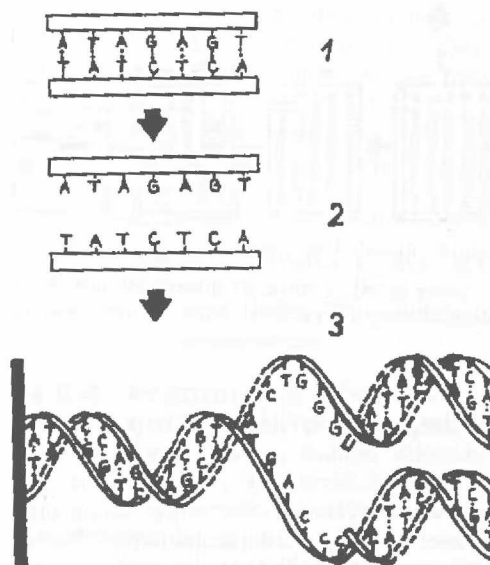


Fig. 14.9. - Hibridarea ADN cu fragmente de ADN complementare.

1- ADN-probă; 2- ADN-probă denaturat; 3- hibridare.

Autoradiografia pune în evidență hibridarea. Prealabil se spală membrana de moleculele de sondă nefixate, adică de secvențele cu legare nespecifică. Membrana se pune în contact cu un fir sensibil la radiații, la temperatura = -17°C , folosind un ecran amplificator (Fuji, Kodak). Filmul obținut reprezintă documentul final și prezintă poziția fragmentelor de ADN care s-au fixat pe sondă, sub formă de benzi întunecate. Distanța dintre benzi este direct proporțională cu lungimea benzilor. Benzile obținute au semnificație în identificare, dar nu au semnificații genetice deoarece nu există corespondență între acestea și determinismul genetic al unui anumit caracter (fig. 14.10).

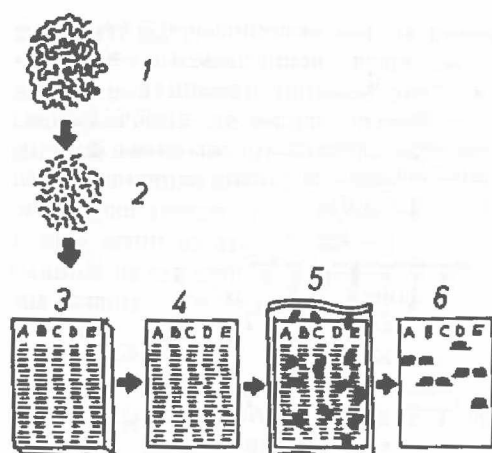


Fig. 14.10. - Etapele efectuării amprentei genetice
1- probă de ADN uman, 2- digestie enzimatică, 3- electroforeză, 4- transferul ADN; 5- hibridare; 6- autoradiografic.

Importanța calității expertizei.
Execuția tehnică a amprentei genetice și concluziile formulate trebuie să fie ireproșabile. Orice eroare atrage după sine consecințe judiciare incalculabile. Pentru aceasta trebuie îndeplinite strict următoarele condiții: respectarea unui protocol de lucru bine testat prealabil, personal de laborator cu calificare corespunzătoare, având seriozitatea necesară și respectarea cu rigurozitate a tehnicilor de lucru (orice substanță sau modificare nouă trebuind să fie multiplu verificată prealabil).

Concluziile cercetării trebuie să răspundă la problema dacă poziția benzilor identificate în proba examinată este aceeași sau nu cu a celor provenind de la ADN-ul presupusului învinuit. Pentru aprecierea poziției benzilor se poate folosi examinarea cu ochiul liber sau comparația cu etaloane. Pentru ca răspunsul să fie complet și precis este necesar ca laboratorul să execute controlul rezultatelor obținute, ceea ce se realizează intern (de către o a doua echipă aparținând aceluiași laborator) sau extern (prin compararea cu rezultatele altor laboratoare care folosesc

aceeași tehnică; pentru aceasta în prezent există două programe: Quidkam în SUA și Ednap - European DNA profiling group în Europa) (fig. 14.11).

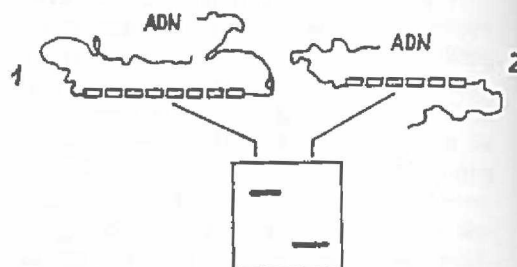


Fig. 14.11. - Identificarea prin amprenta genetică între doi indivizi (de remarcat poziția diferită a fragmentelor după electroforeză).

Datele obținute se compară obligatoriu cu frecvența benzilor detectate într-o populație. Pentru aceasta cercetările în vederea alcătuirii unei bănci naționale de date trebuie să se facă pe o populație dată și apoi pe subpopulații. Fiecare laborator trebuie să aibă date proprii asupra populației locale. Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească o probă de populație pentru a fi reprezentative sunt:

- să utilizeze pentru cercetările întregului lot metode standard;
- să conțină date care reflectă distribuția în populație în special a fragmentelor alelice cu joasă frecvență;
- dimensiunile fragmentelor RFLP trebuie să aibe o rezoluție de cel puțin 10 bp;
- să conțină și eșantioane de la diverse specii animale;
- datele obținute să fie publicate înainte de aplicarea metodei.

În SUA, Pentagonul are un fișier cu amprente genetice ale tuturor soldaților. Dificultățile majore în această țară se datorează prezenței a numeroase subpopulații cu amprente genetice caracteristice. De asemenea, este în curs de realizare și o bancă europeană de date.

Proba examinată poate să conțină ADN modificat, ADN amestecat sau cantități prea mari de ADN din diferite surse, ceea ce necesită controlul pe parcurs al rezultatelor parțiale pentru a evita o digestie incompletă; aceasta se întâlnește în special la probele de sânge unde se pot obține benzi mai mari, ceea ce se corectează prin adăugarea unei cantități de cinci ori mai mari de enzimă de digestie.

Cercetarea efectelor mutagene și a studiilor pe familii sunt necesare numai în cazurile în care sunt implicați mai mulți membri ai aceleiași familii sau când se cercetează identitatea unor persoane dispărute, neidentificate sau a resturilor umane. Studiul comparativ trebuie realizat și atunci când pata conține un amestec de secreții și țesuturi diferite (sânge, spermă, salivă). În cazul examinării secreției vaginale trebuie să se cerceteze și ADN din supernatantul vaginal.

În general, există trei tipuri de răspuns la expertizele prin metoda amprentei genetice: identitatea este stabilită (alelele au lungimi identice), excludere (alelele au lungimi diferite) și imposibilitatea de concluzie dacă alelele par identice.

Calculul riscului de eroare constă în a găsi în populație un alt individ care are aceleași caractere genetice la sondele folosite; dar șansa de a găsi în populația generală doi indivizi identici este de 1 la câteva milioane. Identitatea se afirmă când între două probe ADN de origini diferite se găsesc fragmente de ADN cu aceeași lungime. Există posibilitatea ca același ADN examinat de mai multe ori să prezinte variații de talie care să varieze cu câteva procente (fenomenul Band shift). În astfel de cazuri se stabilește deviația minimă acceptată.

Raportul de expertiză medico-legală trebuie să cuprindă: tehnica folosită, maratorii, controlul efectuat, descrierea extensivă a rezultatelor și fotografiile finale.

14.6.4. Problemele medico-legale privind amprenta genetică

Metoda amprentei genetice are mare aplicabilitate în medicina legală fiind folosită pentru: (1) identificarea persoanelor pe baza urmelor biologice (în

TABELUL 14.1. COMPARAȚIE ÎNTRE METODELE IMUNOLOGICE CLASICE ȘI AMPRENTA GENETICĂ

<i>Metode clasice (care utilizează mai mulți markeri genetici)</i>	<i>Amprenta genetică</i>
Necesită cantități mari de produs pentru a examina toți markerii.	Necesită cantități mici de produs (vezi textul).
Necesită material proaspăt, pe cât posibil neafectat de factorii de mediu, stabilitatea markerilor fiind scăzută.	Rezultatele nu sunt influențate de vechimea probei, ADN fiind foarte stabil în funcție de țesut (cel mai ușor degradabil este ADN hepatic datorită bogăției organului în apă și enzime, pe când în celelalte țesuturi se conservă bine).
Posibilitatea contaminării cu enzime ale bacteriilor de putrefacție.	Posibilitatea diferențierii ADN uman de ADN bacterian (metoda Rudler).
Concluzia nu este totdeauna certă.	Concluzia este certă (da/nu).
Se lucrează numai pe anumite probe biologice (sânge, spermă, salivă, păr, fragmente cadaverice).	ADN este prezent în toate celulele diploide, fiind stabil și identic.

crime, violuri, incest); (2) identificarea cadavrelor; (3) paternitate, începând din săptămâna a 8-10-a de sarcină; (4) controlul imigrației din unele țări și (5) identificarea sexului (pe pete de sânge păstrate 1-8 ani în laborator s-a identificat pe cromozomul Y o bandă specifică lui).

Metoda este relativ simplă și eficientă. Dificultățile sunt ridicate de costul ridicat, înalta calificare a personalului care efectuează manoperele, necesitatea unor studii în populație prealabil primelor expertize. Uneori, este necesară verificarea rezultatelor cu acelea ale metodelor clasice.

Principala problemă de ordin etic ridicată în efectuarea acestei metode este eventualul refuz al persoanei de a permite recoltarea probelor biologice, dar acesta este considerat prezumție de vinovăție.

14.6.5. Metoda reacției în lanț a polimerazei (PCR = polymerase chain reaction)

Această metodă s-a impus la rândul ei extrem de rapid. Ea vizează amplificarea in vitro a fragmentelor de oligonucleotide ADN cu ajutorul enzimelor tip Taq polimeraza (extrasă din *Thermophilus aquaticus*) și replicază (extrasă din *Thermis flavis*).

Simplitatea metodei reiese din faptul că după izolarea ADN care urmează a fi studiat se trece la executarea unor cicluri succesive de amplificare. Principiul metodei constă în replicarea unui segment de ADN ale cărei extremități sunt încadrate de primeri oligonucleotidici specifici. Pentru aceasta se folosesc două sonde (primer) care se fixează în poziții cunoscute pe ADN delimitând fragmentele de ADN care vor fi degradate enzimatic. Ciclurile implică denaturarea ADN țintă și extinderea celor doi primeri pe o templată cu ADN polimerază. Astfel, pentru executarea PCR sunt necesare matricea

(reprezentată de un lanț preexistent pe care se va sintetiza un lanț complementar) și primerii.

ADN genomic este extras de pe orice substrat folosind kit-uri de extracție (de exemplu kit de izolare Super Quick Gene DNA - Immucor).

Fiecare ciclu de amplificare constă din următoarele trei etape: (1) separarea lanțurilor complementare la temperatura de 95° C; (2) hibridarea primerilor amintuți și (3) hibridarea (extensia, elongația) realizată de Taq polimerază la temperatura de 65° C. Deoarece produsul de extensie al fiecărui primer poate servi ca templată pentru celălalt primer, după fiecare ciclu se dublează cantitatea de secvență țintă produsă în ciclul precedent. După 20 de cicluri se ajunge la circa un milion de fragmente ADN.

Taq polimeraza are avantajul de a fi termostabilă, încât nu este afectată de temperaturile crescute din etapele 2-3. Aceasta o diferențiază de ADN polimeraza obișnuită care este termosensibilă, trebuind să fie înprospătată după fiecare ciclu. Folosind Taq polimeraza se obține o amplificare mult mai selectivă pentru că temperaturile scăzute determină fixarea primerilor pe secvențe cu care stabilesc legături imperfect complementare.

Reacția se continuă cu electroforeza, utilizând o sondă care va testa dacă secvențele vizate au fost sau nu amplificate (fig. 14.12).

Prin metoda PCR se detectează polimorfismele de lungime ale fragmentelor amplificabile (Amp FLPs).

Reacția este limitată în prezent de: aplicabilitatea ei numai pe fragmente de ADN care conțin mai puțin de o mie de nucleotizi; susceptibilitatea la contaminarea cu ADN străin; lipsa de cunoștințe asupra unor zone polimorfe amplificabile prin PCR; cantitatea mare de GC și AT în secvențele VNTRs poate duce la amplificarea preferențială a unor alele din unitățile repetitive GC; posibilitatea

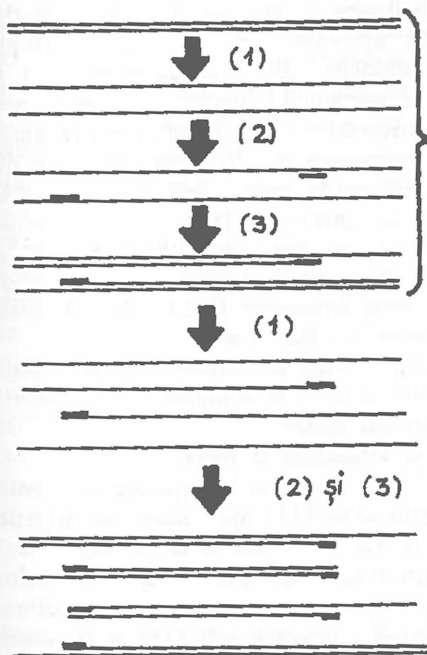


Fig. 14.12. - Etapele și ciclurile ADN - PCR (explicații în text).

aparitiei de erori consecutiv substituției de bază.

S-a reușit amplificarea ADN mitocondrial pe resturi scheletice foarte vechi. Metoda are multe dificultăți, dintre care cităm degradarea ADN uman în timp, existența unor inhibitori PCR în extractele scheletice, contaminarea probei în proporție de 99% cu ADN bacterian și fungic.

Deasemenea, aplicarea PCR pentru amplificarea ADN mitocondrial 333BP (T. Yoshii și colab.) în părul negru a evidențiat de asemenea inhibarea amplificării datorită apariției de melanină hidrosolubilă produsă fie de apa oxigenată folosită la colorarea părului, fie de oxidarea melaninei insolubile la simplul contact cu aerul.

Metoda PCR a suferit modificări. De exemplu în reacție a fost inclusă biotina - dUTP, care marchează alelele amplificate prin încorporare în acestea. Detecția produselor PCR se face prin transfer pe membrană Shouthern, prin incubație cu complexul avidină-fosfatază alcalină și un sub-

TABEL. 14.2. COMPARAȚIE ÎNTRE METODA STABILIRII AMPRENTEI GENETICE PRIN ENZIME DE DIGESTIE ȘI METODA PCR

Metoda cu enzime de digestie	Metoda PCR
Consumă mai mult ADN.	Necesită puțin ADN (1-10 ng) chiar parțial degradat, aceasta permite determinarea polimorfismului fragmentelor ADN dintr-un fir de păr, o singură celulă somatică, o spermie, sau pe ADN degradat prin formol, pe piese montate în parafină.
Nu permite o reanalizare a probei.	Permite reanalizări multiple.
Rezoluție scăzută pentru fragmente mici, unele alele putând rămâne nedetectate; aceasta duce la estimări incorecte a frecvenței lor în populație.	Permite studierea fragmentelor cu dimensiuni relativ mici.
Permite analiza simultană a mai multor regiuni VNTR	Permite analiza simultană a mai puține regiuni VNTR.
Poate necesita marcaj radioactiv.	Permite analiza fără marcaj radioactiv.
Necesită experiență, este costisitoare și complicată	Simplă.
Întreaga tehnică necesită cca 2 săptămâni.	Rapidă (douăzeci de cicluri se realizează în 2 ore) întreaga tehnică durând în total 48 ore, pentru că sunt suprimate etapele intermediare între izolare și tehnica propriu-zisă.
Numai anumite variante pot fi folosite pentru stabilirea sexului.	Se poate folosi în mod curent pentru stabilirea sexului, de ex. la jocurile olimpice.
Uneori ADN este prea degradat pentru a permite o analiză convenabilă.	Prin folosirea unui sistem marker bazat pe polimorfismul locusului HLA-DQalfa se poate amplifica un segment scurt de ADN.

strat kemiluminiscent. Sub acțiunea fosfatazei alcaline are loc defosforilarea substratului, rezultând emisie de lumină care se poate înregistra pe filme radiologice. Metoda este sensibilă (permite detecția produsului de amplificare începând de la cantități de pg de ADN la circa 20 minute de la expunere), efectuarea ei durând numai 2 zile (Decorte 1991).

Budowle și colab. (1991) au pus la punct metoda AMP-FLPs considerată ca oferind un grad mai mare de discriminare. Ea permite evaluarea alelelor din două probe dintre care una conține secvențe cunoscute, iar altele secvențe care urmează a fi stabilite.

Reacția Sanger se bazează pe utilizarea a patru coloranți fluorescenți diferiți, care sunt derivați de rodamină și fluoresceină. Fiecare din cei patru primeri sunt marcați cu o colorație proprie, examenul având loc pe un singur gel. Metoda permite controlul intern pe gel. Analiza rezultatelor se face automat folosind un laser ionic multilinie cu argon, pentru determinarea fluorescenței produselor PCR colorate. Semnalul de emisie trece prin patru filtre band specifice, pentru fiecare emisie maximă a colorantului. Semnalul este apoi analizat în ce privește mărimea fragmentelor și cuantificarea fluorescenței. Utilizarea sistemului laser îi conferă o mai mare sensibilitate, precizia rezultatelor fiind apreciată $\geq 98\%$.

14.6.6. Controverse și critici actuale

În multe țări metoda amprentei ADN este larg folosită în practica medico-legală, fiind admisă ca probă în justiție. După entuziasmul inițial, în ultimul timp au apărut numeroase critici, ceea ce a determinat constituirea în mai multe țări a unor comisii științifice care să investigheze și să aprecieze conținutul real al acestora (de exemplu, comisia condusă de National Research Council a US National Academy

of Sciences, a cărei activitate s-a materializat în 1992 într-un raport asupra "Tehnologiei ADN în medicina legală"). În loc să se ajungă la un acord în problemele controversate, raportul menționat a generat noi controverse. Cu toate că multe din recomandările acestui raport au fost aplicate de către instanțele din SUA, există îngrijorarea că de această dată este favorizată prea mult apărarea. Aceste rezultate au determinat F.B.I. și alte organisme să ceară un nou studiu.

Controversele și criticile aduse metodei de identificare prin amprenta ADN pot fi clasificate astfel:

A. Principii de bază

Diferitele tipuri de secvențe tandemice repetitive de ADN sunt dispersate în genomurile tuturor speciilor eucariotelor. Unii autori consideră că atâta timp cât informațiile privitoare la secvențele repetitive de ADN non-uman sunt extrem de sărace, amprentei ADN nu i se poate acorda încredere absolută în toate cazurile de identificare.

B. Tehnici de laborator

Procedeele tehnice utilizate sunt puse uneori la îndoială deoarece, pe de o parte, în diferite laboratoare nu se obțin în unele cazuri rezultate identice în analiza aceleiași eșantion, iar pe de altă parte, interpretarea rezultatelor este considerată subiectivă. Măsurarea lungimii alelelor este apreciată ca aproximativă, ceea ce limitează folosirea unor astfel de loci în analiza medico-legală și în studiile variabilității alelice în loci hipervariabili. Mai mult decât atât, unii autori consideră că deși alelele sunt considerate ca fiind strict independente, există totuși violări flagrante ale acestei independențe datorită fenomenelor electroforetice determinate de proprietățile fizice ale VNTR.

În plus, așa numitele "artefacte experimentale" sunt invocate pentru a explica elementele neconvenabile care apar în unele autoradiografii (de exemplu, când se constată o concordanță între ADN-ul sus-

pectului și ADN-ul probei, în ciuda prezenței unor benzi neconcordante sau în cazurile în care s-au obținut mai multe profiluri de ADN, din care numai cel mai convingător este prezentat ca probă în justiție). Astfel este cazul deja celebru al lui Andrew Deen care a fost declarat de curând nevinovat și achitat, după ce în 1990 a fost condamnat la 16 ani închisoare pentru viol, la dosarul său singura dovadă de comitere a acestuia fiind potrivirea ADN-ului său cu ADN-ul găsit la locul faptei. Datele ADN ale lui Deen erau bazate mai mult pe alele multi-locus, decât pe alele uni-locus. Medicii legiști britanici au numărat zece benzi de identitate (sau potrivire - "matching bands"), calculând un P de potrivire ("match probability") de 1/700.000. La apelul final făcut în instanță, un medic legist german desemnat pentru reexaminare a susținut că sunt de fapt numai șase benzi de potrivire, patru neutre și două discrepante, ceea ce duce în final la un P de potrivire de 1/33, concluzionând deci pentru nevinovăție (pentru că P este foarte mic, iar la dosar nu există alte probe).

Un alt punct disputat este *riscul mare de contaminare a probei* cu ADN "străin" (care se poate produce în orice stadiu, începând chiar de la prelevare), care poate interfera puternic rezultatele. Contaminarea poate fi de origine bacteriană sau, și mai periculos, de origine umană. Pentru tehnica PCR riscul de contaminare este mult mai mare decât în cazul tehnicilor convenționale, astfel că tocmai cel mai mare avantaj al acestei tehnici (faptul că necesită numai cantități foarte mici de ADN) reprezintă cea mai importantă sursă de posibilă eroare. Unele studii statistice arată că numai în 70% din cazuri s-a putut realiza amplificarea PCR și în numai 42% s-au obținut informații relevante privind excluderea/acuzarea unui suspect. Această limitare se datorează în special faptului că *materialul biologic supus analizei nu*

provenea de fapt de la agresor, ci de la victimă sau de la alte persoane.

C. Controverse generate de analiza bazei de date

După American Association of Blood Banks criteriile pe care trebuie să le întrunească expertizele ADN pentru a fi admisibile sunt:

- locii ADN trebuie validați prin studii familiale pentru a demonstra transmiterea lor mendeliană și rata de mutații;
- localizarea în cromozomi a locilor polimorfi trebuie să fie înregistrată la Yale Gene Library sau recunoscută de Internațional Human Gene Mapping Workshop;
- locii polimorfi trebuie prealabil prezentați în literatură;
- tipul de polimorfism trebuie definit din punct de vedere al caracterului unimultilocular sau dialelic/hipervariabil;
- eșantioanele trebuie să se găsească pentru testări de confirmare în laboratoare independente.

Deoarece populațiile umane nu sunt omogene, datele acumulate până în prezent nu permit generalizări fiabile în ceea ce privește frecvența alelelor în subpopulații/grupuri etnice, relevante pentru un caz anume. Problema ar fi simplificată dacă aprioric s-ar cunoaște că vinovatul și suspectul fac parte din același grup etnic. Există numeroase dovezi care demonstrează existența unor diferențe semnificative ale frecvenței unor alele VNTR la principalele grupuri rasiale din SUA. Dar, Lewontin și Hartl arată că cele trei mari grupuri rasiale (caucazienii, negrii și hispanicii) reprezintă aglomerări heterogene, care au propriile lor substructuri. Astfel de substructuri au fost deja evidențiate, diferențiind din acest punct de vedere pe polonezi de italieni. Deci, probabilitățile calculate pe baza unor eșantioane heterogene de date pot subestima adevăratele probabilități cu diferențe de până la al doilea ordin de mărime.

De asemenea, diferențe mari au fost găsite în probabilitatea de existență a unor profile ADN simulate între doi indivizi aleși la întâmplare din aceeași subpopulație. Astfel de erori se produc mai rar dacă se aplică principiul plafonului propus de National Research Council. Acest principiu este bazat pe datele rasiale/etnice disponibile și stabilește o valoare arbitrară minimă pentru frecvența fiecărei alele VNTR. În viitor, aceste frecvențe plafon trebuie stabilite pe o bază de date mai adecvată, mai bogată.

De asemenea este criticat de unii specialiști în genetica populațională modul în care probabilitățile legate de profilele ADN este prezentat în justiție.

Pentru a reduce riscul de condamnare al unui suspect pe baza amprentei ADN se recomandă:

- probabilitatea (P) unei potriviri să fie exprimată simplu ca proporția în care genotipul multilocus a fost observat în populația generală;

- utilizarea detaliilor frecvenței alelelor găsite în diverse subpopulații.

Totuși și acestor sugestii de interpretare li s-au adus critici în sensul că duc la estimări ale P în favoarea suspectului, fiind relativ neoperante dacă structura rasială a comunității în care a fost comisă crima este în defavoarea suspectului.

D. Controverse legate de aplicarea metodelor de calcul al probabilităților.

O problemă teoretică importantă, adesea ignorată, este probabilitatea ca un individ să aibă un profil ADN diferit (frecvent probabilitate mai mică) de probabilitatea ca el să aibă chiar profilul ADN al suspectului. Diferența între cele două probabilități poate fi foarte mare; pentru un profil ADN calculat pe 4 VNTR cu o probabilitate de potrivire necondiționată de 1/10.000.000, probabilitatea de potrivire condiționată pentru un frate al suspectului va fi de obicei mai mare de 1/100, în timp ce pentru un alt membru al grupului

populațional din care face parte suspectul poate fi chiar mai mare de 1/10.000.

Dacă se consideră că două profiluri ADN se potrivesc, relevanța acestei probe este susținută de ceea ce se numește "probabilitate de potrivire", adică de probabilitatea ca la o persoană neînrudită, aleasă întâmplător dintr-o populație reprezentativă, să i se potrivească profilul ADN cu profilul ADN al probei cercetate de la fața locului. Modul de calculare al acestei probabilități a fost și este în continuare mult discutat în literatură. În ceea ce privește interpretarea profilului ADN, aceasta ridică două întrebări: (1) care este probabilitatea ca la un individ nevinovat să aibă loc potrivirea secvențelor sale cu ale probei, cu alte cuvinte care este *probabilitatea de potrivire* ca o persoană aleasă la întâmplare să aibă același profil ADN cu proba și (2) care este probabilitatea ca un individ să fie nevinovat, deși secvențele sale se potrivesc cu cele ale probei, adică care este *probabilitatea de nevinovăție*.

Cele două întrebări cer răspunsuri diferite. Frecvent, instanța poate greși dând răspunsuri la prima întrebare prin intermediul celei de a doua (aspect numit "sofismul procurorului" - "prosecutor's fallacy") sau invers, ceea ce duce la confuzie între probabilitatea de potrivire și probabilitatea de nevinovăție.

De asemenea, în practica judiciară se neglijează în mod deliberat rudele apropiate ale suspectului, cu excepția situației când împotriva acestora există desigur acuzații. Această interpretare duce la o creștere artificială a valorii profilului ADN. Într-un caz recent, în Scoția, medicul legist a comunicat o probabilitate de potrivire de 1/40.000 pentru indivizii fără grad de rudenie cu suspectul, adăugând că "o rudă are probabilitate mai mare ca profilul său ADN să se potrivească cu cel al suspectului". În instanță, expertul a acceptat că P de potrivire pentru unul din frații suspectului este de circa 1/16. În cazul de față suspectul de față avea cinci frați;

instanța nu a luat în considerare aceasta pentru că nu existau date care să îi acuze pe aceștia; deoarece nu existau alte date de anchetă omisiunea instanței este o greșeală, deoarece calculul probabilistic arată că P de nevinovăție al suspectului care are cinci frați este mai mare de 1/5, pe când dacă ar fi existat un singur frate, această probabilitate ar fi fost de cel puțin 1/17.

De aceea, un P de potrivire mic nu poate prin el însuși să determine vinovăția. În multe cazuri în care acuzarea nu are alte date la dosar decât profilul ADN sunt aduse în instanță persoane numai pe această bază. Ipotetic, în absența oricăror alte date de anchetă, într-un oraș cu populație mai mare, pot exista 500.000 alte persoane care pot fi puse sub acuzare, P de nevinovăție a suspectului considerat fiind de cel puțin 1/3. Într-o astfel de situație, fie suspectul este criminal (dacă potrivirea este certă), fie criminalul este unul din cei 500.000 de indivizi potențial criminali (caz în care potrivirea s-a făcut prin hazard).

De aceea, instanța trebuie să ia în considerație atât probabilitatea de potrivire a ADN-ului cât și alte dovezi prezentate. O afirmație bazată numai pe probabilități este prin natura ei o afirmație de recunoaștere parțială și de aceea este periculoasă transformarea ei într-o dovadă certă care poate avea consecințe grave asupra unui individ nevinovat.

E. Probleme etice

Într-un timp relativ scurt de la utilizarea tehnologiei ADN în identificare, metoda a captat atenția și interesul organelor judiciare. Totuși, uneori juriștii nu sunt pregătiți să înțeleagă complet valoarea dovezilor rezultate din tehnicile ADN și de aceea nu pot lua decizii corecte. În acest context, dovezile rezultate din aplicarea metodei ADN au început să fie privite cu neîncredere de unele tribunale. Pe de altă parte, se conturează tendința ca medicii legiști să-și mențină concluziile bazate pe rezultatele obținute și pe măr-

turii de care au dispus inițial. Literatura de specialitate citează un fapt deosebit de grav care constă în implicarea unor cercetători care au ascuns unele detalii ale rezultatelor investigațiilor lor.

Toate constatările și faptele prezentate mai sus duc la concluzia că nu este corect ca vinovăția unei persoane să fie stabilită numai pe concluziile expertizei de laborator.

14.6.7. Concluzii

În prezent, este evident că unele din avantajele tehnologiei ADN în identificare au fost exagerate. De asemenea, există temeri în ceea ce privește prezentarea și interpretarea probelor ADN în instanță.

O analiză teoretică corectă arată că totuși anumite temeri legate de amprenta ADN sunt rectificabile prin efectuarea de studii populaționale și de analize statistice corecte. Amprenta ADN este un instrument prea valoros pentru a fi abandonat, criticile și controversele prezentate în literatură având un efect benefic pentru corectarea și ameliorarea ei. Introducerea tipării ADN cu primeri STR fluorescenți crește nivelul de precizie și sensibilitate.

Din studiul datelor din literatură reiese că direcțiile viitoare de dezvoltare a tehnologiei ADN sunt:

- crearea unei *Bănci Internaționale de date ADN pentru uz medico-legal* care să fie conectată cu bănci similare de date din diferite țări, în condițiile în care fluxul de informații și cerințele de aplicare a metodei sunt în permanentă creștere;

- *organizarea de programe de cercetare coordonate pe plan internațional* care să realizeze studii populaționale, detecția și studiul proprietăților locilor hipervariabili;

- *ameliorarea tehnologiei ADN* în toate etapele acesteia;

- *standardizarea tehnicilor de laborator* la nivel internațional

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	1/21
		Exemplar:	

EXPERTIZA ADN FILIAȚII

COD: POI – A15 Filiații

Elemente privind responsabilii/ operațiunea	Numele și prenumele	Funcția	Data	Semnătura
ELABORAT	Irina STREBA	Coordonator laborator	03.01.2018	
VERIFICAT	Carleta TEODORESCU	RM Șef laborator	03.01.2018	
VERIFICAT ȘI APROBAT	Prof. univ. dr. Diana BULGARU ILIESCU	DIRECTOR	03.01.2018	

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	2/21
		Exemplar:	

SITUAȚIA EDIȚIILOR ȘI A REVIZIILOR PROCEDURII

Nr. crt	Ediția/ revizia în cadrul ediției	Componenta revizuită	Modalitatea reviziei	Data de la care se aplica prevederile ediției sau reviziei ediției
	1	2	3	4
1.	Ediția 2/ revizia 0	x	x	03.01.2018

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	3/21
		Exemplar:	

1 Scop

Prezenta procedură documentează și menține în cadrul IML Iași un mod unitar și controlat de desfășurare a activității de stabilire a filiației în cadrul Compartimentului de genetică.

2 Domeniu de aplicare

Prevederile prezentei proceduri se aplică pentru activitățile cu indicativul A15 (filiații).

3 Definiții și abrevieri

3.1 Definiții

- SR EN ISO 9000: 2015 „Sisteme de management al calității. Principii fundamentale și vocabular”

3.2 Abrevieri

IML Iași - Institutul de Medicină Legală Iași
MC – Manualul calității
RMC - Reprezentantul Managementului Calității
ADN – Acid dezoxiribonucleic

4 Documente de referință

- MC – 01 – Manualul calității;
- SR EN ISO 9001: 2015 – Sisteme de management al calității - Cerințe;
- SR EN ISO 9000: 2015 - Sisteme de management al calității – Principii fundamentale și vocabular;
- Ordonanța de Guvern nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Hotărârea de Guvern nr. 774/2000 pentru aprobarea Regulamentului de aplicare a dispozițiilor Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Legea nr. 459/2001 pentru aprobarea Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Legea nr. 271/2001 privind aprobarea Ordonanței Guvernului nr. 57/2001 pentru modificarea și completarea Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Ordonanța Guvernului nr. 57/2001 pentru modificarea și completarea Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Ordinul nr. 1.134/C din 2000 pentru aprobarea Normelor procedurale privind efectuarea expertizelor, a constatărilor și a altor lucrări medico-legale
- Legea nr. 135/2010 privind Codul de procedură penală cu completările și modificările ulterioare
- Legea nr. 286/2009 privind Codul penal cu completările și modificările ulterioare

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	4/21
		Exemplar:	

- Lista activităților IML Iași cod POQ-06F1

5 Descrierea procedurii

Expertiza medico-legală a filiației biologice, incluzând pe cea de cercetare a paternității, se efectuează la cererea instanțelor judecătorești sau la cererea persoanelor interesate, în cadrul institutelor de medicină legală, conform competenței teritoriale și a normelor metodologice stabilite de Consiliul Superior de Medicină Legală, de către o comisie alcătuită dintr-un medic legist, care este președintele comisiei și 2 specialiști, având specialitatea în medicină de laborator, genetică medicală, biochimie sau biologie, cu competențe în genetică moleculară.

La baza activității de stabilire a filiației care se execută în cadrul Compartimentului de genetică se află examenul ADN.

Solicitările către Compartiment pot fi primite atât din partea instanțelor de judecată, cât și din partea unor persoane fizice, ambele fiind încadrate la indicativul A15.

Solicitările primite sunt transmise la Secretariatul General al IML Iași, unde sunt înregistrate de secretară în Registrul electronic documente cod PS – 01R1.

Atunci când, clientul nu solicită efectiv realizarea unei expertize de filiație, ci dorește doar furnizarea de informații și lămuriri referitoare la procedura de efectuarea a expertizei de filiație, solicitările sunt luate în evidență în „Registrul de corespondență Filiație ADN” cod POI-A15 FiliațiiR3.

În cazul solicitărilor primite din partea instanțelor de judecată, acestea sunt transmise spre analiză Directorului. Acesta face o primă analiză asupra solicitării și, după ce o încadrează pe indicative, conform „Listei activităților IML Iași” cod POQ-06F1, o transmite la Compartimentul de genetică, în vederea executării acesteia.

Pe lângă solicitările transmise de instanțele de judecată, IML Iași primește și execută solicitări formulate de persoane fizice. În acest sens, persoanele fizice, care doresc realizarea unui examen în vederea stabilirii filiației, ridică de la Secretariatul General al IML Iași formularul „Cerere expertiză filiații ADN” cod POI-A15 Filiații F1. După completarea cererii, aceasta este înregistrată la Secretariatul General al IML Iași. La înregistrarea cererii, secretara verifică dacă mai există în evidența IML Iași alte solicitări similare care privesc persoanele din cerere și consemnează acest lucru pe cerere. După înregistrarea cererii și după achitarea taxei, persoana fizică se prezintă la asistentul medical al Compartimentului de genetică unde depune cererea.

Toate solicitările care vizează efectuarea de expertize ADN în vederea stabilirii filiației sunt recepționate de asistentul medical al Compartimentului de genetică, care le înregistrează în „Registrul de evidență solicitări” cod POI-A15 Filiații R1. După înregistrare, solicitarea este predată șefului de

Expertize, examinări, constatări, examene de laborator și alte lucrări medico-legale asupra persoanelor în viață, cadavrelor, produselor biologice și corpurilor delict, precum și efectuarea de expertize medico-legale psihiatrice și de cercetare a filiației

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	5/21
		Exemplar:	

Compartiment în vederea analizării disponibilității resurselor umane și materiale necesare efectuării expertizei. În urma analizei, Șeful de Compartiment dispune după caz efectuarea sau nu a serviciului solicitat și stabilește, în funcție de gradul de prioritate al solicitării, gradul de încărcare al Compartimentului, termenul de execuție. Atunci când solicitările conțin termene ce nu pot fi onorate, se comunică solicitantului telefonic sau prin adresă scrisă acest lucru.

Șeful de Compartiment repartizează lucrările personalului de specialitate din cadrul Compartimentului de genetică, ținând cont de încărcătura fiecărui specialist, de complexitatea cazului și de competențele personalului. Lucrarea se repartizează unei echipe formată din doi specialiști, din care una este desemnată responsabil principal de caz.

Persoana desemnată responsabil principal de caz se ocupă de prelevarea probelor.

Prelevarea probelor se face în principiu în zilele de luni ale săptămânii, între orele 9.00-12.00, excepție făcând cazurile urgente.

Înainte de recoltarea probelor, se semnează „Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN” cod POI-A15 Filiații F2 de către toți cei implicați (persoanele în cauză (bărbat și femeie, rude), cadru superior și asistentă, eventual alte persoane care au fost martore la procesul de recoltare). Totodată, persoanele testate sunt informate asupra obiectivului analizei medico-legale și sunt rugate să își dea acordul în scris referitor la prelevarea de probe biologice. În cazul în care se refuză semnarea Procesului verbal de prelevare probe biologice - ADN” cod POI-A15 Filiații F2, recoltarea nu are loc. Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN” cod POI-A15 Filiații F2 semnat se anexează la dosarul cazului.

Prelevarea probelor de la persoanele în cauză se face în Camera de Recoltare. Se trece la prelevarea efectivă a probelor doar după ce responsabilul principal de caz face verificarea identității fiecărei persoane testate, pe baza confruntării datelor înscrise în solicitare (adresă din partea instanțelor de judecată sau cerere individuală din partea persoanelor fizice) cu cele din actele de identitate (Buletin de Identitate/ Carte de Identitate sau Certificat de naștere pentru minori) și înregistrează cazul în Registrul FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R2. O dată cu verificarea identității se fac și copii după actele de identitate prezentate, care se atașează la dosarul cazului. În cazul în care, copilul nu posedă certificatul de naștere, se ia o declarație scrisă a însoțitorilor în care aceștia declară că acela este copilul în cauză. În această situație, declarația se atașează la dosarul cazului și se solicită transmiterea ulterioară a unei copii a certificatului de naștere al copilului, fără de care nu vor fi eliberate rezultatele analizelor.

Se efectuează prelevările de probe biologice constând în eșantioane de salivă și, dacă se consideră că este cazul și eșantioane de sânge.

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	6/21
		Exemplar:	

După identificarea persoanelor, persoana responsabilă principală de caz înscripționează recipientele în care se vor preleva probele. Pentru prelevarea probelor de salivă se utilizează tuburi conținând tampoane de bumbac sterile, iar pentru prelevarea probelor de sânge, sistemul de recoltare prin vid (vacutainere). Pe eticheta recipientelor se înscripționează: numele și prenumele persoanei, numărul curent al cazului (F__), data și calitatea persoanei testate (M-mamă, C-copil, T-prezumtiv tată, BM-bunic matern, BP-bunic patern, UM-unchi de mamă, UP - unchi de tată, MM- mătușă maternă, MP – mătușă paternă, SP – soră paternă, SM – soră maternă etc.)

După înscripționarea recipientelor, persoanele în cauză sunt invitate, una câte una, pentru prelevarea probelor. Prelevarea constă în:

- Pentru salivă – ștergerea mucoasei interne a obrazului cu tampoanele sterile. Se prelevează de rutină **trei eșantioane** pentru fiecare persoană.
- Pentru sânge – puncționarea unei vene, de regulă la plica cotului. Se prelevează de regulă o singură probă, doar în cazuri speciale două, din care una se conservă.

Prelevarea probelor biologice se face de către asistentul medical al Compartimentului de genetică, sub supravegherea directă a responsabilului principal de caz.

În cazul în care la data programată de către instanță nu s-au prezentat toate persoanele convocate la testare, persoanelor prezente li eliberează o „Adeverință” cod POI-A15 Filiații F3, semnată de către Șeful de Compartiment, în care se consemnează prezentarea lor la procesul de prelevare (data și intervalul orar al prezenței în IML Iași).

După recoltare, probele sunt transferate în Camera de extracție ADN a probelor din cadrul Compartimentului de Genetică, unde responsabilul principal de caz, care a supravegheat prelevarea de probe, are obligația să efectueze procedurile de conservare a probelor: probele de sânge sunt depozitate în frigiderul de probe, la o temperatură de 4°C (pentru cazurile speciale, când se dorește conservarea celei de-a doua probe, la o temperatură de - 20°C); **tampoanele bucale sunt conservate prin decuparea tubului și plasarea lui într-un plic de hartie inscripționat cu datele persoanei și indicativul. Toate plicurile de la același caz se pun într-un plic mare inscripționat. Se pastrează la temperatura camerei.**

Orice întârziere privind prelucrarea probelor este comunicată în scris solicitantului precizându-se motivele.

În momentul începerii prelucrării probelor, responsabilul principal de caz înregistrează probele în Registrul de lucru FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R3, unde fiecare probă primește un indicativ propriu.

După înregistrare, se trece la efectuarea analizelor care presupune parcurgerea următoarelor etape:

1. Extracție ADN
2. Cuantificare

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	7/21
		Exemplar:	

3. Amplificare PCR
4. Detecția și identificarea produșilor de reacție în analizatorul genetic automat
5. Prelucrarea statistică a rezultatelor
6. Interpretarea rezultatelor

Pe măsură ce sunt efectuate etapele expertizei se înregistrează rezultatele în Registrul de lucru FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R3, iar la final pe baza corelării rezultatelor obținute se întocmește „Fișa de genotipare” cod POI-A15 Filiații F4.

După finalizarea analizelor, rezultatele înregistrate servesc la întocmirea „Raportului de expertiză medico-legală – Examen ADN” cod POI-A15 Filiații F5.

Raportul este redactat și dactilografiat electronic în ciornă de responsabilul principal de caz.

Rezultatele investigațiilor sunt prezentate apoi și celorlalți membri ai comisiei de expertiză, care formulează concluziile.

După formularea concluziilor, responsabilul principal de caz elaborează forma finală a raportului, care este apoi verificată și semnată de toți membrii comisiei.

Comisia de expertiză care semnează rapoartele de expertiză medico-legală – Examen ADN este desemnată prin decizie de conducerea IML Iași. Comisia de expertiză este alcătuită dintr-un medic legist, care este președintele comisiei, și 2 specialiști având specialitatea în medicină de laborator, genetică medicală, biochimie, biologie, cu competențe în genetică moleculară.

Rapoartele se redactează de regulă în două exemplare, iar la cererea clientului se eliberează și al treilea exemplar.

Rapoartele sunt înregistrate în Registrul FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R2, fiind apoi expediate solicitantului prin Secretariatul general al IML Iași, pe bază de semnătură (pentru persoane fizice) sau prin poștă cu confirmare de primire (pentru persoane fizice și juridice), numai după ce s-a făcut confirmarea plății de către Biroul Contabilitate pentru serviciile prestate.

Eșantioanele de probe biologice care nu au fost supuse testării se păstrează în spații special amenajate, conform prevederilor procedurii operaționale „Păstrarea produsului” cod POQ-09. De asemenea, se arhivează și extractele de ADN prin congelare (minim 5 ani), în spații special amenajate, în cutii etichetate (cu etichete purtând înscrisul „de la indicativ nr. până la”). Restul produșilor de reacție din celelalte etape de laborator nu se conservă.

6 Responsabilități

Director:

Expertize, examinări, constatări, examene de laborator și alte lucrări medico-legale asupra persoanelor în viață, cadavrelor, produselor biologice și corpurilor delict, precum și efectuarea de expertize medico-legale psihiatrice și de cercetare a filiației

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	8/21
		Exemplar:	

- repartizează rezolvarea solicitărilor
- semnează adresele de însoțire a rezultatelor

Șef Compartiment:

- organizează, îndrumă și controlează buna desfășurare a activității Compartimentului;
- analizează solicitările primite și dispune rezolvarea acestora;
- repartizează către personalul din subordine rezolvarea solicitărilor primite;
- asigură aplicarea cerințelor sistemului de management al calității;
- asigură condiții optime de desfășurare a activității;
- asigură desfășurarea proceselor numai cu personal calificat;
- asigură păstrarea înregistrărilor emise;
- asigură și verifică desfășurarea proceselor cu echipamente verificate și calificate;
- asistă la recoltarea de probe în anumite cazuri speciale;
- eliberează adeverință pentru prezentare la prelevare de probe

Asistent medical:

- ține evidența solicitărilor și expedierilor
- ține evidența loturilor
- asigură interfața cu clientul
- asigură recoltarea probelor de sânge (la cerere)
- semnează Procesul verbal de prelevare a probelor biologice

Responsabilul principal de caz:

- prelevează probele de salivă
- semnează Fișa de prelevare a probelor
- înregistrează probele în Registrul FILIAȚII ADN
- înregistrează cazurile în Registrul de lucru FILIAȚIE ADN
- efectuează analiza probelor
- redactează raportul de expertiză
- formulează concluziile raportului de expertiză
- elaborează, verifică și semnează raportul de expertiză

Comisia de expertiză

- formulează concluziile raportului de expertiză
- elaborează, verifică și semnează raportul de expertiză

7 Înregistrări. Formulare

- 7.1 Cerere expertiză filiație cod POI-A15 Filiații F1
- 7.2 Registrul de evidență solicitări cod POI-A15 Filiații R1
- 7.3 Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN” cod POI-A15 Filiații F2
- 7.4 Adeverință cod POI-A15 Filiații F3
- 7.5 Registrul FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R2

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	9/21
		Exemplar:	

- 7.6 Registrul de lucru FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R3
- 7.7 Fișa de genotipare cod POI-A15 Filiații F4
- 7.8 Raportul de expertiză medico-legală – Examen ADN cod POI-A15 Filiații F5
- 7.9 Registrul de corespondență Filiație ADN cod POI-A15 FiliațiiR3
- 7.10 Solicitare internă cod POI-A15 Filiații F6

8 Anexe

- 8.1 Anexa 1 - Cerere expertiză filiație cod POI-A15 Filiații F1
- 8.2 Anexa 2 - Registrul de evidență solicitări cod POI-A15 Filiații R1
- 8.3 Anexa 3 - Registrul FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R2
- 8.4 Anexa 4 - Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN” cod POI-A15 Filiații F2
- 8.5 Anexa 5 - Adeverință cod POI- A15 Filiații F3
- 8.6 Anexa 6 - Registrul de lucru FILIAȚII ADN cod POI-A15 Filiații R3
- 8.7 Anexa 7 - Fișa de genotipare cod POI-A15 Filiații F4
- 8.8 Anexa 8 - Raportul de expertiză medico-legală – Examen ADN cod POI-A15 Filiații F5
- 8.9 Anexa 9 - Registrul de corespondență Filiație ADN” cod POI-A15 FiliațiiR3
- 8.10 Anexa 10 - Solicitare internă cod POI-A15 Filiații F6

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	10/21
		Exemplar:	

Anexa 1

cod POI-A15 Filiații F1 ed. 1, rev 0

CERERE EXPERTIZĂ FILIAȚIE

Domnule Director,

Subsemnatul domiciliat
.....
și subsemnata domiciliată
.....
vă rugăm să binevoiți a aproba efectuarea examenului genetic ADN pentru
stabilirea filiației minorului (ei) născut (ă)
la data de

Data

Semnăturile

Domnului Director al IML Iași

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	11/21
		Exemplar:	

Anexa 2

cod POI-A15 Filiații R1 ed. 1, rev 0

REGISTRUL DE EVIDENȚĂ SOLICITĂRI

Nr. Crt	Indicativ nr. (IML Iași)	Data intrării	Solicitant/Inst anță Cerere	Dosar	Nume prenume persoane investigate	Data predării raportului la Secretariatul general IML Iași	Obs

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	12/21
		Exemplar:	

Anexa 3

cod POI-A15 Filiații R2 ed. 1, rev 0

REGISTRUL FILIAȚII ADN

Nr. crt (F_)	Data recoltării	Nr. de înregistrare IML Iași	Solicitant / Nr. adresă	Date de identificare a persoanelor		Indicativ probă	Responsabil caz	Data finalizării	Data predării raportului/ Semnătura de primire	Obs
				CNP	Nume, prenume/ Vârsta					

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	13/21
		Exemplar:	

Anexa 4

cod POI-A15 Filiații F2 ed. 1, rev 0

PROCES VERBAL DE PRELEVARE PROBE BIOLOGICE

Nr. caz

Încheiat astăzi cu ocazia prelevării de probe biologice necesare efectuării expertizei ADN în vederea stabilirii filiației, solicitată prin adresa/ cererea înregistrată la IML Iași cu nr..... Probele biologice sunt prelevate de la următoarele persoane:

Nume /Prenume Semnătura	CNP	Calitatea	Proba biologică prelevată		Indicativul probei prelevate
			Salivă* (nr. esantioane prelevate)	Sânge** (nr. esantioane prelevate)	

*Eșantionul de salivă a fost prelevat de pe fața internă a mucoasei obrazului pe suport de tampon de vată steril

**Eșantionul de sânge a fost prelevat prin puncție intravenoasă în vacutainer steril având suport anticoagulant de EDTA

Persoanele mai sus menționate declară că au fost informate asupra obiectivului acestei expertize medico-legale și sunt de acord cu prelevarea de probe biologice.

Prelevarea probelor biologice a fost efectuată de :
(nume, prenume, semnătura)

Au asistat la prelevare:

1.
(nume, prenume, semnătura)
2.
(nume, prenume, semnătura)
3.
(nume, prenume, semnătura)

Prelevarea a fost efectuată la ora

Expertize, examinări, constatări, examene de laborator și alte lucrări medico-legale asupra persoanelor în viață, cadavrelor, produselor biologice și corpurilor delictate, precum și efectuarea de expertize medico-legale psihiatrice și de cercetare a filiației

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	14/21
		Exemplar:	

Anexa 5

cod POI-A15 Filiații F3 ed. 1, rev. 0

A15/

ADEVERINȚĂ

Catre,

.....

Referitor la dosarul nr. privind stabilirea filiației prin expertiza ADN, prin prezenta vă facem cunoscut, că la data stabilită pentru prelevarea probelor biologice, necesare efectuării acestei expertize, a fost prezent/prezentă la sediul IML Iași domnul/doamna împreună cu minorul/minora

Șef compartiment

Data:

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	15/21
		Exemplar:	

Anexa 6

cod POI-A15 Filiații F3 ed. 1, rev 0

Registru de lucru FILIAȚII ADN

Nr.	Indicativ de lucru al probei	Proba (tipul probei/apartenența)	Extracție (metoda/data/NP analist)	Cuantificare ADN - opțional (protocol/kit/ data/NP analist)	PCR (denumire kit/diluție/protocol amplificare/data/NP analist)	Secvențiere (denumire kit/diluție/protocol amplificare/data/NP analist)

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	16/21
		Exemplar:	

Anexa 7

cod POI-A15 Filiații F4 ed.1, rev.0

FIȘA DE GENOTIPARE NR. CAZ _____

locus	mama	copil	prezumtiv tata	IP
D8S1179				
D21S11				
D7S820				
CSF1PO				
D3S1358				
TH01				
D13S317				
D16S539				
D2S1338				
D19S433				
vWA				
TPOX				
D18S51				
D5S818				
FGA				
AMEL				

IPC = _____

PP = _____ %

Întocmit de:

Data:

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	17/21
		Exemplar:	

Anexa 8



**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE
INSTITUTUL DE MEDICINĂ LEGALĂ IAȘI
Str. Buna Vestire, nr. 4, Iași
Tel. 0232/267751, Fax. 0232/261617
Nr. din**

Către,

.....

La adresa privind dosarul nr. (La cererea dumneavoastra)....., vă înaintăm Raportul de Expertiză Medico-Legală – Examen ADN solicitat, privind stabilirea paternității minorului

Taxa de expertiză în valoare de RON a fost achitată cu chit. Nr..... din data de

DIRECTOR,

.....

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	18/21
		Exemplar:	

cod POI-A15 Filiații F5 ed. 1, rev 0

RAPORT DE EXPERTIZĂ MEDICO-LEGALĂ

- EXAMEN ADN – nr. din

Subsemnații (N/P, titlu, calitatea)

-, medic primar legist,
-, biolog,
-, biochimist,

toți de la IML Iași, întruniți în comisie în conformitate cu prevederile Ordonanței Guvernamentale nr. 1/2000, în baza adresei privind dosarul nr., am efectuat în cadrul Compartimentului de Genetică Medico-Legală al IML Iași, examenul ADN solicitat în baza probelor recoltate, constatând următoarele:

Obiectivele expertizei: Stabilirea paternității copilului

Tată biologic prezumtiv :

Descrierea probelor care au făcut obiectul examenului ADN:

În cadrul Compartimentului de Genetică Medico-Legală al IML Iași, în data de au fost prelevate următoarele probe biologice:

Nr. crt	Nume/Prenume	CNP	Calitatea	Eșantion		Indicativ proba la recoltare
				salivă*	sânge*	
1			prezumtiv tată		1	2/19.09.2011-T
2			mamă		1	2/19.09.2011-M
3			copil		1	2/19.09.2011-C

* proba de salivă este recoltată de pe fața internă a obrazului pe suport de vată de bumbac steril, în tub închis,

** proba de sânge integral, cca 2 ml este recoltată prin puncție venoasă, în vacutainer steril, pe suport de EDTA

Recoltarea probelor de sânge s-a efectuat cu acordul părinților, care au semnat Procesul verbal de prelevare de probe biologice. Restul probelor care nu au fost supuse analizei au fost conservate în compartiment, conform recomandărilor metodologice referitoare la conservarea probelor biologice în vederea examenului ADN.

METODA DE ANALIZĂ:

1. Extracția ADN:

2. Cuantificarea ADN:

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	19/21
		Exemplar:	

3. Amplificarea ADN:
4. Electroforeza capilară
5. Analiza și interpretarea datelor

REZULTATE:

Genotipurile cazurilor analizate sunt indicate în **anexa**.

CONCLUZII:

Studiul comparativ al **profilurilor genetice** indică următoarele:

1. **Numitul** poate fi tatăl copilului, cu o probabilitate a paternității de PP=..... %, IPC=.....
2. **Este exclus ca** să fie tatăl biologic al copilului Excluderea a fost făcută pe .. loci STR, conform tabelului de mai sus

COMISIA DE EXPERTIZĂ

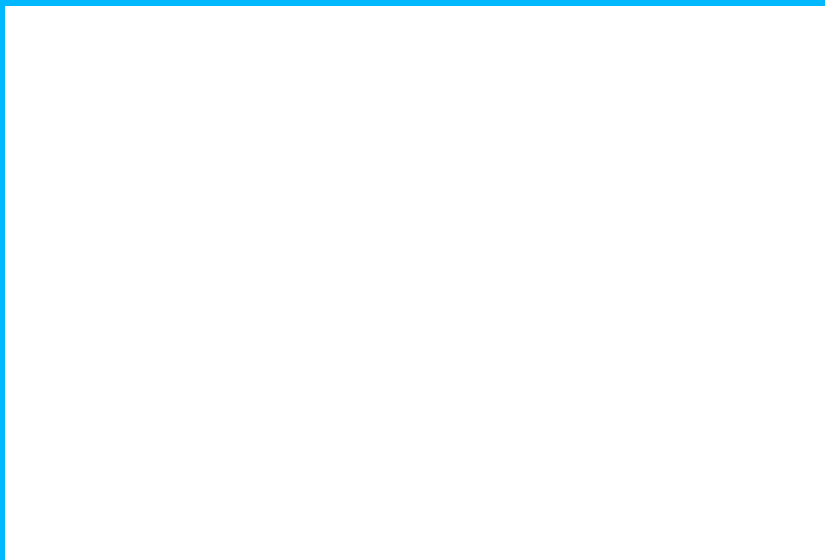
(Numele, prenumele și semnăturile membrilor comisiei)

Medic primar legist,
.....

Biolog,
.....

Biochimist,
.....

*Prezentul raport
redactat pe
către
caz,*



*este
pagini de
responsabil*

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	20/21
		Exemplar:	

Anexa 9

cod POI-A15 Filiații R4 ed. 1, rev 0

Registrul de corespondență Filiații ADN

Nr. crt.	Indicativ/ Nr. înregistrare IML Iași	Data primirii	Numele și prenumele persoanei în cauză	Solicitant	Nr. și data adresei de solicitare	Răspuns	Data finalizării

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Filiații
	EXPERTIZA ADN FILIAȚII	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	21/21
		Exemplar:	

Anexa 12

cod POI-A15 Filiații F6 ed. 1, rev 0

SOLICITARE INTERNĂ

Nr. A15..... Data:

Nume:

Solicitare: grupă sanguină status secretor

Material biologic: sânge os fir de păr secreții alte

Tip extracție:

Solicitant:

Rezultat:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Analizat,

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	1/17
		Exemplar:	

EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE

COD: POI – A15 Identificare

Elemente privind responsabilii/ operațiunea	Numele și prenumele	Funcția	Data	Semnătura
ELABORAT	Irina STREBA	Coordonator laborator	03.01.2018	
VERIFICAT	Carleta TEODORESCU	RM Șef laborator	03.01.2018	
VERIFICAT ȘI APROBAT	Prof. univ. dr. Diana BULGARU ILIESCU	DIRECTOR	03.01.2018	

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	2/17
		Exemplar:	

SITUAȚIA EDIȚIILOR ȘI A REVIZIILOR PROCEDURII

Nr. crt	Ediția/ revizia în cadrul ediției	Componenta revizuită	Modalitatea reviziei	Data de la care se aplica prevederile ediției sau reviziei ediției
	1	2	3	4
1.	Ediția 2/ revizia 0	x	x	03.01.2018

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	3/17
		Exemplar:	

1 Scop

Prezenta procedură documentează și menține în cadrul în cadrul Laboratorului de genetică un mod unitar și controlat de desfășurare a activității de expertiză medico-legală ADN în scopul identificării de persoane.

2 Domeniu de aplicare

Prevederile prezentei proceduri se aplică pentru activitățile cu indicativul A15 (identificare).

3 Definiții și abrevieri

3.1 Definiții

- SR EN ISO 9000: 2015 „Sisteme de management al calității. Principii fundamentale și vocabular”

3.2 Abrevieri

IML Iași - Institutul de Medicină Legală Iași
MC – Manualul calității
RMC - Reprezentantul Managementului Calității
ADN – Acid dezoxiribonucleic

4 Documente de referință

- MC – 01 – Manualul calității;
- SR EN ISO 9001: 2015 – Sisteme de management al calității - Cerințe;
- SR EN ISO 9000: 2015 - Sisteme de management al calității – Principii fundamentale și vocabular;
- Ordonanța de Guvern nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Hotărârea de Guvern nr. 774/2000 pentru aprobarea Regulamentului de aplicare a dispozițiilor Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Legea nr. 459/2001 pentru aprobarea Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Legea nr. 271/2001 privind aprobarea Ordonanței Guvernului nr. 57/2001 pentru modificarea și completarea Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Ordonanța Guvernului nr. 57/2001 pentru modificarea și completarea Ordonanței Guvernului nr. 1/2000 privind organizarea activității și funcționarea instituțiilor de medicină legală
- Ordonanța de Guvern nr. 1/2000, republicată
- Ordinul nr. 1.134/C din 2000 pentru aprobarea Normelor procedurale privind efectuarea expertizelor, a constatărilor și a altor lucrări medico-legale
- Legea nr. 135/2010 privind Codul de procedură penală cu completările și modificările ulterioare

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	4/17
		Exemplar:	

- Legea nr. 286/2009 privind Codul penal cu completările și modificările ulterioare
- Lista activităților IML IAȘI cod POQ-06F1

5 Descrierea procedurii

Expertiza medico-legală ADN în scopul identificării de persoane se efectuează la cererea instanțelor judecătorești sau la cererea persoanelor interesate, în cadrul institutelor de medicină legală, conform competenței teritoriale și normelor metodologice stabilite de Consiliul Superior de Medicină Legală, de către o comisie alcătuită dintr-un medic legist, care este președintele comisiei, și 2 specialiști având specialitatea în medicină de laborator, genetică medicală, biochimie sau biologie, cu competențe în genetică moleculară.

Solicitările către laborator pot fi interne (primate de la laboratoare de specialitate din cadrul IML IAȘI – Laboratorul de Medicină Clinică, Laboratorul de Prosectură), cât și externe (primate de la Parchet, Judecătorii, alte laboratoare, Serviciile de medicină legală teritoriale).

Solicitările externe sunt încadrate la indicativul A₁₅, în timp ce cele interne păstrează indicativul activității la care se corelează expertiza medico-legală privind identificarea de persoane solicitată.

Solicitările externe sunt mai întâi înregistrate la Secretariatul General al IML Iași în Registrul electronic documente cod PS – 01R1, iar apoi sunt transmise spre analiză Directorului IML Iași. Directorul IML Iași face o primă analiză asupra solicitării și după ce o încadrează pe indicative, conform Listei activităților IML IAȘI cod POQ-06F1, o transmite la Compartimentul de Genetică Medico-Legală în vederea executării acesteia.

Solicitările vin însoțite de probele care fac obiectul examenelor cerute. Probele pot fi: sânge, fragment de țesuturi sau de organe, tampoane cu diverse secreții recoltate de la cadavru, fire de păr, obiecte purtătoare de pete biologice în vederea identificării acestora (obiecte de îmbrăcăminte, probe de sol, obiecte de la locul faptei etc.).

În cazul solicitărilor externe, probele sunt aduse la Compartimentul de Genetică Medico-Legală de persoana delegată, fiind însoțite de o adresă de solicitare. Până la înregistrarea adresei de către Secretariatul General al IML Iași și la luarea ei în evidență de Compartimentul de Genetică Medico-Legală, probele sunt depozitate temporar în cadrul laboratorului în spații special amenajate.

După înregistrarea adresei, în prezența delegatului, se verifică concordanța dintre datele înscrise în adresă și conținutul coletului cu probe. Dacă sunt identificate neconcordanțe sau dacă probele sunt neconforme, acestea sunt returnate solicitantului cu adresă de însoțire.

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	5/17
		Exemplar:	

Pentru solicitările externe, probele pot fi primite și prin poștă, însoțite de adresa de solicitare. În acest caz, ele sunt primite de Secretariatul General al IML Iași care le predă pe bază de semnătură la Compartimentul de Genetică Medico-Legală, o dată cu adresa de solicitare.

În cazul solicitărilor interne, probele sunt recoltate în cadrul laboratoarelor de specialitate ale IML IAȘI și sunt predate la Compartimentul de Genetică Medico-Legală, în același timp cu adresa de solicitare.

După înregistrarea tuturor solicitărilor în „Registrul de evidență intrări-expedieri-ADN Biocriminalistică” cod POI-A15 Identificare R1, acestea sunt predate șefului de compartiment în vederea analizării disponibilității resurselor umane și materiale necesare efectuării în termenul solicitat a cererii. În urma analizei, șeful de compartiment dispune după caz efectuarea sau nu a serviciului solicitat și stabilește, în funcție de gradul de prioritate a solicitării, termenul de execuție. Atunci când solicitările conțin termene ce nu pot fi onorate, se comunică solicitantului prin adresă scrisă acest lucru.

Șeful de compartiment repartizează lucrarea personalului de specialitate din laborator, ținând cont de încărcătura fiecărui specialist, de complexitatea cazului și de competențele personalului. Lucrarea se repartizează unei echipe formată din doi specialiști, din care una este desemnată responsabil principal al cazului.

Persoana desemnată responsabil principal de caz se ocupă de prelevarea probelor de referință pentru situațiile în care instituția solicitantă (poliție, parchet, instanța de judecată, etc.) se adresează IML IAȘI în acest scop.

Prelevarea probelor se face în orice zi a săptămânii, în cadrul programului de lucru cu publicul, excepție făcând cazurile urgente.

Persoanele ce vor fi supuse testării sunt informate asupra obiectivului analizei medico-legale și sunt rugate să își dea acordul în scris referitor la prelevarea de probe biologice. În acest sens se completează rubrica corespunzătoare din „Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN” cod POI-A15 Identificare F1. Prelevările pentru probe biologice de referință constau în eșantioane de salivă și, numai în situații excepționale, stabilite de șeful de compartiment, eșantioane de sânge.

Prelevarea probelor de la persoanele în cauză se face în Camera de Recoltare. Se trece la prelevarea efectivă a probelor doar după ce persoana responsabil principal de caz face verificarea identității persoanei, pe baza confruntării datelor înscrise în solicitare (adresă din partea instanțelor de judecată sau cerere individuală din partea persoanelor fizice) cu cele din actele de identitate (Buletin de Identitate/ Carte de Identitate/Pașaport/etc.). O dată cu verificarea identității se fac și copii după actele de identitate prezentate,

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	6/17
		Exemplar:	

care se atașează la dosarul cazului. În cazul în care, persoana de testat nu posedă act de identitate, aceasta este fotografiată și se ia o declarație scrisă a însoțitorilor în care aceștia declară că persoana prezentată la testare este una și aceeași cu persoana menționată în documentația oficială. În această situație, declarația se atașează la dosarul cazului și se solicită transmiterea ulterioară a unei copii a actului de identitate a persoanei supusă testării de la autoritatea care instrumentează cazul.

După identificarea identității subiectului supus testării, persoana responsabil principal de caz înscripționează recipientele în care se vor preleva probele. Pentru prelevarea probelor de salivă se utilizează tuburi conținând tampoane de bumbac sterile, iar pentru prelevarea probelor de sânge, sistemul de recoltare prin vid (vacutainere). Pe eticheta recipientelor se înscripționează: numărul curent al cazului (J__), data și calitatea persoanei testate (Inc -inculpat, Susp – suspect, Vict -victima, etc.)

După înscripționarea recipientelor, subiectul în cauză este invitat pentru prelevarea probelor. Prelevarea constă în:

- Pentru salivă – ștergerea mucoasei interne a obrazului cu tampoanele sterile. Se prelevează de rutină trei eșantioane pentru fiecare persoană.
- Pentru sânge – puncționarea unei vene, de regulă la plica cotului. Se prelevează de regulă o singură probă, doar în cazuri speciale două, din care una se conservă.

Prelevarea probelor biologice se face de către asistentul medical al Compartimentului de Genetică Medico-Legală, sub supravegherea directă a responsabilului principal de caz.

După prelevarea de probe, se semnează după caz „Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN” cod POI-A15 Identificare F1, de către toți cei implicați: cadre superioare prezente, alte persoane care au fost martore la procesul de recoltare. Acest document se depune în dosarul cazului. La cazurile speciale este prezent și Șeful de compartiment.

După recoltare, probele sunt transferate în Camera de extracție ADN a probelor din cadrul Compartimentului de Genetică Medico-Legală, unde responsabilul principal de caz, care a efectuat și supervizat prelevarea de probe, are obligația să efectueze procedurile de conservare a probelor: probele de sânge sunt depozitate în frigiderul de probe, la o temperatură de 4 °C (pentru cazurile speciale, când se dorește conservarea celei de-a doua probe, la o temperatură de – 20 °C); tampoanele bucale sunt conservate prin uscarea într-o incintă specială, până a doua zi dimineața, la temperatura mediului ambiant, ferite de razele solare.

A doua zi, probele uscate sunt ambalate și depozitate în frigidere, la o temperatură de 4 °C, până la momentul prelucrării. Prelucrarea probelor se face de regulă împreună cu celelate probe judiciare (corpuri delictive).

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	7/17
		Exemplar:	

În momentul începerii prelucrării probelor, responsabilul principal de caz înregistrează probele în „Registrul de lucru ADN Biocriminalistică ” cod POI-A15 Identificare R2, unde primește un indicativ propriu.

După înregistrare, se trece la efectuarea analizelor care presupune parcurgerea următoarelor etape:

- Prelucrare preliminară probe: inspecție, fotografiere, prelevare de eșantioane de probă, tratamente termice și chimice de conservare a probelor (uscare, imersie în soluții de prezervare, etc.), examene de laborator complementare (examen microscopic, serologic, etc.)
- cuantificare
- Extracție ADN
- Amplificare PCR
- Detecția și identificarea produșilor de reacție în analizatorul genetic automat
- Interpretarea și Prelucrarea statistică a rezultatelor

Pe măsură ce sunt efectuate etapele expertizei se înregistrează rezultatele în „Registrul de lucru ADN Biocriminalistică” cod POI-A15 Identificare R2, iar la final, pe baza corelării rezultatelor obținute, se întocmește „Fișa de genotipare” cod POI-A15 Identificare F2.

După finalizarea analizelor, rezultatele înregistrate servesc la întocmirea „Raportului de expertiză medico-legală – Examen ADN” cod POI-A15 Identificare F3.

Raportul este redactat și dactilografiat electronic în ciornă de responsabilul principal de caz.

Rezultatele investigațiilor sunt prezentate apoi și celorlalți membri ai comisiei de expertiză, care formulează concluziile.

După formularea concluziilor, responsabilul principal de caz elaborează forma finală a raportului, care este apoi verificată și semnată de toți membrii comisiei de expertiză.

Comisia de expertiză care semnează Rapoartele de expertiză medico-legală – Examen ADN este desemnată prin decizie de conducerea IML IAȘI. Comisia de expertiză este alcătuită dintr-un medic legist, care este președintele comisiei, și 2 specialiști având specialitatea în medicină de laborator, genetică medicală, biochimie, biologie, cu competențe în genetică moleculară, printre care se numără în mod obligatoriu responsabilul principal de caz.

Rapoartele se redactează de regulă în două exemplare, iar la cererea clientului se eliberează și al treilea exemplar.

Rapoartele sunt înregistrate în „Registrul de evidență intrări-ieșiri ADN Biocriminalistică” cod POI – A15 Identificare R1, fiind apoi expediate solicitantului prin Secretariatul General al IML Iași, prin poștă cu confirmare

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	8/17
		Exemplar:	

de primire (pentru persoane juridice), numai după ce s-a făcut confirmarea plății de către Serviciul Contabilitate pentru serviciile prestate.

Eșantioanele de probe biologice care nu au fost supuse testării se păstrează în spații special amenajate, conform prevederilor procedurii operaționale „Păstrarea produsului” cod POQ-09. De asemenea, se arhivează și extractele de ADN prin congelare conform prevederilor procedurii operaționale „Păstrarea produsului” cod POQ-09, în spații special amenajate, în cutii etichetate (cu etichete purtând înscrisul „de la indicativ nr. până la”). Restul produșilor de reacție din celelalte etape de laborator nu se conservă.

6 Responsabilități

Director:

- repartizează rezolvarea solicitărilor
- semnează adresele de însoțire a rezultatelor

Șef compartiment:

- organizează, îndrumă și controlează buna desfășurare a activității laboratorului;
- analizează solicitările primite și dispune rezolvarea acestora;
- repartizează către personalul din subordine rezolvarea solicitărilor primite;
- asigură aplicarea cerințelor sistemului de management al calității;
- asigură condiții optime de desfășurare a activității;
- asigură desfășurarea proceselor numai cu personal calificat;
- asigură păstrarea înregistrărilor emise;
- asigură și verifică desfășurarea proceselor cu echipamente verificate și calificate;

Asistent medical:

- ține evidența solicitărilor și expedierilor
- ține evidența probelor
- asigură interfața cu clientul
- înregistrează probele în Registrul de probe
- asigură conservarea acestora până la intrarea lor în lucru

Responsabil principal de caz:

- efectuează analiza probelor
- face înregistrările etapelor de lucru în „Registrul de lucru ADN Biocriminalistică” cod POI-A15 Identificare R2
- prezintă rezultatele testărilor genetice comisiei de expertiză desemnate la caz
- formulează concluziile împreună cu ceilalți experți din comisia de expertiză desemnați la caz
- redactează și dactilografiază raportul de expertiză

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	9/17
		Exemplar:	

- verifică și semnează raportul de expertiză

Comisia de expertiză

- formulează concluziile raportului de expertiză
- verifică și semnează raportul de expertiză

7 Înregistrări. Formulare

- 7.1 Registrul de evidență intrări-ieșiri ADN Biocriminalistică cod POI – A15 Identificare R1
- 7.2 Registrul de lucru ADN Biocriminalistică cod POI-A15 Identificare R2
- 7.3 Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN cod POI-A15 Identificare F1
- 7.4 Fișa de genotipare cod POI-A15 Identificare F2
- 7.5 Raportul de expertiză medico-legală – Examen ADN cod POI- A15 Identificare F3

8 Anexe

- 8.1 Anexa 1 - Registrul de evidență intrări-ieșiri ADN Biocriminalistică cod POI – A15 Identificare R1
- 8.2 Anexa 2 - Registrul de lucru ADN Biocriminalistică cod POI-A15 Identificare R2
- 8.3 Anexa 3 - Procesul verbal de prelevare probe biologice - ADN cod POI-A15 Identificare F1
- 8.4 Anexa 4 - Fișa de genotipare cod POI-A15 Identificare F2
- 8.5 Anexa 5 - Raportul de expertiză medico-legală – Examen ADN cod POI-A15 Identificare F3

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	10/17
		Exemplar:	

Anexa 1

cod POI- A15IdentificareR1 ed. 1, rev 0

REGISTRUL DE EVIDENȚĂ INTRĂRI-EXPEDIERI ADN BIOCRIMINALISTICĂ

Nr. Crt (J_)	Indicativ nr. (IML Iași)	Data intrării	Solicitant/Instanță Cerere	Dosar	Nume prenume persoane investigate	Probe primite	Indicativ probă
1	2	3	4	5	6	7	8

Neconcordanțe identificate la preluarea probelor	Semnătura de predare probe	Responsabil de caz	Data predării raportului la Secretariatul general IML Iași	Obs
9	10	11	12	13

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	11/17
		Exemplar:	

Anexa 2

cod POI- A15Identificare R2 ed. 1, rev 0

REGISTRUL DE LUCRU ADN BIOCRIMINALISTICĂ

Nr	Proba (tipul probei/apartenenta)	Indicativ de lucru in laborator	Pretestare (denumire metodă/MO/data/ NP analist)	Extractie (metoda/data/NP analist)	Cuantificare ADN (protocol/kit/ data/NP analist)	PCR (denumire kit/dilutie/proto col amplificare/da ta/NP analist)	Secvențiere (denumire kit/diluție/prot ocol amplificare/d ata/NP analist)	Obs
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	12/17
		Exemplar:	

Anexa 3

cod POI - A15 Identificare F1 ed. 1, rev 0

PROCES VERBAL DE PRELEVARE PROBE BIOLOGICE

Nr. caz

Încheiat astăzi cu ocazia prelevării de probe biologice necesare efectuării expertizei ADN solicitată de, prin adresa înregistrată la IML Iași cu nr..... Probele biologice sunt prelevate de la următoarele persoane:

Nume /Prenume Semnătura	CNP	Calitatea	Proba biologică prelevată		Indicativul probei prelevate
			Salivă* (nr. esantioane prelevate)	Sânge** (nr. esantioane prelevate)	

*Eșantionul de salivă a fost prelevat de pe fața internă a mucoasei obrazului pe suport de tampon de vată steril

**Eșantionul de sânge a fost prelevat prin puncție intravenoasă în vacutainer steril având suport anticoagulant de EDTA

Persoanele mai sus menționate declară că au fost informate asupra obiectivului acestei expertize medico-legale și sunt de acord cu prelevarea de probe biologice.

Prelevarea probelor biologice a fost efectuată de :
(nume, prenume, semnătura)

Au asistat la prelevare:

1.
(nume, prenume, semnătura)
2.
(nume, prenume, semnătura)
3.
(nume, prenume, semnătura)

Prelevarea a fost efectuată la ora

Expertize, examinări, constatări, examene de laborator și alte lucrări medico-legale asupra persoanelor în viață, cadavrelor, produselor biologice și corpurilor delictate, precum și efectuarea de expertize medico-legale psihiatrice și de cercetare a filiației

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	13/17
		Exemplar:	

Anexa 4

cod POI-A15 Identificare F2 ed.1, rev.0

FIȘA DE GENOTIPARE NR. CAZ _____

locus	Inc - inculpat	Susp - suspect	Vict - victima	IP
D8S1179				
D21S11				
D7S820				
CSF1PO				
D3S1358				
TH01				
D13S317				
D16S539				
D2S1338				
D19S433				
vWA				
TPOX				
D18S51				
D5S818				
FGA				
AMEL				

IPC = _____

PP = _____ %

Întocmit de:

Data:

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	14/17
		Exemplar:	

Anexa 5



**MINISTERUL SĂNĂȚĂII PUBLICE
INSTITUTUL DE MEDICINĂ LEGALĂ IAȘI
Str. Buna Vestire, nr. 4, Iași
Tel. 0232/267751, Fax. 0232/261617
Nr. din**

Către,

.....

La adresa dvs. privind dosarul nr. _____ va înaintăm Raportul de Expertiza Medico-Legală – Examen ADN solicitat, având la baza probele judiciare înaintate.

Taxa de expertiza în valoare de _____ a fost achitată de _____.

Totodată va restituim probele care au făcut obiectul investigației științifice (*se menționează numai unde este cazul de restituire a probelor*).

DIRECTOR IML IAȘI

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	15/17
		Exemplar:	

cod POI - A15 Identificare F3 ed. 1, rev 0

RAPORT DE EXPERTIZA MEDICO-LEGALA - EXAMEN ADN –

NR...../.....

Subsemnații (N/P, titlu, calitatea) _____, _____ si _____, in baza adresei dvs. privind dosarul nr. _____, am efectuat in cadrul Compartimentului de Genetica al IML IAȘI, examenul ADN solicitat in baza probelor inaintate, constatand urmatoarele:

Istoric: Din adresa _____ privind dosarul nr. _____ reiese ca

Obiectivele expertizei: _____

Descrierea probelor primite pentru analiza:

Conform adresei Instanta privind dosarul nr. _____ au fost puse la dispozitia Compartimentului de Genetica al IML IAȘI urmatoarele probe (vezi fotografiile din **ANEXA 1**):

- colet (caracteristici, incrisuri, nr., sigilii, etc) _____
- _____

In cadrul Compartimentului de Genetica al IML IAȘI, in data de _____ au fost prelevate urmatoarele probe biologice:

Nr crt	Nume prenume	Calitatea	Esantion		Indicativ proba la recoltare (in scris pe eticheta)
			Saliva* (nr)	Sange** (nr)	
1					
2					

* proba de saliva este recoltata de pe fata interna a obrazului pe suport de vata de bumbac steril, in tub inchis,

** proba de sange integral, cca 2 ml este recoltata prin punctie venoasa, in vacutainer steril, pe suport de EDTA

Metoda de analiza:

Pentru necesitatile analizei genetice au fost prelevate urmatoarele probe :

1. un esantion _____ – proba notata (indicativ de lucru al probei in laborator) _____;
2. un esantion _____ – proba notata (indicativ de lucru al probei in laborator) _____;
3. un esantion _____ – proba notata (indicativ de lucru al probei in laborator) _____;

Restul probelor biologice care nu au fost supuse analizei au fost conservate in laborator conform recomandarilor metodologice privitoare la conservarea probelor biologice in vederea examenului ADN.

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	16/17
		Exemplar:	

1. Pretestare esantioane prelevate:

Urmatoarele esantioane prelevate din probe au fost pretestate prin metode serologice de identificare a microurmelor de _____(sange, saliva, sperma) de natura umana:

Nr crt	Esantion	Indicativ proba	Kit pretestare			Rezultat pretestare [prezent (+)/ absent (-)]
			sange	sperma	saliva	
1						
2						

2. Extractia ADN:

În vederea analizei genetice s-a procedat la extracția materialului genetic, utilizând kitul

3 Cuantificarea ADN extras **Cuantificarea ADN:** ADN extras a fost cuantificat și evaluat din punct de vedere al purității prin metodă spectrofotometrică (utilizând aparatul Nanophotometer™ Pearl, IMPLEN®) și/sau prin metoda real-time PCR, folosind kitul, conform instrucțiunilor de lucru.

4. Analiza amplificării genice:

ADN a fost amplificat pe .. loci reprezentând .. markeri STR, folosind kitul, conform instrucțiunilor de lucru, utilizând termociclorul .. Printr-o singură metodă sunt analizați .. loci STR autozomali (enumerare) și markerul de determinare a sexului, Amelogenina, totul într-o singură reacție PCR.

ADN a fost amplificat pe 16 loci reprezentând 16 markeri STR, folosind kitul AmpFISTR® Identifier® Plus PCR Amplification Kit, Applied Biosystems™, conform instrucțiunilor de lucru, utilizând termociclorul GeneAmp® 9700, Applied Biosystems™. Prin această metodă sunt analizați 15 loci STR autozomali (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, și FGA) și markerul de determinare a sexului, Amelogenina, totul într-o singură reacție PCR.

5. Electroforeza capilară : produșii amplificați au fost migrați prin electroforeză capilară în aparatul 3500 HID Genetic Analyzer, Applied Biosystems™, folosind consumabile și reactivi conform instrucțiunilor de lucru. Datele de fluorescență au fost preluate de softul 3500 Data Collection Software, Applied Biosystems™.

6. Analiza și interpretarea datelor : datele au fost exportate și interpretate cu ajutorul softului GeneMapper® ID-X, Applied Biosystems™ și .. Calculele

Institutul de Medicină Legală Iași	PROCEDURĂ OPERAȚIONALĂ	Cod:	POI-A15 Identificare
	EXPERTIZA ADN IDENTIFICARE	Editia:	2
		Revizia:	0
		Pag.	17/17
		Exemplar:	

probabilistice au fost efectuate respectând recomandările Societății Internaționale de Genetică în Medicina Legală. Frecvența genotipului în populație arată care este posibilitatea ca o altă persoană, aleasă în mod aleator din aceeași populație și neînrudită cu persoana în cauză, să aibă același genotip.

REZULTATE:

Genotipurile cazurilor analizate sunt indicate în Anexă.

Proba cu indicativul...tipul de profil obtinut...calculul statistic (daca este cazul)

CONCLUZII:

Analiza genetică a probelor puse la dispoziția Laboratorului a evidențiat următoarele:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

COMISIA DE EXPERTIZĂ

(Numele, prenumele și semnăturile membrilor comisiei)

Medic primar legist,

Biolog,

Biochimist,

.....

.....

.....

Prezentul raport este redactat pe pagini de către responsabil caz,