مجله دانش و تندرستی، دوره ۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v9i1.346

مقاله پژوهشی

بررسی میزان اعتبار مارکرهای خونی در تشخیص هویت انسان با انگشت‌نگاری DNA

مرتضی صادقی*[۱]، علیرضا صبوری[۲]

۱- دانشگاه اصفهان- دانشکده علوم- گروه زیست‌شناسی- دانشجوی دکترا.

۲- پزشکی قانونی اصفهان- دکترای علوم آزمایشگاهی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۲۶، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۱/۲۱

چکیده

مقدمه: *تعیین گروه‌های خونی اولین مرحله در تأیید یا رد کردن رابطه قرابت (خویشاوندی) بین دو فرد در تشخیص هویت است. در این مطالعه هدف، اعتبارسنجی سیستم‌های گروه‌های خونی رایج، در تشخیص هویت افراد با روش انگشت‌نگاری DNA است.*

مواد و روش‌ها: *در این مطالعه از ۳۰۰ فرد متعلق به ۱۵۰ خانواده خون گرفته شد. DNA هر فرد استخراج و انگشت‌نگاری DNA برای ده منطقه STR توسط دستگاه ABI انجام شد. هفت سیستم گروه خونی شامل: ABH، RH، MNSs، Kell، Kidd، Lutheran و P1 به روش اگلوتیناسیون برای هر یک از افراد مشخص شد و یافته‌ها با نتایج تعیین توالی دستگاه ABI مقایسه شد.*

نتایج: *از ۳۰۰ مورد بررسی در ۲۵۶ مورد هیچ‌گونه اختلافی بین نتایج سیستم‌های خونی و انگشت‌نگاری DNA وجود نداشت، در ۴۴ مورد رابطه قرابت ازطریق DNA Typing اثبات گردید ولی ناسازگاری آنتی‌ژنیک در آنتی‌ژن‌های RH و MNS و ABH مشاهده گردید، از بین سیستم‌های گروه خونی، سیستم‌های RH، MNSs و ABH به‌ترتیب با میزان خطایی برابر ۳۰/۷٪، P=۰/۰۰۱، ۲۰/۵۴٪ P=۰/۰۴ و ۱۷/۶٪ P=۰/۰۰۵ ضعیف‌ترین سیستم‌ها برای تشخیص هویت شناخته شدند.*

نتیجه‌گیری: *از بین سیستم‌های گروه خونی مارکرهای RH، MNSs و ABH به‌ترتیب پرخطاترین مارکرها برای بررسی رابطه قرابت هستند و در استناد به نتایج آنها باید حتماً از انگشت‌نگاری DNA به‌عنوان یک آزمون تأییدکننده استفاده نمود.*

واژه‌های کلیدی: گروه‌های خونی، تشخیص قرابت‌خوانی، انگشت‌نگاری DNA.

***نویسنده مسئول:** اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم-۲، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک، **تلفن:** ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۶۵ **Email:** ms.sadeghi@yahoo.com

ارجاع: صادقی مرتضی، صبوری علیرضا. بررسی میزان اعتبار مارکرهای خونی در تشخیص هویت انسان با انگشت‌نگاری DNA. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۳؛۹(۱):۴۳-۴۷.

مقدمه

تعیین گروه‌های اصلی و فرعی خونی افراد ازجمله اولین روش‌هایی است که برای تشخیص هویت در پزشکی قانونی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اساس این روش استفاده از آنتی‌ژن‌های موجود برروی گلبول‌های قرمز هر فرد است و باتوجه با اینکه این آنتی‌ژن‌ها نیز مانند بسیاری از صفات دیگر انسانی هر کدام توسط ژن‌هایی بیان می‌شوند که از قوانین توارث مندلی پیروی می‌کنند، نمونه‌های مناسب و راحتی برای بررسی‌های جنائی و تشخیص هویت هستند. این آنتی‌ژن‌ها از جنس گلیکو پروتئینی بوده و به راحتی توسط آنتی‌سرم‌هایی که علیه اپی‌توپ‌های خاصی از آنها ساخته‌شده‌اند قابل‌شناسایی می‌باشند. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع آنتی‌ژن برروی گلبول‌های قرمز کشف و نامگذاری گردیده‌اند که بر حسب اهمیت آنها در واکنش‌های انتقال خون به آنتی‌ژن‌های اصلی و فرعی تقسیم‌بندی شده‌اند (۱-۲). اساس استفاده از آنتی‌ژن‌ها در بررسی‌های تشخیص هویت افراد بر این نکته استوار است که آنتی‌ژن‌های عرضه شده روی گلبول‌های قرمز، حاصل بیان یک ژن منفرد غالب یا مغلوبی است که توسط قوانین ژنتیک به ارث می‌رسد و از این رو فرزند دارای آنتی‌ژن‌هایی برروی گلبول‌های قرمز خود است که پدر و مادر هر دو دارای آنها هستند (۳). تنها موارد استثنا در این بررسی‌ها مربوط‌به حالتی است که ژن‌های فرد دارای مناطق پلی‌مورفیسم یا جهش‌های عدم‌بیان ژن‌های مربوط به آنتی‌ژن‌ها باشند که در این موارد بررسی قرابت ازطریق آنتی‌ژن‌ها با خطا مواجه می‌شود (۶) لذا با توجه به حساسیت و اهمیت نتیجه تعیین قرابت در بررسی‌های تشخیص هویت، نتایج حاصل از بررسی آنتی‌ژن‌ها معمولاً توسط انکشت‌نگاری DNA به‌عنوان یک آزمون تکمیلی نیز سنجیده می‌شوند تا از خطاهای احتمالی استفاده از آنتی‌ژن‌ها کاسته شود. از آنجایی‌که در آزمایشگاه‌هایی که مجهز به دستگاه‌های ژنتیک مولکولی نیستند هنوز از آنتی‌ژن‌ها برای تعیین قرابت افراد استفاده می‌شود و فراوانی آنتی‌ژن‌های مذکور هم در جامعه زیاد می‌باشد. در این مطالعه، هدف بررسی و مقایسه نتایج حاصل از انکشت‌نگاری DNA و آنتی‌ژن‌ها در تشخیص هویت و مشخص‌کردن درجه اعتبار هر یک از آنتی‌ژن‌های مورد استفاده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که از نوع ارزیابی آزمون‌های تحلیلی مقطعی است از ۳۰۰ فرد مربوط به ۱۵۰ پرونده مراجعه‌کننده به پزشکی قانونی اصفهان طی سال‌های ۱۳۸۶ تا سال ۱۳۸۹ نمونه‌گیری به‌عمل آمد. از هر نفر ۲ میلی‌لیتر خون روی ماده ضد انعقاد سیترات سدیم برای انجام آزمایشات گروه‌های اصلی و فرعی و ۵ میلی‌لیتر خون روی ماده ضد انعقاد EDTA برای آزمایشات DNA Typing دریافت شد. نمونه‌های مربوط‌به گروه‌های خونی اصلی و فرعی همان روز مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌های مربوط‌به DNA Typing تا زمان آزمایش در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

تعیین گروه‌های اصلی و فرعی:

خون سیتراته هر فرد را سه بار با سرم فیزیولوژی ایزوتونیک شستشو داده و از آن سوسپانسیون ۵٪ گلبولی تهیه شد. برای هر فرد تعداد ۲۴ لوله را علامت‌گذاری نموده و در هر کدام یک قطره آنتی‌سرم مربوطه و یک قطره از سوسپانسیون گلبولی افزوده شد. لوله‌های A، A1، B، AB، D، E، e، C، c، M، N، S، P1 را بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در $37^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه در 1000 r.p.m سانتریفیوژ نموده و سپس از نظر وجود اگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز بررسی شدند (۴). برای بررسی آنتی‌ژن‌هایCoombs reactive لوله‌های موردنظر را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ انکو به نموده و سپس سه بار آنها را با سرم فیزیولوژی شسته و در پایان به ته نشین گلبولی دو قطره سرم آنتی‌گلبولین انسانی اضافه و ۲۰ ثانیه آنها را در دور 3000 r.p.m سانتریفیوژ نموده و وجود اگلوتیناسیون در آنها بررسی شد (۴).

انگشت‌نگاری DNA(DNA fingerprinting) :

برای استخراج DNA نمونه‌های خون مورد مطالعه از روش Boiling استفاده شد (۵). غلظت کمی DNA حاصل به‌وسیله اسپکتروفتومتر تعیین شد. ده منطقه کوتاه تکرار شونده مولکولی (STRs) از مارکرهای تعیین هویت به اسامی (CD4، FES، D13S317، F13، vWA، THO1، LPL، POX، D5S818، D16S539) با دستگاه ABI (genetic analyser) 3230. آنالیز و تعیین توالی شدند (شکل ۱).

تجزیه‌وتحلیل آماری:

از قانون هاردی- واینبرگ برای محاسبه فراوانی ژنی سیستم RH و دیگر سیستم‌های گروه خونی استفاده شد. فراوانی ژنی هر یک از ژن‌های A، B، O سیستم ABH با استفاده از فرمول F. Bernstein محاسبه گردید. همچنین فرمول A.S. Wiener برای محاسبه احتمال ردکنندگی هر یک از سیستم‌های گروه خونی اصلی و فرعی به کار برده شد (۷ و ۸).

نتایج

از بین سیستم‌های گروه خونی اصلی و فرعی، سیستم‌های RH، MNSs و ABH به‌ترتیب بیشترین میزان احتمال خطا را داشتند، ۳۰/۷٪، ۲۰/۵۴٪ و ۱۷/۶٪ و احتمال ردکردن سیستم‌های Kell، Kidd، Lutheran و P1 به‌ترتیب ۵/۶۴٪، ۷/۷۷٪ ۳/۴۷ و ۴/۵ بود (جدول ۱). نتایج آزمون‌های گروه‌های اصلی و فرعی و DNA Typing برای ۱۵۰ مورد پرونده تعیین قرابت در جدول ۲ مقایسه شده است. در

۱۱۸ مورد هیچ‌گونه ناسازگاری بین نتایج DNA typing ژنی و بررسی‌های آنتی‌ژنیک مشاهده نشد که نتایج هر دو مورد تأییدکننده یکدیگر بود، در۳۲ مورد بین یافته‌ها ناسازگاری‌های ژنی و آنتی‌ژنیک مشاهده گردید که از ۳۲ مورد در ۲۲ مورد رابطه قرابت در DNA Typing اثبات گردید ولی ناسازگاری آنتی‌ژنیک در سه آنتی‌ژن RH و MNS و ABH مشاهده گردید.

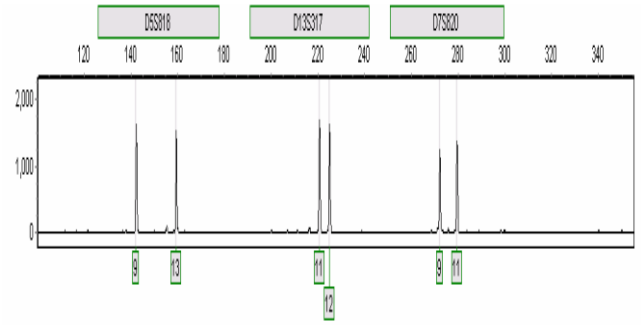
جدول ۱- احتمال ردکنندگی قرابت به‌وسیله سیستم‌های مختلف گروه‌های خونی اصلی و فرعی

سیستم خونی	احتمال ردکنندگی
ABH	۱۷/۶
RH	۳۰/۷
MNSs	۲۰/۵۴
Kell	۵/۶۴
Kidd	۷/۷۷
Lutheran	۳/۴۷
P1	۴/۵

بحث

هدف از مطالعه حاضر بررسی کارایی و اعتبار آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی اصلی و فرعی در تشخیص هویت و معرفی کارایی سیستم‌های فوق در مقایسه با آزمایش DNA Typing می‌باشد. در گذشته محققین ابتدا از سیستم گروه خونی ABH و سپس از سایر سیستم‌های گروه‌های خونی و HLA Typing جهت مشخص کردن قرابت استفاده می‌کردند (۹). کار با این سیستم‌ها با مشکلات و خطاهای زیادی همراه است؛ ازجمله اینکه آنتی‌سرم‌های عرضه شده غالباً به‌صورت منوکلونال تهیه می‌شوند و قدرت واکنش آنها با آنتی‌ژن‌های خونی افراد مختلف متفاوت بوده و در مواردی می‌تواند به نتایج منفی کاذب منتهی گردد؛ از این‌رو به کرات دیده می‌شود که پاسخ آنتی‌ژن D فردی از یک آزمایشگاه تا آزمایشگاه دیگر تفاوت دارد (۱۵) از طرفی در برخی سرطان‌ها، به‌دنبال شیمی درمانی یا سپتی سمی احتمال تغییر گروه‌های خونی ABH وجود دارد (۱۷-۱۸). آنتی‌ژن P1 در بدو تولد ممکن است روی همه گلبول‌های قرمز به شکل یکنواخت بیان نشود بنابراین واکنش‌های ضعیف آن ممکن است به‌صورت منفی قلمداد و منجر به تفسیر اشتباه گردد؛ زیرا بیان کامل آنتی‌ژن فوق روی گلبول‌های قرمز تا ۷ سال طول می‌کشد (۳ و ۱۶).

در دهه‌های اخیر با پیدایش تکنیک RFLP و سپس DNA Typing به‌روش PCR با استفاده از مارکرهای کوتاه تکرارشونده (STRs) در اکثر دادگاه‌های کشورهای پیشرفته تنها نتایج آزمایشات DNA Typing ملاک قبول رد یا اثبات قرار می‌گیرد (۱۰ و ۱۱). فراوانی آماری به‌دست آمده از آنتی‌ژن‌های گروه‌های اصلی و فرعی خونی این مطالعه با مطالعات انجام شده توسط ویتاکر و همکاران



شکل ۱- نتایج تعیین توالی ۳ مارکر STR(D5, D13, D7) توسط دستگاه ABI

برروی جمعیت ایتالیا مطابقت داشت (۱). احتمال ردکنندگی هریک از سیستم گروه‌های اصلی و فرعی در جمعیت سفید پوست و سیاه پوست آمریکا به‌صورت مجزا در مطالعه‌ای توسط Neville محاسبه و گزارش گردیده است که با یافته‌های این مطالعه همراستا است (۳). در این مطالعه میانگین احتمال ردکنندگی برای کلیه سیستم‌های گروه خونی برابر ۱۲/۸۸ درصد بود که البته باید نرخ موتاسیون و احتمال خطاهای آزمایشگاهی را نیز در تفسیر نتایج مدنظر قرار داد. بنابراین مشاهده یک آنتی‌ژن ناسازگار و حتی وجود دو آنتی‌ژن ناسازگار (به ویژه در گروه‌های فرعی و آنتی‌ژن‌های وابسته به کومبس) را نباید دلیل قاطعی برای رابطه قرابت قلمداد نمود. از این رو براساس قرارداد کلی در مطالعات ما معیار قطعی در رد رابطه قرابت، وجود ناسازگاری در دو آنتی‌ژن اصلی، وجود ناسازگاری در یک آنتی‌ژن اصلی و دو آنتی‌ژن فرعی و یا وجود ناسازگاری در سه آنتی‌ژن فرعی قرار گرفت (۳). طبق یافته‌های این مطالعه هنگام استفاده از آنتی‌ژن‌های خونی، زمانی که معیارهای صحیح ردکنندگی رعایت گردد در ۸۶/۵٪ موارد می توان جهت رد رابطه قرابت اظهار نظر قطعی نمود. از ۳۲ مورد که بین نتایج دو آزمون اختلاف وجود داشت، بعد از تکرار آزمایش در ۲۲ مورد (۱۳/۵٪) آزمایش‌های DNA Typing قرابت را اثبات می‌نمود که در آنها ناسازگاری آنتی‌ژنیک در یکی از آنتی‌ژن‌های وابسته به کومبس مشاهده گردید. بنابراین در حالت استاندارد هم تشخیص هویت ازطریق سیستم‌های خونی بدون استفاده از آزمون DNA typing با خطای زیادی همراه است.

به‌طور خلاصه طبق یافته‌های این مطالعه ۸۶/۵٪ نتایج حاصل از آنتی‌ژن‌های خونی برای تعیین قرابت در تشخیص هویت معتبر است و از بین این مارکرها RH، MNSs و ABH به‌ترتیب ضعیف‌ترین و پرخطاترین مارکرها برای بررسی‌های تشخیص هویت هستند و در استناد به نتایج آنها، استفاده از انکشت‌نگاری DNA به‌عنوان یک آزمون تکمیلی ضرورت دارد.

References

1. Whitaker JP, Clayton TM, Urquhart AJ, Millican ES, Downes TJ, Kimpton CP, et al. Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. Biotechniques 1995;18:670-7.
2. Budimlija ZM, Prinz MK, Zelson-Mundorff A, Wiersema J, Bartelink E, MacKinnon G, et al. World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. Croat Med J 2003;44:259-63.
3. Bryant Neville. Disputed paternity, New York: Bian C;1980.
4. Vengelen– Tyler V. Technical manual. 12th ed. Ehesda: AABB; 1996.
5. Butler John M. Forensic DNA typing. New York: Academic Press. 2001;28-30.
6. Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm JW. General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat Loci. Biotechniques 1996;20(2):266-76.
7. Kalmes R, Huret JL. Hardy-wienberg model. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2001.
8. Wiener AS, Wexler IB. Heredity of the blood groups. New York: Grune & Stratton Press; 1958, 16-18.
9. Tong GTF, Pang TC. The frequency of the ABO blood groups amongst the chinese population in Hong Kong. The bulletin of the Hong Kong Chinese medical association; 1965.
10. Gill P, Jeffreys Aj, Werett Dj. Forensic application of DNA fingerprints. Nature 1985;318:577-579.
11. Cerda-Flores RM, Barton SA, Marty Gozzalez Lf, Rivas F, Chkraborty R. Estimation of non paternity in the Mexican Population of Nuevo Leon: a validation Study with blood group markers. Am J phys Anthropol 1999;109:281-293.
12. FaRHud DD, Eftekhari A. Blood Groups distribution in Iran. Iranian J Publ Health 1994;23:1-4.
13. Guy LR, Husestis DW, Wilson LR. Technical methods and Procedures. 4th ed. Chicago: American Association of Blood banks;1966.
14. Issitt PD, Anstee DJ. Applied blood group serology. 4th ed. DuRHam: Montgomery Scientific Publications; 1998.
15. Lomas Francis C. The potential of monoclonal antibodies to RH,MNS, and other blood group antigens. Arlington: AABB; 1997.
16. Harmening DM. Modern blood banking and transfusion. 4th ed. Philadelphia: FA Davis; 1999.
17. Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. Biotechniques 2007;42:343-52.
18. Huffine E, Crews J, Kennedy B, Bomberger K, Zinbo A. Mass identification of persons missing from the break-up of the former Yugoslavia: structure, function, and role of the International Commission on Missing Persons. Croat Med J 2001;42:271-5.

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 9, No 1
Shahroud University of Medical Sciences

DOI:10.22100/jkh.v9i1.346
Original Article

Investigation of the Reliability of the Blood Markers in Human Identity Recognition by DNA Finger Printing

Morteza Sadeghi (M.Sc.)[1*], Alireza Sabouri (Ph.D.)[2]
1- Dept .of Biology, School of Basic Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran.
2- legal Medicine Center, Isfahan, Iran.

Received: 17 October 2012, **Accepted:** 10 April 2013

Abstract:

Introduction: *Determination of blood groups is the first step in the approval or rejection of blood relation between the two individuals for identity recognition. The aim of this study is to investigate the reliability of common blood grouping systems in DNA finger printing recognition.*
Methods: *In this study, blood samples were obtained from 300 individuals belonging to 150 families. Then, DNA of each individual was purified and DNA finger printing was performed for 10 STR regions using ABI set. Seven human blood group systems including ABH, RH, Kidd, Kell, Mns, Lutheran and p1 were determined with agglutination methods, and the results were compared with DNA* sequencing *results of the ABI sequencing machine.*
Results: *300 randomly selected individuals were studied, in 256 cases. There was no difference between the blood grouping and DNA typing results; in 44 cases, the blood relation was approved by DNA typing but antigenic discord was observed in RH, MNS and ABH antigens. Among the blood grouping systems, RH, MNS and ABH,with the error scale of 30.7% (P=0.001), 20.54% (0.04) and 17.6% (P=0.005) respectively, were found to be the weakest systems for human identity recognition.*
Conclusion: *Among the blood grouping systems, RH, MNS and ABH are the weakest markers for blood relation identification, and DNA finger printing must be used as a supplementary test to confirm their results.*

Keywords: Blood groups, Blood relation identification, DNA finger printing recognition.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** M. Sadeghi, **Email:** ms.sadeghi@yahoo.com, m.sadeghi@sci.ui.ac.ir*

Citation: Sadeghi M, Sabouri A. Investigation of the reliability of the blood markers in human identity recognition by DNA finger printing. Journal of Knowledge & Health 2014;9(1):43-47.