

Universitatea „Babe -Bolyai” Cluj-Napoca

coala Doctoral

Facultatea de Biologie i Geologie

Direc ia de cercetare: Genetic

**FRECVEN A ALELIC A LOCILOR
STR (*SHORT TANDEM REPEATS*)
LA UNELE POPULA II DIN TRANSILVANIA**

**TEZ DE DOCTORAT
-REZUMAT-**

Doctorand:

József-Szabolcs DEMETER

Coordonator tiin ific:

Prof. Dr. Octavian POPESCU

Cluj-Napoca, 2010

Cuprins

Abstract	2
Cuvinte cheie	3
Mul umiri	4
Rezumatul Tezei de Doctorat	5
Partea I: Trecerea în revist a literaturii științifice legate de markerii STR	5
I.1 Introducere.....	6
I.2 Polimorfismul AND, Genetica și Genomica Markerilor STR	7
Repetițiile scurte în tandem (STR).....	8
I.3 Loci STR folosiți în identificare uman	9
I.4 Baza de date web a markerilor STR din ADN (STRBase)	10
I.5 Sistemul indexului combinat ADN (CODIS).....	10
I.6 Baza de date a Incidentelor Fatale (Mass Fatality Incident Databases).....	10
I.7 Utilizarea markerilor STR	10
I.8 Studii populare genetice umane efectuate în România prin utilizarea setului de loci STR CODIS.....	10
I.9 Ultimele reglementări legislative aduse tehnologiei de amprentare ADN.....	11
Partea a II-a: Metodele și tehnicile amprentării ADN-ului prin intermediul markerilor STR	12
II.1 Extracția ADN-ului genomic.....	13
II.3 Marcarea fluorescentă a fragmentelor ADN	14
II.4 Genotiparea probelor	14
II.5 Prelucrarea și interpretarea statistică a datelor.....	14
Partea a III-a: Contribuțiile Personale și Rezultatele Studiului	15
III.1 Informații despre probe și populație.....	16
III.2 Cuantificarea ADN-ului.....	17
III.3 Desemnarea alelelor	19
III.4 Date statistice de interes juridic	21
III.5 Parametrii genetici cu aplicabilitate în paternitate	22
III.6 Date statistice populare	22
Testul exact pentru Echilibrul Hardy-Weinberg (HWE).....	24
Frecvența alelică a celor două populații incluse în acest studiu.....	24
III.7 Compararea statistică populare	26
III.8 Baza de date actualizată a Transilvaniei (TRS-6).....	27
Compararea biostatistică a celor două baze de date ale Transilvaniei	28
III.9 Baza de date STR a României.....	30
Compararea bazelor de date STR ale regiunilor istorice din România.	31
Partea a IV-a: Discuții	32
Partea a V-a: Concluzii	33
Bibliografie	34

Abstract

În 2010 marcăm 25 de ani de la publicarea primei lucrări științifice care relatează despre identificarea genetică a persoanelor umane prin amprentare ADN. De atunci, analiza ADN-ului a devenit un instrument important în diagnosticarea și terapia bolilor, în identificarea medico-legală, taxonomie, filogenie, și altele.

Scopul acestui studiu. Conform recensământului din 2002, în Transilvania există o comunitate etnică maghiară considerabilă (19,6%), mai ales în județele secuiești din Covasna și Harghita. În ultimul deceniu, au fost publicate parametrii genetici a două populații din județul Harghita (secuții și ceangii), dar nici un studiu populațional nu s-a efectuat pentru comunitatea secuilor din Covasna și pentru populația maghiară (non-secuiească) din Transilvania. Ca urmare, unul dintre obiectivele propuse de acest studiu a fost pe departe, determinarea parametrilor genetici pentru cele două comunități maghiare și compararea acestora cu alte populații din România, precum și dorința de a contribui cu date importante la bazele de date genetice ale Transilvaniei și României.

Metode. Prin utilizarea tehnicilor de amprentare ADN s-a creat profilul genetic al 424 de indivizi: 146 pentru Cluj și 278 pentru Covasna. Frecvențele alelice și parametrii genetici de interes judiciar au fost determinați prin intermediul aplicației Power Stats de la Promega. Deviațiile de la echilibrul Hardy-Weinberg și testele de comparare statistică au fost finalizate prin importul datelor obținute prin genotipare în Genepop și Arlequin.

Rezultate și Concluzii. Populațiile incluse în acest studiu pot fi utilizate și în studii de micro-diferențiere populațională. Testele comparative statistice nu au evidențiat diferențe semnificative între maghiarii non-secuici din județul Cluj (CJ-Hu) și secuții din județul Covasna (CV-Sze). Într-o comparație statistică care a inclus 10 din cei 15 loci, populațiile incluse în acest studiu nu au prezentat valori semnificative față de românii din București (B-RO). Cea mai mare distanță genetică a fost înregistrată pentru populația din Covasna într-o comparație cu baza de date a Valahiei. Testele comparabile statistice au definit locii D21S11, D13S317, D3S1358 și D5S818 ca fiind cei mai polimorfici markeri STR al celor patru regiuni istorice ale României.

Cuvinte cheie

15 loci STR autosomali; România; Baza de date actualizat a Transilvaniei; Moldova, Dobrogea, Muntenia, studii popula ionale; Covasna, Harghita, Cluj; AmpFI STR Identifiler;

Mul umiri

Doresc să adresez mul umirile cuvenite coordonatorului științific al acestui studiu, domnului Prof. Dr. Octavian Popescu pentru încrederea și consilierea continuă, necesare îndeplinirii cu succes a obiectivelor propuse.

A dori, de asemenea, să exprim recunoștința și mul umiri domnului Dr. György Bódis și domnului Dr. Zsombor Vajna pentru sprijinul acordat în obținerea consimțământului donatorilor și colectarea probelor biologice.

A dori, totodată, să le mulțumesc colegilor mei de la laborator, Dr. Katalin Ferencz Beatrix, Dr. Beatrice KELEMEN și Drd. Sergiu CHIRA pentru consultanță permanentă oferită pe parcursul întregului proces tehnologic, precum și Dr. Gyöngyi Székely, Dr. Simona Maria BEL, Dr. Endre JAKAB și Dr. Szilárd BÜCS pentru valoroasele sugestii profesionale.

Júlia GALACZI (profesor de limba engleză) și Beáta GOMBÁR (profesor de limba română) au revizuit stilistic această teză. Róbert BODNAR (bibliotecar al BCU) a asigurat accesul la bibliografia științifică. László KORÓDI (profesor de geografie) m-a ajutat la graficele hărții României. În sfârșit, le mulțumesc și lor.

Îmi exprim, de asemenea, recunoștința domnului Dr. László FODORPATAKI (coordonatorul științific al anilor de studenție) pentru cuvintele de motivare.

Nu în ultimul rând, a dori să menționez și generozitatea domnului András Farkas (IT manager al MOL România PP) pentru faptul că a făcut tot posibilul să termin această cercetare.

V MULŢUMESC!

Cluj-Napoca,
20 Septembrie 2010

Rezumatul Tezei de Doctorat

Partea I: Trecerea în revistă a literaturii științifice legate de markerii STR

I.1 Introducere

Impactul inovațiilor tehnologice științifice asupra vieții poate fi resimțit în multe feluri. Actele criminale, cazurile medico-legale, atacurile teroriste sau dezastrele de masă sunt doar câteva dintre situațiile nedorite, imprevizibile și inevitabile, dependente de identificarea umană, fapt ce necesită dezvoltarea continuă a tehnologiilor științelor genetice.

În 2010 marcăm aniversarea a mai multor evenimente:

- 1 an de când Consiliul European a prezentat noul Standard European cu privire la setul de loci STR, care conține în acest moment 12 markeri (noiembrie 2009)
- 5 ani de când cazurile de catastrofe în care omenirea a fost implicată au forțat Instituțiile științifice de Criminalistică (ENFSI) și Grupul European de Profilare ADN (EDNAP) să dezvolte și să valideze un nou sistem STR, care să permită identificarea persoanelor din probe de ADN degradat (Glasgow, 2005)
- 15 ani de la înființarea primei baze de date ADN (aprilie 1995), care a conținut markeri pentru locii TH01, VWA, FGA, D8S1179, D18S51, și D21S11
- se împlinesc 20 de ani de la dezvoltarea primilor markeri STR
- au trecut 25 de ani de la publicarea primei lucrări științifice, care se ocupă cu identificarea genetică a persoanelor umane prin amprentare ADN (Gill et al. 1985)

Analiza ADN-ului a devenit un instrument principal în recoltarea probelor biologice pentru persoanele implicate în cazuri legate de crime, mai ales datorită genomicii - știința materialului genetic - care are potențialul de a oferi instrumentele necesare atât diagnosticării bolilor și identificării medico-legale, cât și pentru taxonomie, filogenie, și multe altele.

Capacitatea de a explora variațiile genetice ale autozomilor, ale cromozomilor de sex sau ale ADN-ului mitocondrial, este doar unul dintre rezultatele remarcabile ale genomicii. Pe viitor, cercetările din domeniul genomicii vor actualiza mijloacele și metodele existente, totodată vor oferi noi instrumente aplicabile în identificarea medico-legală, în special cele legate de acei factori genetici care vor ajuta la reconstruirea aspectului fizic al unui individ sau la stabilirea originii geografice a unei persoane.

I.2 Polimorfismul ADN, Genetica și Genomica Markerilor STR. Polimorfismul și variabilitatea genetică definesc individualitatea noastră biochimică și permit utilizarea informațiilor stocate în ADN în scopuri de identificare umană. Această variabilitate este în mare parte generată de procesele de replicare și recombinare a ADN-ului. În timpul replicării (multiplicare), pot apărea numeroase "greșeli", cum ar fi mutațiile punctiforme, translocările etc. Aceste variații sunt denumite colectiv "polimorfisme" (literalmente, forme multiple) și sunt expuse în formă de alele diferite (diverse posibilități), pentru un anumit locus (Figura 1.1). La nivelul ADN-ului polimorfismul poate prezenta două forme: polimorfism de ordine (a nucleotidelor) și polimorfism de lungime (repetiția a mai multor nucleotide) (Figura 1.2).

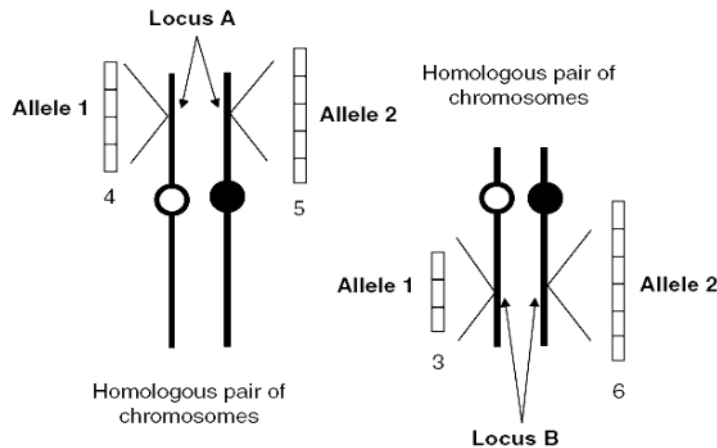


Figura 1.1: Reprezentarea schematică a doi loci (A și B) situați pe două perechi de cromozomi. Cromozomii cu centromerele marcate cu cerc deschis sunt moșteniți pe latura parentală, în timp ce cromozomii cu centromere solide sunt moșteniți maternă. Astfel, acest individ a primit alela cu patru repetiții a locusului A și alela cu trei repetiții pentru locusul B de la tată, iar alela cu cinci repetiții pentru locusul A și alela cu cinci repetiții pentru locusul B de la mamă. (Fig. modificat în conformitate cu Butler 2005)

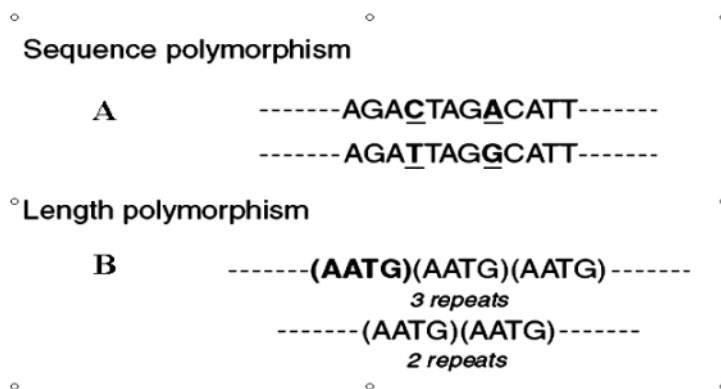


Figura 1.2: Tipurile de polimorfisme genetice: A = polimorfisme de repetiție; B = polimorfisme de lungime (Fig. modificat în conformitate cu Butler 2005).

Repetițiile scurte în tandem (STR) sau microsateliții genetici, (în continuare numiți markeri STR) sunt cei mai polimorfici markeri ADN, și reprezintă repetițiile a unor secvențe formate din două - ase perechi de baze (Tautz 1989).

Mononucleotide repeats									
A	C								
Dinucleotide repeats									
AC	AG	AT	CG						
Trinucleotide repeats									
AAC	AAG	AAT	ACC	ACG	ACT	AGC	AGG	ATC	CCG
Tetranucleotide repeats									
AAAC	AAAG	AAAT	AACC	AACG	AACT	AAGC	AAGG	AAGT	AATC
AATG	AATT	ACAG	ACAT	ACCC	ACCG	ACCT	ACGC	ACGG	ACGT
ACTC	ACTG	<u>AGAT</u>	AGCC	AGCG	AGCT	AGGC	AGGG	ATCC	ATCG
ATGC	CCCC	CCGG							

Figura 1.3: Markeri STR grupați după numărul nucleotidelor care formează secvențele repetitive; (Fig. modificat în conformitate cu Jin L și colab. 1994)

Microsateliții arată un nivel stabil și ridicat al polimorfismelor, prezintă o distribuție uniformă în întregul genom, iar lungimea secvențelor repetitive este fezabilă proceselor PCR, sunt trei dintre proprietățile locurilor STR care susțin folosirea acestora în diverse aplicații genetice. Numărul de repetiții al acestor markeri prezintă variații semnificative între indivizi, ceea ce justifică aplicabilitatea lor în procesele de identificare umană. Printre diferitele tipuri de sisteme STR, cele cu tandemele repetitive, constituite din secvențe de câte 4 nucleotide (Figura 1.4), au devenit mai populare decât cele cu di- sau trinucleotide, deoarece acestea sunt mai ușor de identificat prin separarea bazată pe electroforeză.

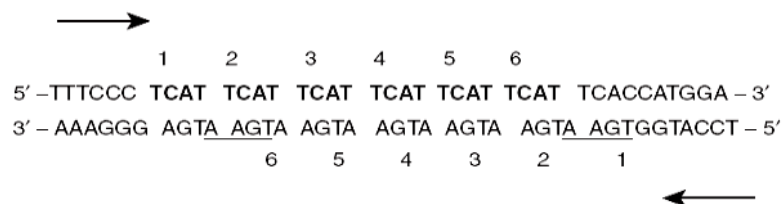


Figura 1.4: Exemplu de polimorfism STR constituit din repetiție tertanucleotidică (Fig. modificat în conformitate cu Butler 2005)

Minirepetițiile scurte în tandem (MiniSTRs). Majoritatea kiturilor STR disponibile și comercializate în prezent pot genera ampliconi de o lungime de 100-450 de perechi de baze. În cazul probelor de ADN degradate, cea mai bună modalitate de a recupera informații s-a dovedit a fi utilizarea minirepetițiilor scurte în tandem. Această eficacitate le este conferită prin dimensiunea redusă a produselor PCR (<150 pb), obținută prin mutarea regiunii de legare a amorsei în vecinătatea regiunii repetitive (Krenke și colab. 2002; Wiegand și colab. 2001).

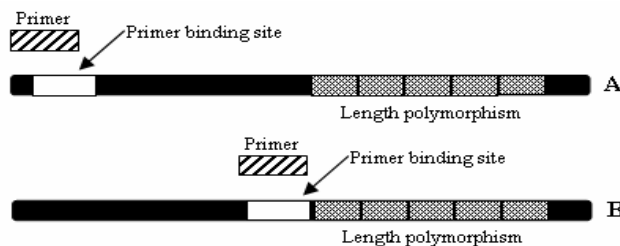


Figura 1.5: Compararea markerilor STR (A) și a minirepetițiilor scurte în tandem (B): regiunea de legare a amorsei în cazul markerului miniSTR este în vecinătatea regiunii repetitive, ceea ce rezultă printr-un produs PCR mai mic de 150 de perechi de bază.

Rezultatele a mai multor studii indică faptul, că acești markeri au un dezavantaj deloc neglijabil: cu cât regiunea de legare a amorsei este mai aproape de regiunea de repetiție, cu atât frecvența pierderii alelelor (*allele drop-outs*) în procesul de genotipare este mai mare.

I.3 Loci STR folosiți în identificarea umană

Folosirea unor seturi de markeri STR sunt necesare pentru introducerea datelor ADN în bazele de date naționale și internaționale cu scopul de a servi diversele procese juridice, dar sunt indispensabile și în transmiterea și compararea informațiilor genetice. Cele mai utilizate seturile de markeri STR sunt enumerate în Tabelul 1.1.

Setul standard Marker STR	EU (ESS-2009)	US (CODIS)	German	Interpol
FGA	Necesar	Necesar	Necesar	Necesar
TH01	Necesar	Necesar	Necesar	Necesar
VWA	Necesar	Necesar	Necesar	Necesar
D3S1358	Necesar	Necesar	Necesar	Necesar
D8S1179	Necesar	Necesar	Necesar	Necesar
D18S51	Necesar	Necesar	Necesar	Necesar
D21S11	Necesar	Necesar	Necesar	Necesar
Amelogenin	Opțional	Opțional	Necesar	Opțional
D16S539	Opțional	Necesar	-	-
TPOX	Opțional	Necesar	-	-
D1S1656*	Necesar	-	-	-
D12S391*	Necesar	-	-	-
<i>D2S441*</i>	Necesar	-	-	-
<i>D10S1248*</i>	Necesar	-	-	-
<i>D22S1045*</i>	Necesar	-	-	-
CSFIPO	-	Necesar	-	-
D5S818	-	Necesar	-	-
D7S820	-	Necesar	-	-
D13S317	-	Necesar	-	-
D2S1338	Opțional	Opțional	-	-
D19S433	Opțional	Opțional	-	-
SE33	-	-	Necesar	-
STR markers	12	13	8	7

Tabelul 1.1: Seturile de markeri STR; UE = Setul Standard European din 2009, US = setul de loci CODIS al Statelor Unite ale Americii; Locii marcați cu "*" reprezintă markeri recent incluși în set în conformitate cu Rezoluția Consiliului UE 2009/C296; markerii marcați cu *italics* sunt minirepetiții scurte în tandem (miniSTRs).

I.4 Baza de date web a markerilor STR din ADN (STRBase) este un site menținut de către Institutul Național de Standarde și Tehnologie (NIST) din SUA, și poate fi accesat online la adresa: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/>

STRBase a fost conceput cu scopul de a aduna laolalt literatura științifică a markerilor STR și de a oferi informații de ultimă oră despre acestea.

I.5 Sistemul indexului combinat ADN (CODIS) a fost lansat de USA (1998) în scopuri judiciare. În iunie 2010, această bază de date a conținut aproximativ 9 milioane de profile genetice. La reuniunea din 13-14 noiembrie 1997, 13 loci STR au fost aleși pentru a fi folosiți de acest sistem (Budowle 1998). Acești 13 loci ai sistemului CODIS sunt enumerați în Tabelul 1.1. Toți cei 13 loci CODIS au fost testați pentru probabilitatea de potrivire, care este de aproximativ unu la 94 miliarde de indivizi selectați aleator (Chakraborty et al 1999).

I.6 Baza de date a Incidentelor Fatale (Mass Fatality Incident Databases)

Amprentarea ADN-ului s-a dovedit a fi o tehnică robustă, sigură și ideală pentru identificarea victimelor dezastrelor (Disaster Victim Identification, DVI): catastrofe accidentale, evenimente naturale și acte intenționate (atacuri teroriste, războaie sau crize politice Leclair 2004; Bradford 2010; Budowle și colab. 2005).

I.7 Utilizarea markerilor STR în studii populaționale umane din România. Până în prezent rezultatele a 8 studii de populație efectuate în România au fost publicate în revistele internaționale de specialitate. Două dintre aceste studii au fost efectuate prin utilizarea setului de 13 markeri STR CODIS. Primele date populaționale au fost obținute dintr-un eșantion de 105-122 de persoane neînrudite nescute în Transilvania și Banat (Anghel 2003). Al doilea studiu conține datele a 13 loci STR testați cu românii din zona Bucureștiului (Barbarii, 2004).

I.8 Studii populaționale de genetică umană efectuate în România prin utilizarea setului de loci STR CODIS. Primul articol publicat conține date a două comunități de etnie maghiară din Transilvania (secuții și ceangăii din județul Harghita; Egyed și colab. 2005). Frecvențele alelice stabilite populației din vestul României (219 de persoane) au fost determinate în 2006 (Marian și colab. 2007). În 2008 au fost fixați parametrii genetici pentru populațiile din regiunea Transilvaniei, Munteniei, Dobrogei și Moldovei (Sanciu și colab. 2009).

I.9 Ultimele reglementări legislative aduse tehnologiei de amprentare ADN. În ultimele luni, atât în UE cât și în SUA, au fost aduse noi reglementări tehnologiei de genotipare ADN, reglementări care se referă fie la acreditarea și licențierea laboratoarelor de genotipare în scopuri juridice, fie la optimizarea și uniformizarea procesului tehnologic, necesar atât schimbului de date între bazele de date ADN existente, cât și garantării standardelor de calitate. România, ca ar membru a UE, trebuie să se conformeze recomandărilor UE. De asemenea, începând cu 2008, legea nr. 76/2008 descrie organizarea și funcționarea Sistemului Național de Date Genetice Judiciare (Publicat în Monitorul Oficial, Partea I nr. 289 din 14/04/2008).

Partea a II-a: Metodele și tehnicile amprentării ADN-ului prin intermediul markerilor STR

II.1 Extrac ia ADN-ului genomic a fost efectuat dintr-un volum de 300 μ l de sânge integral, folosind kitul SV Wizard Genomic DNA Purification Kit A1620 de la Promega, conform indica iilor produc torului (SV Wizard Genomic DNA Purification Kit; Promega 1999).

Pentru cuantificarea ADN-ului extras, probele au fost migrate prin gel de agaroză de 1%. Concentra ia ADN-ului a fost determinat prin analiz spectrofotometric cu spectrofotometrul NanoDrop ND-1000.

Probele au fost amplificate prin utilizarea kitului *AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kit* de la *Applied Biosystems*.

Programul de amplificare a fost cel recomandat de produc tor (Tabelul 2.2), îns cantitatea reactivilor folosi i a fost diminuat cu 50%, iar cantitatea probei amplificate a fost de 1 μ l, cu o concentra ie ADN de aproximativ 0,5 ng- μ l (Tabelul 2.1)

Reactivi		Cantita ile originale /sample (μ l)	Cantit i modificate /sample (μ l)
PCR MM	AmpFLSTR PCR – Mix de reactivi	1,5	5,25
	AmpliTaq Gold DNA - Polimeraz	0,5	0,25
	AmpFLSTR Identifiler - Amors	5,5	2,75
	H ₂ O (UPUV, filtered)	-	4
Cantitate PCR-MM în tuburi		15	12
ADN Genomic		10 (0,05–0,125 ng/ μ l)	1 (~0,5 ng/ μ l)
Pierdere de reactiv		-1	-0,25
Cantitate total (PCR MM + ADN)		25	13

Tabelul 2.1: Protocolul PCR original i cel modificat; PCR MM (Amestec de reactivi PCR)

Temperatura de stocare a ADN-ului amplificat pe termen scurt (max. 48 de ore) a fost de 2-6°C. Pe termen lung (mai mult de 48 de ore) produ ii PCR au fost stoca i la -15 la -25°C (*AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kit User's Manual 2006*).

Incubare ini ial	Ciclu termal	Extensie final
95 °C – 11 minute	94 °C – 1 minute (denaturare) 59 °C – 1 minute (alinie) 72 °C – 1 minute (extindere)	60 °C – 60 minute
-	Se repet ciclul termal de 28 de ori	-

Tabelul 2.2: Programul de amplificare PCR

II.3 Marcarea fluorescent a fragmentelor ADN necesită Hi-Di formamide, AmpFISTR LIZ-500 (marker intern) și markerul alelic AmpFISTR Identifiler (marker extern). Cantitățile de reactivi împreună cu produsele amplificate (Tabelul 2.3) au fost tratate termic timp de 5 minute la 95°C (pentru a denatura ADN-ul), mai apoi refrigerate timp de minim 5 minute la -15°C (Jakovski et al. 2010).

Reactivi	Marker intern/prob (μl)	Marker Extern/prob (μl)
Hi-Di™ formamid	12	12
GeneScan 500 LIZ	0,5	0,5
Produsul PCR	1,5	-
Markerul alelic AmpF/STR Identifiler	-	1,5
TOTAL amestec de reactiv/tub	14	14

Tabelul 2.3: Reactivii folosiți pentru marcarea fragmentelor ADN.

II.4 Genotiparea probelor a fost efectuată în Centrul de Biologie Moleculară prin utilizarea echipamentului ABI PRISM 310 Genetic Analyzer folosind tehnologia DS-33, pe un singur capilar, cu filtru de 5 culori (G5). Markerul intern utilizat a fost GeneScan LIZ-500. În teza elaborată am dedicat un întreg capitol detaliilor tehnologice și seturilor necesare bunei funcționări a acestui echipament. (AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kit User's Manual 2006).

II.5 Prelucrarea și interpretarea statistică a datelor. Frecvențele alelice și parametrii genetici de interes judiciar au fost determinați prin intermediul aplicației Power Stats de la Promega. Deviațiile de la echilibrul Hardy-Weinberg și testele de comparare statistică au fost finalizate prin importul datelor obținute prin genotipare în Genepop și Arlequin, aplicațiile cele mai frecvent utilizate în studiile populaționale de genetică umană.

Partea a III-a: Contribuțiile Personale și Rezultatele Studiului

III.1 Informa ii despre probe i popula ie

Conform datelor publicate pe site-ul oficial al recens mântului din 2002, în Transilvania exist o comunitate maghiar de circa 19.6 %, în mare parte reprezentat prin secuii din jude ele Harghita i Covasna. În ultimii ani datele genetice ale secuilor i ceang ilor din jude ul Harghita au fost publicate, îns s-a constatat o deficien a datelor referitoare la secuii din jude ul Covasna, precum i pentru comunitatea maghiar din Ardeal (alta decât cea secuiasc).

În consecin , am colectat un num r total de 733 de probe, reprezentând comunitatea maghiar din jude ul Cluj (206 de indivizi, în continuare voi folosi prescurtat denumirea de Cluj, jude ul Cluj sau popula ia din Cluj) i secuii din jude ul Covasna (527 de indivizi, pentru care voi folosi denumirile de Covasna, jude ul Covasna sau popula ia din Covasna).

(Fig 3.1)

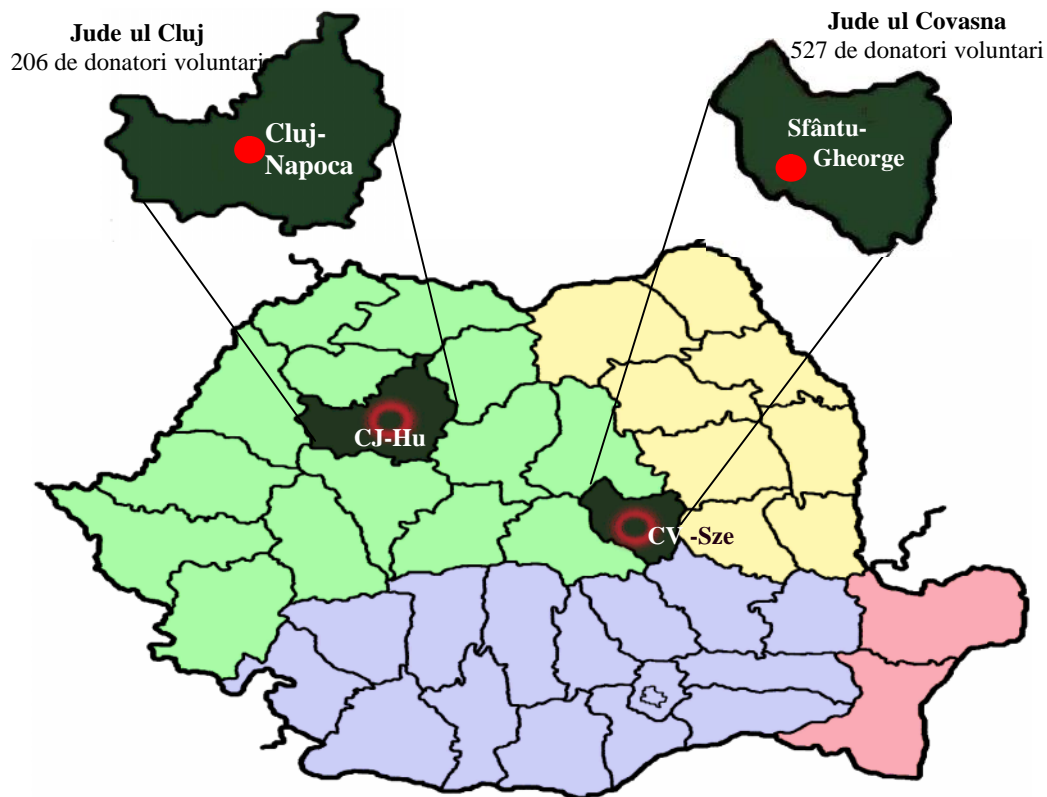


Fig 3.1: Popula iile incluse în acest studiu: CJ-Hu (comunitatea maghiar din Ardeal, alta decât cea secuiasc); CV-Sze (comunitatea secuilor din jude ul Covasna).

Probele au fost colectate cu ajutorul unor tuburi speciale cu EDTA K2/EDTA K3. Timpul mediu de stocare a probelor (timpul dintre colectare și izolare) a fost de 48 de ore. Toți donatorii și-au dat consimțământul pentru a participa la acest studiu.

III.2 Cuantificarea ADN-ului și Asigurarea Calității Procesului de Genotipare

Pentru a obține informații despre cantitatea și puritatea ADN-ului extras, probele au fost migrate prin gel de agaroz, urmat de măsurători spectrofotometrice.

Electroforeza prin gel de agaroz a precedat măsurătorile spectrofotometrice. Cantitatea ADN-ului a fost verificată folosind Transluminatorul Ultraviolet produs de BioImaging Systems (GelDoc-It Imaging System), iar imaginile au fost capturate cu ajutorul aplicației LabWorks Image Acquisition and Analysis (ver. 4.5.00.0). Cuantificarea spectrofotometrică a fost efectuată cu spectrofotometrul NanoDrop ND-1000, ceea ce a permis determinarea cantității ADN-ului (ng/μl), determinarea raportului 260/280 (necesar pentru a verifica contaminarea cu proteine) și determinarea raportului 260/230 (pentru a verifica contaminările cu alți compuși organici; Wilfinger și colab. 1997). Ca urmare, 594 de probe (81.04%) din totalul de 733 au conținut o concentrație măsurată de ADN de cel puțin 2 ng/μl.

Importanța introducerii metodelor de control, de la începutul procesului tehnologic (măsurarea extracției ADN-ului) până la markarea alelelor, constă în faptul că aceste metode pot genera singurele indicii, cu care persoanele din laborator pot preveni apariția greșelilor (*troubleshoot*) apărute pe parcursul genotipării. Tabelul 3.1 rezumă metodele de control aplicate în fiecare etapă a procesului de amprentare a ADN-ului.

Control	Metod	Reactivi
Extracția ADN-ului genomic	extracție "blank"	SV Wizard genomic DNA Purification Kit
Amplificarea ADN-ului	control pozitiv control negativ	AmpF/STR Control DNA 9947A PCR Master Mix
Marcarea ADN-ului	control negativ	Hi-Di formamide
Analiza fragmentelor	Marker intern	GeneScan500 LIZ
Marcarea alelelor	Marker alelic	AmpF/STR Identifier Allelic ladder

Tabelul 3.1 Sumarul metodelor de control aplicabile pe parcursul procesului de genotipare.

Ca urmare a riguroaselor proceduri de selecție descrise mai devreme, parametrii genetici și profilurile ADN a 424 de indivizi au fost evaluate și prelucrate pentru a realiza obiectivele definite în acest studiu.

ADN genomic izolat	Numărul probelor cu o concentrație de ADN mai mare de 2 ng/μl	Profile genetice*
206 (Județul Cluj)	179 (86.9%)	146 (81.6%)

527 (Jude ul Covasna)	415 (78.8%)	278 (67%)
Total 733	594 (81.04%)	424 (71.4%)

Tablelul 3.2: Efectele procedurilor de control cu privire la num rul de probe; * procentajul profilelor genetice a fost calculat din valorile celei de a doua coloane.

III.3 Desemnarea alelelor a fost efectuat în conformitate cu recomandările ENFSI, cu ajutorul markerului alelic AmpFISTR Identifiler, realizat cu aplicația Genotyper v3.7 pentru Windows NT. Preciziile alelelor incluse în markerul alelic au fost comparate cu valorile pentru controlul pozitiv. Neconcordanțele identificate au fost corectate. Desemnarea alelelor și crearea profilelor genetice au fost efectuate conform Figurii 3.2. Dificultățile de interpretare a datelor, determinarea profilelor genetice a celor 424 de probe și modalitatea de corecție a preciziilor nu sunt detaliate în acest rezumat.

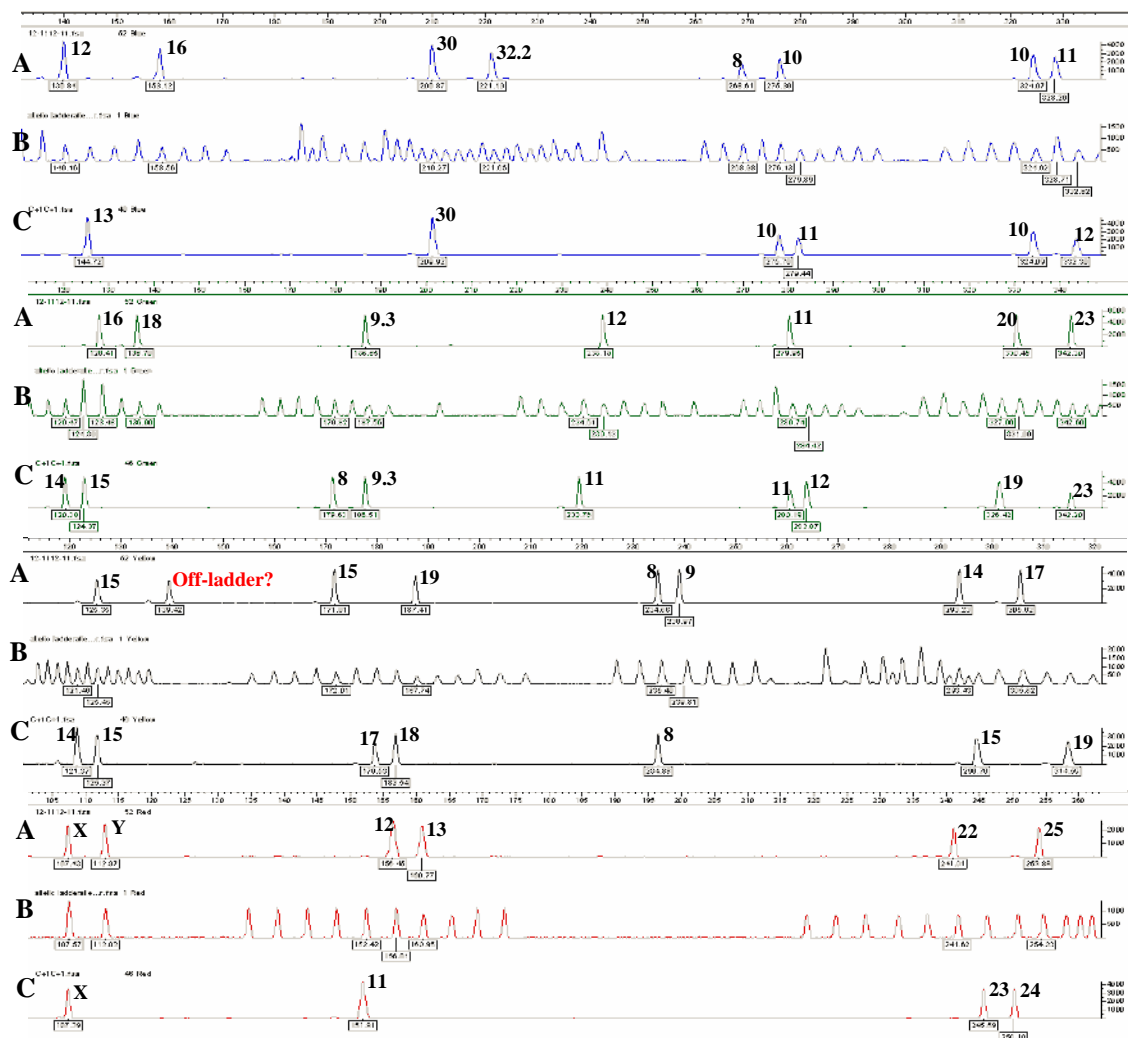


Figura 3.2: Desemnarea alelelor; (A) proba ADN 12/11 (CJ135), (B) marker alelic, (C) control pozitiv (DNA9947A).

Markerii situați în afara markerului alelic (Off-ladder alleles) au fost desemnați prin compararea cu markerului alelic și prin controlul pozitiv (Figura 3.3) sau prin compararea cu markerul alelic și o alelă învecinată dintr-o altă probă (Figura 3.4)

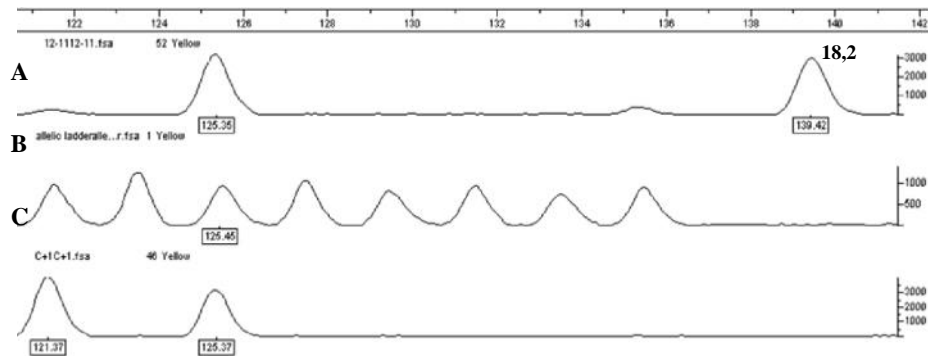


Figure 3.3: Alela 18,2 situată în afara markerului alelic pentru locusul D19S433, obținută cu Genotyper v3.7; (A) proba ADN 12/11 (CJ135), (B) marker alelic, (C) control pozitiv (DNA9947A).

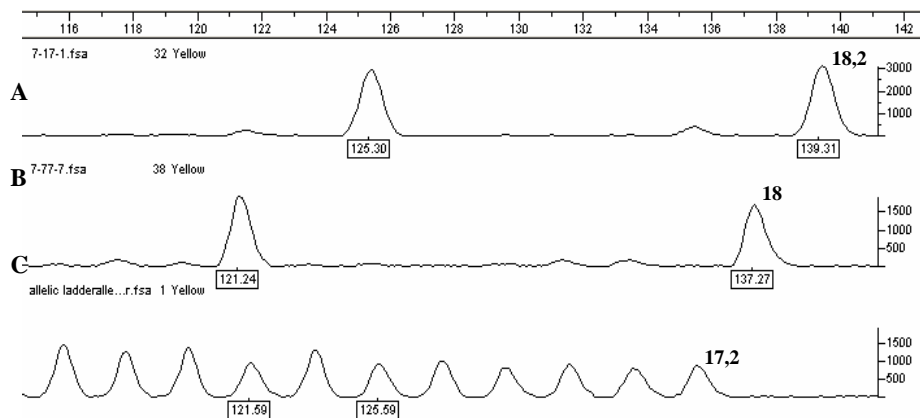


Figure 3.4: Alelele 18 și 18,2 situate în afara markerului alelic pentru locusul D19S433, obținute cu Genotyper v3.7; (A) proba ADN 7/1 (CJ049), (B) proba ADN 7/7 (CJ054), (C) marker alelic.

În cele 424 de probe, 3 loci (D19S433, D2S1338 și FGA) au prezentat 5 tipuri (în număr total de 13) de alele situate în afara markerului alelic (Tabelul 3.3).

Locus	Alel în afara markerului alelic	Mărimea alelei (pb)	Frecvența	Metoda de verificare	Raportat în România
D19S433	18	137.27	1 din 424	Re-extracție și re-amplificare	Populația ceangărilor, a regiunii Transilvaniei și a Moldovei
D19S433	18,2	139.31	3 din 424	Re-extracție și re-amplificare	Dobrogea
D2S1338	14	303.85	1 din 424	Re-extracție și re-amplificare	Dobrogea
FGA	32,2	244.17	7 din 424	Re-extracție și re-amplificare	Toate cele patru regiuni istorice
FGA	33,2	248.01	1 din 424	Re-extracție și re-amplificare	Toate cele patru regiuni istorice

Tabelul 3.3: Alele situate în afara markerului alelic identificate la 424 de indivizi reprezentând populația din Cluj și Covasna; pb (perechi de bază).

III.4 Date statistice de interes juridic

Valorile statistice pentru Probabilitatea de potrivire (Matching Probability, MP), Puterea de discriminare (Power of Discrimination, PD), Puterea de discriminare combinat (Combined Power of Discrimination (PDcomb) i Informa ia con inut în polimorfism (Polymorphism Information Content, PIC) au fost ob inute cu ajutorul aplica iei PowerStats v1.2 de la Promega.

Probabilitatea de potrivire (Matching Probability, MP). Valorile medii ob inute pentru Probabilitatea de potrivire sunt de 0,0864 (în cazul indivizilor din Cluj) i de 0,0784 pentru cei din Covasna. La ambele popula ii 3 loci au prezentat valori peste cele medii *Tabelul 3.4*. Patru loci (D21S11, D2S1338, D18S51 i FGA) au prezentat valori sub cele medii.

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
CJ	0,0739	0,0494	0,0810	0,1287	0,0905	0,0855	0,0864	0,1014	0,0377	0,0680	0,0669	0,2198	0,0417	0,1207	0,0448
CV	0,0640	0,0386	0,0693	0,1196	0,0998	0,0882	0,0858	0,0850	0,0281	0,0669	0,0677	0,1779	0,0290	0,1192	0,0369

Tabelul 3.4: Valorile calculate pentru Puterea de potrivire (MP) pentru popula ia din Cluj (CJ) i Covasna (CV) ob inute cu PowerStats v1.2.

Valorile medii ob inute pentru Puterea de discriminare (Power of Discrimination, PD) sunt de 0,9135, în cazul indivizilor din Cluj i de 0,9215 pentru cei din Covasna *Tabelul 3.5*.

Valoarea combinat a Puterii de Discriminare (Combined Power of Discrimination, PDcomb) pentru cei 15 loci este de 0,9999999999999992 pentru probele din Cluj i 0,9999999999999997 pentru cele din Covasna.

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
CJ	0,9261	0,9506	0,9190	0,8713	0,9095	0,9145	0,9136	0,8986	0,9623	0,9320	0,9331	0,7802	0,9583	0,8793	0,9552
CV	0,9360	0,9614	0,9307	0,8804	0,9002	0,9118	0,9142	0,9150	0,9719	0,9331	0,9323	0,8221	0,9710	0,8808	0,9631

Tabelul 3.5: Valorile calculate pentru Puterea de Discriminare (PD) pentru popula ia din Cluj (CJ) i Covasna (CV) ob inute cu PowerStats v1.2.

Valorile medii calculate pentru informa ia con inut în polimorfism (Polymorphism Information Content, PIC) **pentru cele dou popula ii** sunt: 0,7545 (Cluj) i 0,7673 (Covasna) *Tabelul 3.6*.

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
CJ	0,7627	0,8371	0,7513	0,6686	0,7461	0,7468	0,7339	0,7397	0,8655	0,7732	0,7956	0,5362	0,8579	0,6687	0,8351
CV	0,7884	0,8407	0,7778	0,7032	0,7380	0,7384	0,7419	0,7545	0,8750	0,7762	0,7841	0,5935	0,8672	0,6816	0,8495

Tabelul 3.6: Valorile calculate pentru Informa ia con inut de polimorfism pentru popula ia din Cluj (CJ) i Covasna (CV) ob inute cu PowerStats v1.2.

Trei loci (CSF1PO, TPOX and D5S818) au prezentat valori sub cele medii. Cu excep ia locusului TPOX, valorile m surate pentru acest parametru genetic au fost asem n toare la cele dou popula ii.

III.5 Parametrii genetici cu aplicabilitate în paternitate

Valorile statistice pentru Puterea de excludere (Power of Exclusion, PE), Puterea de excludere combinat (Combined Power of Exclusion, PEcomb) și Indexul de Paternitate (Typical Paternity Index, PI) au fost calculate cu aplicația PowerStats v1.2 de la Promega.

Valorile medii calculate pentru Puterea de excludere (Power of Exclusion, PE) sunt de 0,6011 (Cluj) și de 0,5838 (Covasna) *Tabelul 3.7.*

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
CJ	0,5275	0,8179	0,5889	0,3657	0,6535	0,5639	0,5639	0,6273	0,8742	0,5367	0,6935	0,2623	0,8601	0,3753	0,7070
CV	0,6577	0,6716	0,5700	0,5190	0,6098	0,5253	0,5128	0,5765	0,7501	0,5442	0,5897	0,3617	0,7501	0,4194	0,6998

Tabelul 3.7: Valorile calculate pentru Puterea de excludere (PE) pentru populația din Cluj (CJ) și Covasna (CV) obținute cu PowerStats v1.2.

Locii CSF1PO, TPOX și D5S818 au prezentat valori sub cele medii (Figura 3.12). Cele mai ridicate valori s-au obținut pentru locii D21S11, D2S1338 și D18S51. Valorile PE pentru 10 din cei 15 loci au fost mai mari pentru populația din Cluj în comparație cu populația din Covasna. Valoarea combinată a Puterii de excludere obținut pentru cei 15 loci sunt de 0,9999998 pentru Cluj, respectiv de 0,999998 pentru Covasna. Aceste valori ridicate susțin utilizarea acestor loci testați la cele două populații în vederea determinării paternității.

Indexul de Paternitate (**Typical Paternity Index, PI**). Valorile medii determinate pentru cele două populații studiate sunt de 3,2498 (Cluj) și de 2,5791 (Covasna). Aceste valori au fost calculate prin intermediul aplicației PowerStats v1.2. Valorile sunt detaliate în *Tabelul 3.8.*

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
CJ	2,09	5,58	2,43	1,46	2,92	2,28	2,28	2,70	8,11	2,13	3,32	1,18	7,30	1,49	3,48
CV	2,96	3,09	2,32	2,04	2,57	2,07	2,01	2,36	4,09	2,17	2,44	1,45	4,09	1,64	3,39

Tabelul 3.8: Valorile calculate pentru Indexul de Paternitate pentru populația din Cluj (CJ) și Covasna (CV) obținute cu PowerStats v1.2.

Valori foarte ridicate au fost calculate pentru Covasna în cazul locilor D21S11, D2S1338 și D18S51. Toate valorile măsurate s-au situat peste 1.

III.6 Date statistice populationale

Valorile statistice pentru heterozigotie (H), testul exact al echilibrului Hardy-Weinberg (HWE) au fost obținute cu aplicația Arlequin v3.5, iar frecvența alelelor a fost determinat folosind metoda de numărare a alelelor și a fost calculat prin intermediul Microsoft Office Excel 2003.

Heterozigo ia Observat (Hobs) i Preconizat (Hexp) sunt cei mai importan i parametrii genetici. Din cei 15 loci testa i doar TPOX s-a situat sub valoarea recomandat de 70%. Valoarea medie a heterozigo iei se situeaz la nivelul de 78%.

Valorile medii calculate pentru Hobs a fost mai mare pentru Cluj (0,794) decât pentru Covasna (0,7889). Valorile observate (Hobs) au fost mai mari decât cele preconizate (Hexp), 8 (Cluj) i 4 (Covasna) din cele 15 loci testa i (Tabelul 3.9).

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
CJ Hobs	0,7603	0,9110	0,7945	0,6575	0,8288	0,7808	0,7808	0,8151	0,9384	0,7671	0,8493	0,5753	0,9315	0,6644	0,8562
CJ Hexp	0,7907	0,8532	0,7820	0,7208	0,7812	0,7811	0,7671	0,7745	0,8778	0,7978	0,8202	0,5987	0,8714	0,7167	0,8525
CV Hobs	0,8309	0,8381	0,7842	0,7554	0,8058	0,7590	0,7518	0,7878	0,8777	0,7698	0,7950	0,6547	0,8777	0,6942	0,8525
CV Hexp	0,8127	0,8563	0,8061	0,7466	0,7744	0,7738	0,7748	0,7866	0,8859	0,8006	0,8111	0,6482	0,8795	0,7262	0,8646

Tabelul 3.9: Tabel cu valorile heterozigo iei observate (Hobs) i preconizate (Hexp) pentru 15 loci STR testa i la popula iile din Cluj (CJ) i Covasna (CV).

Valorile heterozigo iei observate (Hobs) pentru popula ia din jude ul Cluj s-au situat între 0,5753 (TPOX) i 0,9384 (D2S1338). Valorile heterozigo iei preconizate (Hexp) s-au situat între 0,5987 (TPOX) i 0,8778 (D2S1338). Valorile observate a 7 din 15 loci s-au situat sub cele medii i 3 din 15 loci au fost identifica i a fi sub procentul de 70% recomandat. Valorile preconizate pentru 5 din cei 15 loci s-au dovedit a fi sub medie, i doar un singur locus (TPOX) sub procentul recomandat de 70%.

Valorile heterozigo iei observate (Hobs) pentru popula ia din jude ul Covasna s-au situat între 0,5753 (TPOX) i 0,9384 (D2S1338). Valorile heterozigo iei preconizate (Hexp) s-au situat între 0,6547 (TPOX) i 0,8777 (D2S1338 i D18S51). Valorile observate a 8 din 15 s-au situat sub cele medii i 2 din cei 15 loci s-au dovedit a fi sub procentul recomandat de 70%. Valorile preconizate pentru 7 din 15 loci s-au situat sub cele medii, i doar un singur locus (TPOX) sub procentul recomandat de 70%.

Testul exact pentru Echilibrul Hardy-Weinberg (HWE)

În cazul populației din județul Cluj, valorile obținute pentru 2 din cei 15 loci testați (Tabelul 3.10) s-au dovedit a fi sub nivelul de semnificație de $P < 0,05$: CSF1PO ($P = 0,021$) și după aplicarea corecției Bonferroni ($0,05/15 = 0,0033$) nu am înregistrat abateri de la echilibrul Hardy-Weinberg.

În cazul populației din județul Covasna valorile obținute pentru 3 din cei 15 loci testați s-au dovedit a fi sub nivelul de semnificație de $P < 0,05$: CSF1PO, D16S539 și D19S433 (Tabelul 3.10). Valorile semnificative pentru locii D16S539 și D19S433 au fost eliminate după aplicarea corecției Bonferroni ($0,05/15 = 0,0033$).

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
CJ	0,2471	0,1511	0,0996	<i>0,0210</i>	0,2993	0,0519	0,4589	0,1653	0,0627	0,0720	0,2215	0,5769	<i>0,0036</i>	0,2844	0,2631
CV	0,2342	0,4394	0,1145	<i>0,0014</i>	0,1019	0,3677	0,2346	<i>0,0049</i>	0,0738	<i>0,0397</i>	0,1182	0,1952	0,6350	0,5244	0,0637

Tabelul 3.10: Tabelul cu valorile obținute pentru 15 loci STR testați și pentru echilibrul Hardy-Weinberg (HWE) la populațiile din Cluj (CJ) și Covasna (CV); valorile marcate cu caractere italice arată abateri de la HWE la un nivel semnificativ de $P < 0,05$.

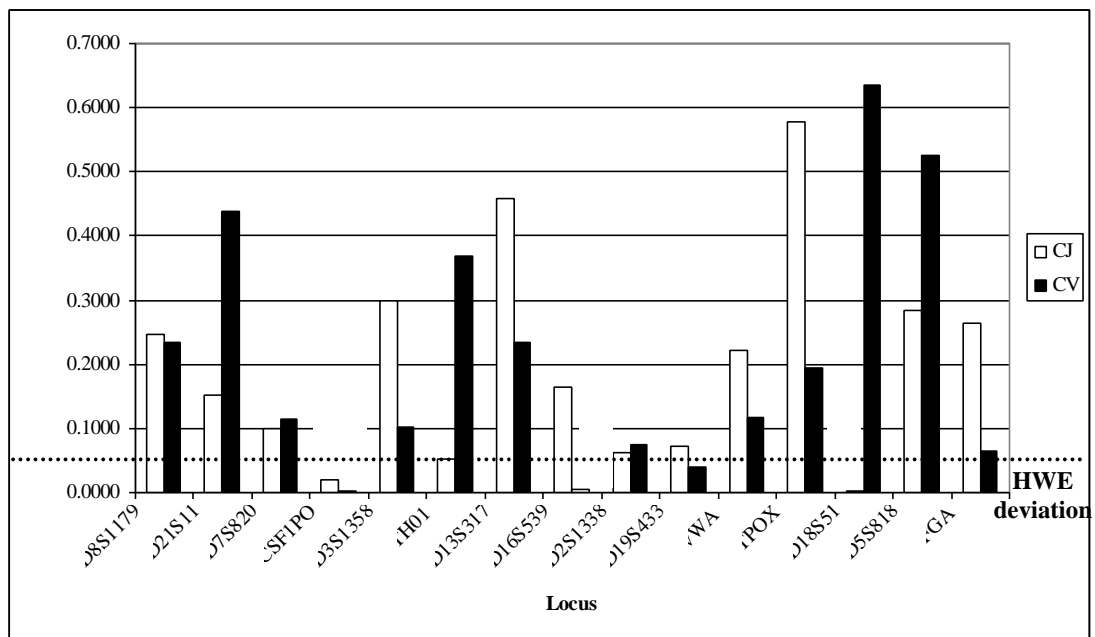


Figura 3.5: Valorile HWE obținute pentru cei 15 loci STR studiați la populațiile din Cluj (CJ) și Covasna (CV)

Frecvența alelică a celor două populații incluse în acest studiu

Frecvențele alelice ale celor 15 loci STR testați în județele Cluj (Tabelul 3.11) și Covasna (Tabelul 3.12) au fost calculate folosind metoda de numărare a alelelor și au fost calculate cu Microsoft Office Excel 2003.

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6						0.2466									
7			0.0171			0.1301									
8	0.0205		0.1541	0.0068		0.1267	0.0103					0.5480		0.0034	
9	0.0068		0.1027	0.0274		0.1849	0.0856	0.0993		0.0034		0.0891	0.0034	0.0377	
9.3						0.3014									
10	0.0616		0.3356	0.2774		0.0103	0.0513	0.0719				0.0445	0.0137	0.0788	
10.2													0.0034		
11	0.0616		0.2398	0.3253			0.3391	0.2945		0.0172		0.3013	0.0103	0.3322	
12	0.1747		0.1062	0.3049			0.2946	0.2877		0.0651	0.0034	0.0171	0.0822	0.3733	
13	0.3356		0.0445	0.0514			0.0651	0.1986		0.2637	0.0034		0.1507	0.1610	
13.2										0.0342					
14	0.2090			0.0068	0.1164		0.0308	0.0377		0.3253	0.1096		0.1953	0.0068	
14.2										0.0342					
15	0.1200				0.2568		0.0068			0.1165	0.1267		0.1541	0.0068	
15.2										0.0548					
16	0.0068				0.2329			0.0753		0.0548	0.2260		0.1267		
16.2										0.172					
17	0.0034				0.2671			0.1883	0.0034	0.2364			0.1233		
18					0.1164			0.0925	0.0034	0.2021			0.0548		0.0068
18.2									0.0068						
19					0.0104			0.0788		0.0616			0.0480		0.0719
20								0.1575		0.0274			0.0102		0.1233
21								0.0240					0.0171		0.1507
22								0.0240		0.0034			0.0034		0.2193
22.2															0.0068
23								0.1370							0.1473
24								0.0925					0.0034		0.1678
24.2		0.0034													
25								0.1130							0.0753
26		0.0034						0.0137							0.0274
27		0.0274						0.0034							
28		0.1267													
29		0.1815													0.0034
29.2		0.0034													
30		0.2467													
30.2		0.0377													
31		0.0856													
31.2		0.0993													
32		0.0240													
32.2		0.1267													
33.2		0.0308													
35		0.0034													

Tabelul 3.11: Frecven a alelic a 15 loci STR testa i în jude ul Cluj.

Alele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6						0.2086						0.0018			
7			0.0144	0.0018		0.1619						0.0036	0.0018	0.0018	
8	0.0126		0.1529	0.0126		0.1007	0.1511	0.0198				0.4982		0.0018	
9	0.0144		0.1763	0.0701		0.1979	0.0791	0.1565				0.1205		0.0431	
9.3						0.3273									
10	0.0827		0.2716	0.3004		0.0036	0.0576	0.0594				0.0594	0.0180	0.0863	
10.2												0.0036			
11	0.0755		0.2104	0.3040			0.3147	0.2481		0.0018		0.2913	0.0126	0.2752	
12	0.1440		0.1421	0.2517	0.0018		0.2932	0.2985		0.0791		0.0252	0.1529	0.3904	
12.2										0.0036					
13	0.2931		0.0323	0.0468			0.0863	0.1817		0.2301	0.0018		0.1259	0.1906	
13.2										0.0270			0.0018		
14	0.2249			0.0090	0.0791		0.0180	0.0360	0.0018	0.3308	0.1169		0.1565	0.0036	
14.2										0.0360					
15	0.1295			0.0036	0.2464				0.0018	0.1511	0.1205		0.1241	0.0072	
15.2										0.0450					
16	0.0198				0.2985			0.0630	0.0504	0.2338			0.1474		
16.2									0.0343						
17	0.0035				0.2195			0.1834	0.0054	0.2428			0.0989		0.0054
17.2									0.0036						
18					0.1457			0.1295		0.2050			0.0809		0.0108
18.2									0.0018						
19					0.0090			0.0953		0.0702			0.0450		0.0486
20								0.1169		0.0090			0.0288		0.1546
21								0.0306							0.1601
22								0.0486							0.1690
22.2															0.0090
23								0.1295					0.0018		0.1367
23.2															0.0018
24									0.0845						0.1601
25									0.0971						0.0899
26		0.0072							0.0180						0.0468
27		0.0288													0.0072
28		0.1331													
29		0.2266													
29.2		0.0054													
30		0.2068													
30.2		0.0575													
31		0.0630													
31.2		0.0845													
32		0.0162													
32.2		0.1205													
33.2		0.0414													
34.2		0.0054													
35.2		0.0018													
38		0.0018													

Tabelul 3.12: Frecven a alelic a 15 loci STR testa i în jude ul Covasna

III.7 Comparații statistice populaționale

Compararea statistică a parametrilor genetici pentru cele două populații incluse în acest studiu s-a efectuat cu ajutorul testului pereche pentru compararea populațională (Fst) și al testului exact pentru diferențierea populațiilor (Exact test). Rezultatele obținute arată că, în cazul locilor testați, nu există diferențe semnificative între populația din Cluj și cea din Covasna. Ambele populații prezintă valori semnificative pentru 2 loci în comparație cu ceangii din Harghita, câte un locus diferent (D5S818) față de secuii din același județ, și nici o valoare semnificativă în comparație cu frecvențele alelice a 10 loci determinați la populația din București (B-Ro).

Pentru Cluj, într-o comparație care a inclus un număr de 8 populații, am înregistrat 5 cazuri de diferențe semnificative, dintre care două în comparația cu ceangii din Harghita. În cazul aceleiași comparații, pentru Covasna am înregistrat 15 cazuri de diferențe semnificative, dintre care șase (D21S11, CSF1PO, TH01, D16S539, D2S1338 și D18S51) în comparația cu populația Valahiei. Valorile semnificative obținute sunt incluse în Tabelul 3.13.

Marker	Test	Population data	CV-Sze n=278	HR-Sze n=257	HR-Csn n=220	B-Ro n=243	Trs n=1977	Vest n=219	Moldova n=1321	Dobrogea n=569	Valahia n=1910
D21S11	Fst	CV-Sze vs		0,612	0,104	0,730	0,863	0,455	0,747	0,833	0,634
	Exact test	CV-Sze vs		0,934	0,313	0,601	0,308	0,756	0,344	0,817	0,018
D7S820	Fst	CJ-Hu vs	0,217	0,200	0,102	nd	0,055	0,451	0,180	0,064	0,076
	Exact test	CJ-Hu vs	0,387	0,271	0,047	nd	0,159	0,562	0,442	0,232	0,287
CSF1PO	Fst	CV-Sze vs		0,366	0,412	nd	0,017	0,294	0,035	0,202	0,040
	Exact test	CV-Sze vs		0,326	0,533	nd	<0,001	0,323	<0,001	0,047	0,003
D3S1358	Fst	CV-Sze vs		0,886	0,024	0,160	0,067	0,870	0,474	0,763	0,312
	Fst	CJ-Hu vs	0,368	0,585	0,031	0,220	0,014	0,260	0,152	0,193	0,016
	Exact test	CV-Sze vs		0,870	0,006	0,167	0,214	0,897	0,627	0,876	0,402
TH01	Fst	CJ-Hu vs	0,496	0,765	0,024	0,285	0,058	0,348	0,231	0,472	0,065
	Exact test	CV-Sze vs		0,711	0,648	0,315	0,137	0,049	0,250	0,047	0,034
D16S539	Fst	CV-Sze vs		0,463	0,549	0,398	0,321	0,020	0,553	0,172	0,220
	Exact test	CV-Sze vs		0,612	0,038	0,335	0,387	0,519	0,312	0,355	0,011
D2S1338	Fst	CV-Sze vs		0,629	0,010	0,532	0,270	0,542	0,364	0,373	0,010
	Exact test	CV-Sze vs		0,347	0,660	0,127	0,088	0,573	0,163	0,404	0,146
D19S433	Fst	CV-Sze vs		0,350	0,656	0,065	0,001	0,554	0,016	0,245	0,016
	Exact test	CV-Sze vs		0,456	0,316	0,653	0,049	0,457	0,613	0,103	0,171
D18S51	Fst	CV-Sze vs		0,561	0,429	0,749	0,135	0,604	0,663	0,154	0,221
	Exact test	CV-Sze vs		0,403	0,494	0,321	0,242	0,839	0,389	0,346	0,070
D5S818	Fst	CV-Sze vs		0,208	0,604	0,069	0,052	0,877	0,014	0,198	0,001
	Fst	CJ-Hu vs	0,610	<0,001	0,959	nd	0,805	0,814	0,982	0,835	0,958
	Exact test	CV-Sze vs		<0,001	0,877	nd	0,262	0,830	0,696	0,271	0,353
	Exact test	CJ-Hu vs	0,970	<0,001	0,828	nd	0,126	0,586	0,221	0,849	0,327

Tabelul 3.13: Rezultatele testului pereche pentru compararea populațională (Fst) și ale testului exact pentru diferențierea populațiilor (exact test) pentru populația din Cluj și Covasna; **CJ-Hu** (maghiarii non-secuii din județul Cluj) **CV-Sze** (Secuii din județul Covasna) **HR-Sze** (Secuii din județul Harghita); **HR-Csn** (Ceangii din județul Harghita); **B-Ro** (Românii din București); **Trs** (baza de date inițială Transilvaniei) **Vest** (populația din vestul României); valorile marcate cu „bold” reprezintă valori semnificative la nivelul de $P < 0,05$; n (numărul de indivizi testați); CJ-Hu și CV-Sze sunt contribuții personale; HR-Csn, HR-Sze, B-Ro, Trs, Vest Moldova, Dobrogea și Valahia sunt date din literatură.

III.8 Baza de date actualizat a Transilvaniei (TRS-6)

De când studiile populare genetice au fost începute în România, au fost efectuate cinci studii reprezentând ase popula ii din Transilvania. O prim baz de date a popula iei din Transilvania a cuprins un num r de 1977 de indivizi, excep ie f când jude ele Covasna i S laj (Stanciu i colab. 2009). Consider m, c prin ad ugarea datelor, ce caracterizeaz popula ia din vestul României, comunitatea secuilor i ceang ilor din Harghita, secuii din Covasna i maghiarii din Cluj, la baza de date ini ial a Transilvaniei, contribuim la completarea bazei de date din Transilvania (Tabelul 3.14). Toate aceste rezultate au fost cumulate într-o baz de date actualizat a Transilvaniei (TRS-6), care în acest moment con ine datele genetice a ase popula ii din această regiune (Figura 3.6).

Nr.	Popula ie	Num rul indivizilor	Procentul reprezentat în baza de date a Transilvaniei
1	TRS	1977	64
2	Cluj	146	5
3	Covasna	278	9
4	Secuii din Harghita	257	8
5	Ceang ii din Harghita	220	7
6	Popula ia din vestul României	219	7
Total TRS-6		3097	100

Tabelul 3.14: Compozi ia bazei de date actualizate a Transilvaniei (TRS-6)

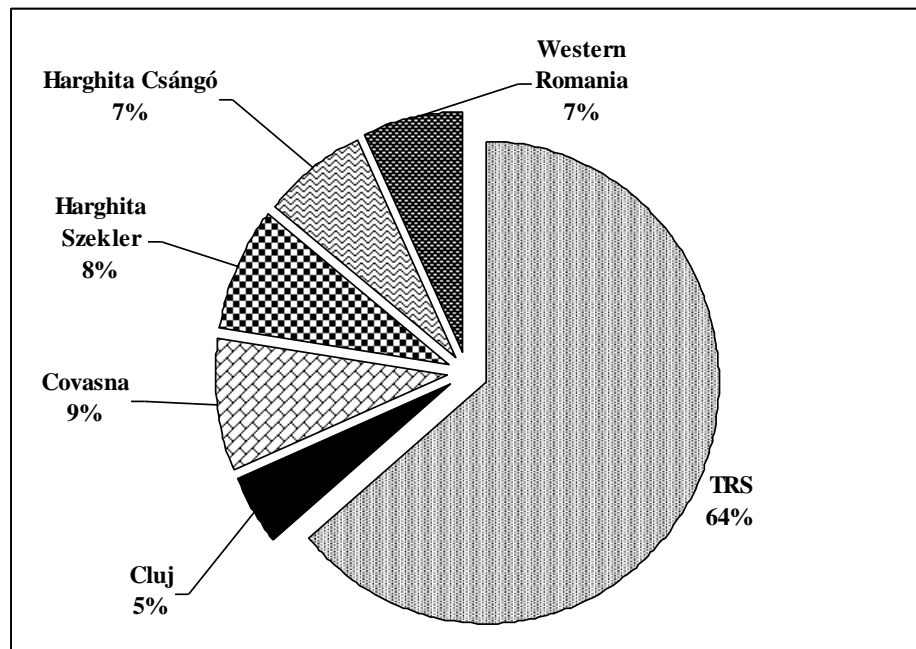


Figura 3.6: Procentul popula iilor incluse în baza de date actualizat a Transilvaniei (TRS-6)

Varia iile genetice ale acestor ase popula ii, exprimate în date statistice i frecven e alelice, au fost cumulate, dar nu sunt detaliate în acest rezumat.

Compararea biostatistică a celor două baze de date ale Transilvaniei

O comparație a bazei de date inițiale (TRS, $n = 1977$) și a celei actualizate (TRS-6, $n = 3097$) din Transilvania a fost efectuată cu scopul de a verifica consecințele actualizării.

Prin compararea bazei de date inițiale a Transilvaniei cu baza de date actualizată, testul de comparație a populațiilor (pairwise population comparison test, Fst) arată o singură valoare semnificativă și anume pentru locusul D21S11. Testul exact pentru diferențierea populațiilor (exact population differentiation test) a rezultat prin valori semnificative în cazul locilor D21S11, D13S317, D2S1338 și vWA. În total, cele două teste au rezultat prin valori semnificative pentru 4 din cei 15 loci STR testați (Tabelul 3.15).

Populația	Trs n=1977	Moldova n=1321	Dobrogea n=569	Valahia n=1910	România n=6897	FBI n=195-203	Total diferențe
Trs-6	4	4	3	5	4	3	19
Trs		1	0	1	2	3	7

Tabelul 3.15: Valori semnificative obținute prin compararea bazelor de date ale Transilvaniei cu datele altor populații; Trs (baza de date STR inițială a Transilvaniei), Trs-6 (baza de date STR actualizată a Transilvaniei), FBI (baza de date STR a FBI-ului), n (numărul de indivizi).

Când datele genetice pentru TRS și TRS-6 au fost comparate cu celelalte regiuni istorice ale României (Moldova, Valahia și Dobrogea), un număr mai însemnat de valori semnificative au fost obținute pentru TRS-6, în comparație cu TRS.

Diferențe în valorile statistice semnificative am obținut și în cazul în care TRS și TRS-6 au fost comparate cu baza de date a României.

În comparație cu baza de date a FBI-ului, TRS și TRS-6 au prezentat câte trei valori semnificative: D3S1358, FGA și D5S818 pentru TRS, respectiv D21S11, vWA și D5S818 pentru TRS-6.

Prin urmare, se recomandă utilizarea bazei de date actualizate, ori de câte ori este nevoie de compararea datelor genetice a regiunii Transilvaniei cu datele altor populații.

Tabelul 3.15: Compararea statistică a bazei de date inițiale (TRS) și a celei actualizate (TRS-6) pentru Transilvania

Marker	Test	Populația	Trs n=1977	Moldova n=1321	Dobrogea n=569	Valahia n=1910	România n=6897	FBI n=195-203	Marker	Test	Populația	Trs n=1977	Moldova n=1321	Dobrogea n=569	Valahia n=1910	România n=6897	FBI n=195-203
D8S1179	Fst	Trs-6 vs	0,496	0,801	0,597	0,450	0,917	0,423	D19S433	Fst	Trs-6 vs	0,319	0,313	0,347	0,797	0,985	nd
	Fst	Trs vs		0,434	0,954	0,960	0,753	0,199		Fst	Trs vs		0,016 [†]	0,515	0,915	0,192	nd
	Exact test	Trs-6 vs	0,768	0,593	0,594	0,647	0,989	0,380		Exact test	Trs-6 vs	0,949	0,835	0,410	0,865	0,999	nd
	Exact test	Trs vs		0,295	0,927	0,901	0,864	0,148		Exact test	Trs vs		0,290	0,788	0,780	0,873	nd
D21S11	Fst	Trs-6 vs	0,002*	0,007	0,115	<0,001	0,055	0,245	vWA	Fst	Trs-6 vs	0,332	0,306	0,782	0,107	0,319	0,851
	Fst	Trs vs		0,579	0,945	0,228	0,170	0,203		Fst	Trs vs		0,682	0,982	0,883	0,959	0,574
	Exact test	Trs-6 vs	<0,001*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,013		Exact test	Trs-6 vs	<0,001*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,035
D7S820	Fst	Trs-6 vs	0,592	0,869	0,930	0,055	0,708	0,792	TPOX	Fst	Trs-6 vs	0,909	0,433	0,498	0,546	0,952	0,290
	Fst	Trs vs		0,796	0,994	0,533	0,867	0,400		Fst	Trs vs		0,255	0,733	0,901	0,918	0,247
	Exact test	Trs-6 vs	0,935	0,978	0,972	0,137	0,970	0,194		Exact test	Trs-6 vs	0,986	0,527	0,453	0,967	0,983	0,405
	Exact test	Trs vs		0,894	0,995	0,387	0,868	0,156		Exact test	Trs vs		0,451	0,333	0,940	0,888	0,214
CSF1PO	Fst	Trs-6 vs	0,596	0,531	0,499	0,627	0,993	0,922	D18S51	Fst	Trs-6 vs	0,846	0,952	0,207	0,080	0,584	0,442
	Fst	Trs vs		0,423	0,329	0,686	0,585	0,922		Fst	Trs vs		0,938	0,604	0,582	0,917	0,312
	Exact test	Trs-6 vs	0,807	0,541	0,641	0,457	0,931	0,118		Exact test	Trs-6 vs	0,994	0,606	0,560	0,139	<0,001	0,715
	Exact test	Trs vs		0,693	0,438	0,737	0,646	0,161		Exact test	Trs vs		0,757	0,846	0,729	0,064	0,635
D3S1358	Fst	Trs-6 vs	0,297	0,640	0,938	0,256	0,959	0,161	D5S818	Fst	Trs-6 vs	0,662	0,457	0,753	0,589	0,894	<0,001
	Fst	Trs vs		0,163	0,304	0,210	0,140	0,043 [†]		Fst	Trs vs		0,134	0,943	0,522	0,410	0,003
	Exact test	Trs-6 vs	0,649	0,775	0,790	0,331	0,997	0,144		Exact test	Trs-6 vs	0,977	0,663	0,816	0,926	0,996	0,016
	Exact test	Trs vs		0,410	0,523	0,586	0,364	0,041 [†]		Exact test	Trs vs		0,610	0,758	0,925	0,970	0,002
TH01	Fst	Trs-6 vs	0,789	0,896	0,485	0,146	0,733	0,477	FGA	Fst	Trs-6 vs	0,746	0,992	0,828	0,682	0,987	0,554
	Fst	Trs vs		0,680	0,865	0,449	0,850	0,383		Fst	Trs vs		0,976	0,964	0,631	0,799	0,218
	Exact test	Trs-6 vs	0,925	0,886	0,204	0,290	0,941	0,177		Exact test	Trs-6 vs	0,943	0,989	0,735	0,680	0,998	0,193
	Exact test	Trs vs		0,734	0,425	0,564	0,895	0,201		Exact test	Trs vs		0,956	0,925	0,627	0,814	0,027 [†]
D13S317	Fst	Trs-6 vs	0,074	0,111	0,449	0,043	0,379	0,208	D16S539	Fst	Trs-6 vs	0,757	0,462	0,878	<0,001	0,394	0,505
	Fst	Trs vs		0,628	0,760	0,767	0,501	0,208		Fst	Trs vs		0,472	0,983	0,034	0,816	0,417
	Exact test	Trs-6 vs	<0,001*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,187		Exact test	Trs-6 vs	0,945	0,655	0,926	0,005	0,795	0,404
D2S1338	Fst	Trs-6 vs	0,478	0,720	0,865	0,658	0,974	nd	D16S539	Exact test	Trs vs		0,694	0,985	0,012	0,958	0,368
	Fst	Trs vs		0,938	0,706	0,960	0,767	nd		Fst	Trs-6 vs	0,478	0,720	0,865	0,658	0,974	nd
	Exact test	Trs-6 vs	<0,001*	0,005	0,334	<0,001	0,265	nd		Exact test	Trs-6 vs	0,945	0,655	0,926	0,005	0,795	0,404
	Exact test	Trs vs		0,972	0,586	0,971	0,151	nd		Exact test	Trs vs		0,694	0,985	0,012	0,958	0,368

n = numărul de indivizi; vs = versus; Trs-6 = baza de date adaptată Transilvaniei; Trs = baza de date inițială Transilvaniei; FBI = baza de date FBI (Budowle și colab. 2001); nd = valori nedeterminate; valorile marcate cu simbolul “*” reprezintă valori semnificative între cele două baze de date (Trs-6 și Trs); valorile marcate cu “italics” arată valori semnificative întâlnite în ambele baze de date; valorile marcate cu simbolul “†” ne arată cum valori semnificative inițiale și-au pierdut semnificația după actualizarea bazei de date; valorile prezentate în “bold” arată cum valori ne semnificative devin semnificative după actualizare; pragul de semnificație este de P<0,05.

III.9 Baza de date STR a României

Datele actualizate pentru Transilvania au fost cumulate cu datele celorlalte regiuni istorice ale României (Moldova, Dobrogea și Valahia), ceea ce a dus la apariția primei baze de date cuprinzătoare a 15 loci STR pentru România (Tabelul 3.16).

Nr.	Regiunea	Numărul indivizilor	Procentul reprezentat în baza de date a României
1	Trs-6	3097	45
2	Moldova	1321	19
3	Valahia	1910	28
4	Dobrogea	569	8
Total		6897	100

Tabelul 3.16: Compoziția bazei de date STR a României, Trs-6 (baza de date STR actualizată a Transilvaniei).

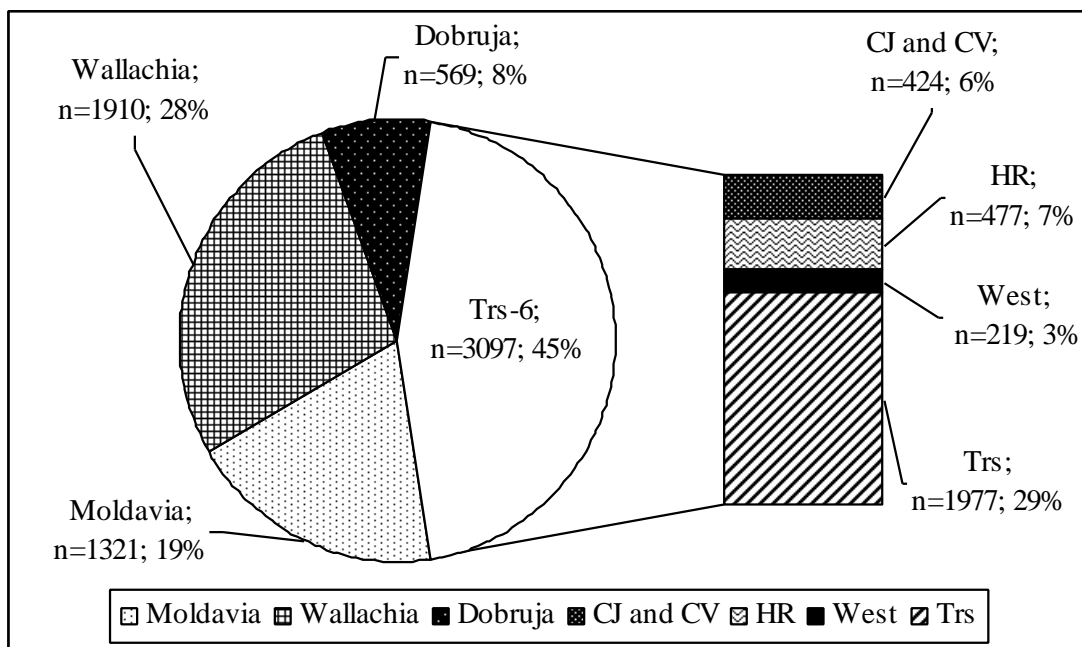


Figura 3.7: Structura bazei de date STR a României. Trs (baza de date STR inițială a Transilvaniei), Trs-6 (baza de date STR actualizată a Transilvaniei), CJ (populația din județul Cluj), CV (populația din județul Covasna), HR (populațiile din județul Harghita), West (populația din Vestul României).

Baza de date STR a României conține datele genetice pentru toate cele patru regiuni istorice ale României: Transilvania, Valahia, Moldova și Dobrogea. Variațiile genetice ale acestora exprimate în date statistice și frecvențele alelice nu sunt detaliate în acest rezumat. Teza include, de asemenea, informații despre baza de date a FBI-ului.

Compararea bazelor de date STR ale regiunilor istorice din România.

Baza de date STR a României a fost comparat cu datele celor patru regiuni istorice ale rii, i au fost identificate diferen e semnificative pentru loci D21S11, D13S317 i vWA fa de baza de date actualizat a Transilvaniei (TRS-6) i pentru locii D21S11, D13S317 i D16S539 fa de baza de date STR a Valahiei. Rezultatele testelor arat lipsa valorilor semnificative în compara ia efectuat cu baza de date a Dobrogei, i prezint diferen e semnificative pentru un singur locus (D5S818) în compara ia cu baza de date a FBI-ului.

Bazele de date STR ale regiunilor istorice ale României au fost de asemenea comparate cu baza de date a FBI-ului. Prin urmare, cinci loci au prezentat diferen e semnificative: D21S11 (FBI *versus* TRS-6 i Valahia), D3S1358 (FBI *versus* TRS i Valahia) vWA (FBI *versus* TRS-6), D5S818 (FBI *versus* toate cele patru regiuni) i FGA (FBI *versus* TRS). În concluzie, locii D21S11, D13S317, D3S1358 i D5S818 par a fi cei mai polimorfici markeri STR pentru regiunile istorice ale României (Tabelul 3.17).

Efectul popula iilor de etnie maghiar asupra bazei de date a României a fost studiat prin excluderea datelor genetice ale popula iilor de na ionalitate maghiar din baza de date a României (România*). Aceast excludere nu a modificat valorile semnificative identificate în compara ia efectuat cu baza de date STR a regiunii Dobrogei i a FBI-ului, i a anulat toate valorile semnificative înregistrate în compara ia cu Trs, Moldova i Valahia.

Marker	Popula ia	Test	FBI n=195-203	TRS-6 n=3097	Trs n=1977	Moldova n=1321	Dobrogea n=569	Valahia N=1910
D21S11	Romania* vs.	Fst	0,1475	< 0,001	0,9297	0,5391	0,9785	0,4619
	Romania vs.	Exact test	0,0519	< 0,001	< 0,001	0,0004	0,1302	< 0,001
	Romania* vs.	Exact test	0,0744	< 0,001	0,9948	0,4741	0,5488	0,9145
	FBI vs.	Fst		0,2637	0,1865	0,3428	0,2305	0,0420
D3S1358	FBI vs.	Exact test		0,0160	0,0682	0,4616	0,2086	0,0177
		Fst		0,1611	0,0430	0,1719	0,4160	0,0391
D13S317	Romania* vs.	Exact test		0,1437	0,0407	0,0895	0,5541	0,0417
		Fst	0,1719	0,0127	0,9404	0,7041	0,8848	0,8555
D16S539	Romania* vs.	Exact test	0,4446	< 0,001	< 0,001	0,0018	0,2099	< 0,001
		Exact test	0,2493	< 0,001	0,9294	0,8546	0,6545	0,9731
D2S1338	Romania* vs.	Exact test	nd	< 0,001	0,9997	0,9917	0,6191	0,9972
vWA	Romania* vs.	Fst	0,4199	0,3936	0,8164	0,4346	0,9922	0,0147
		Exact test	0,7692	< 0,001	0,8692	0,7465	0,9472	0,5346
D5S818	Romania* vs.	Exact test	0,6506	< 0,001	0,9803	0,6449	0,9426	0,7279
		Exact test		0,0351	0,6944	0,8750	0,8595	0,4253
	FBI vs.	Fst	< 0,001	0,8936	0,4102	0,5361	0,7305	0,8848
		Exact test	0,0029	0,8057	0,6309	0,3447	0,8711	0,9297
FGA	Romania* vs.	Exact test	0,0106	0,9963	0,9703	0,6677	0,7798	0,9946
		Exact test	0,0037	0,9243	0,9943	0,7005	0,7138	0,9930
	FBI vs.	Fst		< 0,001	0,0029	0,0068	0,0029	0,0020
		Exact test		0,0164	0,0017	0,0115	0,0157	0,0164
FGA	FBI vs.	Exact test		0,1933	0,0275	0,2079	0,1219	0,1620

Tabelul 3.17: Rezultatele testului de comparare popula ional (Fst) i a testului exact pentru diferen ierea popula iilor (Exact test) pentru baza de date a României; n (numrul de indivizi); vs (*versus*) nd (nedeterminat); Trs-6 (baza de date actualizat a Transilvaniei); Trs (baza de date ini ial a Transilvaniei); FBI (baza de date FBI, Budowle i colab. 2001); valorile prezentate în "bold" arat valori semnificative la pragul de P<0,05.

Partea a IV-a: Discuții

În cazul populației din Cluj, valoarea medie a heterozigotiei preconizate (H_{exp}) a fost mai mică decât valoarea observată pentru heterozigotia observată ($H_{exp} = 0,7857$; $H_{obs} = 0,7941$). La populația din Covasna am remarcat contrariul ($H_{exp} = 0,7965$; $H_{obs} = 0,7890$). Dacă acceptăm valoarea H_{exp} ca un potențial semnă pentru endogamie în cazul populației din Covasna, putem motiva de ce CV-Sze prezintă mai multe diferențe semnificative decât CJ-Hu, în comparațiile efectuate cu mai multe populații din România. Dacă se consideră că ar trebui să existe o corelație pozitivă între distanța genetică și cea geografică, atunci testele statistice comparative ne indică câteva rezultate neașteptate. Ne-am fi așteptat să identificăm mai multe diferențe semnificative pentru populația CV-Sze, în comparație cu CJ-Hu și B-Ro, decât cu comunitatea HR-Sze. Rezultatele noastre nu prezintă diferențe semnificative pentru CV-Sze față de CJ-Hu și B-Ro, dar comparativ cu populația învecinată HR-Sze, un locus a prezentat valori semnificative. Având în vedere că rezultatele comparaționale sunt influențate de numărul locilor comparați (doar 10 loci au fost disponibile pentru populația B-Ro), va fi nevoie de investigații viitoare, care să includă toți cei 15 loci în testele de comparație populațională. Definirea caracteristicilor genetice ale celorlalte populații istorice maghiare (din Ungaria, Serbia, Slovacia, Ucraina și Austria) ne-ar ajuta în a clarifica caracteristicile genetice ale celor două populații incluse în acest studiu.

Referitor la compararea bazelor de date din România, ne-am fi așteptat să existe o corelație negativă între numărul de indivizi genotipa i/regiune și distanța genetică pe care regiunea respectivă o prezintă în comparație cu baza de date a României. Cu alte cuvinte, Transilvania ($n = 3097$; 44,9%) și Valahia ($n = 1910$; 27,7%) ar fi trebuit să prezinte diferențe mai puțin semnificative decât Dobrogea ($n = 569$; 8,25%), în comparație cu baza de date a României ($n=6897$). Rezultatele nu ne-au confirmat acest lucru, fapt pentru care am efectuat câteva teste suplimentare cu o bază de date a României, din care populațiile maghiare au fost excluse. Compararea acestei baze de date cu datele regiunilor istorice ale României a rezultat prin scăderea valorilor semnificative de la trei la zero, față de Valahia și de la doi la zero față de Moldova. Modificarea bazei de date a mărșit numărul locilor care prezintă valori semnificative de la trei la patru față de TRS-6, dar nu a influențat în mod semnificativ valorile observate pentru regiunea Dobrogei.

Partea a V-a: Concluzii

Populațiile incluse în acest studiu pot fi utilizate atât în studii de micro-diferențiere populațională cât și în diverse aplicații ce implică identificarea umană. Rezultatele care vin în sprijinul acestei aptitudini sunt:

- Valorile P_{Dcomb} (0,9999999999999992 – 0,9999999999999997) și valorile P_{Ecomb} (0,99999998 – 0,9999998) obținute pentru cei 15 loci sunt semnificativ de ridicate;
- Procentul de heterozigoție observat și preconizat a atins valori medii de 78%, depășind astfel pragul minim de 70%
- Cu excepția locusului CSF1PO pentru Covasna, nu am identificat abateri de la echilibrul Hardy-Weinberg.

Testele comparative statistice nu au evidențiat diferențe semnificative între maghiarii non-secui din județul Cluj (CJ-Hu) și secuii din județul Covasna (CV-Sze).

În comparație cu secuii din județul Harghita (HR-Sze), ambele populații (CJ-Hu și CV-Sze) prezintă diferențe semnificative pentru un singur locus (D5S818)

Într-o comparație statistică cu românii din București (B-RO), comparație, care a inclus doar 10 din cei 15 loci STR testați pentru populațiile incluse în acest studiu (CJ-Hu și CV-Sze), am remarcat lipsa valorilor semnificative.

Cea mai mare distanță genetică, exprimată prin valori semnificative obținute pentru 4 loci STR, a fost înregistrată pentru populația din Covasna într-o comparație cu baza de date a Valahiei.

Testele comparabile statistice au definit locii D21S11, D13S317, D3S1358 și D5S818 ca fiind cei mai polimorfici markeri STR ai celor patru regiuni istorice ale României.

Acest studiu indică faptul că trebuie luat în considerare cont de originea etnică a indivizilor în cazul în care se dorește crearea de baze de date genetice cuprinzătoare.

Bibliografie

(SELEC IE)

- AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kit User's Manual. Protocol for 310 Genetic Analyzer. Applied Biosystems. 2006.
- Anghel A, Marian C, Pitulescu M, Daba A, Sirbu IO, Rusu V, Budowle B. Population genetic study of eight short tandem repeat loci CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, vWA, F13B and LPL in the Western Romanian population. *Forensic Sci Int.* 2003;131:218-9.
- Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B, DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems; *Forensic Sci Int.* 1997; 87:179-4.
- Bär W, Brinkmann B, Lincoln P, Mayr W, Rossi U, Budowle B, Eisenberg A, Fourney R, Gill P, Rand S, Editorial: Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms; *Forensic Sci. Int.* 1992; 55:1-3.
- Barbarii LE, Burkhard R, Constantinescu C, Hohoff C, Petre C, Dermengiu D, Allele frequencies of 13 short tandem repeat (STR) loci in the Romanian population; *Forensic Sci. Int.* 2004; 141:171-4.
- Barbarii LE, Rolf B, Constantinescu C, Hohoff C, Calistru P, Dermengiu D. Allele frequencies of 13 short tandem repeat (STR) loci in the Romanian population. *Forensic Sci Int.* 2004;141:171-4.
- Bradford L. Disaster victim investigation recommendations from two simulated mass disaster scenarios utilized for user acceptance testing CODIS 6.0. *Forensic Sci Int Genetics.* 2010. doi:10.1016/j.fsigen.2010.05.005.
- Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hoehne J, Burkhard R, Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat; *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62:1408-15.
- Budowle B, Allen RC, Analysis of amplified fragment-length polymorphisms (VNTR/STR loci) for human identity testing; *Methods Mol. Biol.* 1998; 98:155-71.
- Budowle B, Bieber F, Eisenberg A. Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. *Leg. Med.* 2005;7:230-43.
- Budowle B, Moretti TR, Keys KM, Koons BW, Smerick JB. Validation studies of the CTT STR multiplex system. *J Forensic Sci.* 1998;42(4):701-7.
- Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* Second Ed. Academic Press. 2005.
- Butler JM. New resources for the forensic genetics community available on the NIST STRBase website. *Forensic Sci Int Genetics Supplement Series.* 2008;1:97-9.

- Butler, John M., and Dennis J. Reeder. NIST standard reference database SRD 130: Chromosomal Locations for DNA Typing Markers. <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/chrom.htm> (accessed: 05 July 2010).
- Carracedo A, John M. Butler, Gusma L, Parson W, Roewer L, Schneider PM, Editorial/Publication of population data for forensic purposes; *Forensic Sci. Int. Genetics* 2010; 4:145–147.
- Chakraborty R, Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing; *Human Biology* 1992; 64:141-59;
- Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of STR loci beyond human identification: Implications for the development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*. 1999;20:1682-96.
- Council of The European Union, No.doc: 15870/09 ENFOPOL 287 CRIMORG 170.
- EU Council Resolution on the exchange of DNA analysis results, Official Journal of the European Union. 2009;C296.
- Egyed B, Füredi S, Pádár Z, Population genetic study in two Transylvanian populations using forensically informative autosomal and Y-chromosomal STR markers, *Forensic Sci. Int.* 2005; November 25, PMID: 16314060 [Epub ahead of print].
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, Arlequin ver. 3.5: an integrated software package for population genetics data analysis, *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005; 47–50; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arl35Downloads.html>
- Gill P, Jeffreys AJ, Werett DJ. Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature*. 1985;318:577-79.
- Holt CL, Buoncristiani M, Wallin JM, Nguyen T, Lazaruk KD, Walsh PS. TWGDAM validation of AmpFI STR PCR amplification kits for forensic DNA casework. *J Forensic Sci.* 2002;47(1):66-96.
- Jakovski Z, Ksenija N, Biljana J, Zdravko C, Aleksandar S, Verica P, Goran P, Aleksej D. Forensic DNA analysis in the identification of human remains in mass graves. *J Clin Path & Forensic Med.* 2010;1(1):001-4.
- Jin L, Zhong Y, Chakraborty R. The exact numbers of possible microsatellite motifs. *American Journal of Human Genetics.* 1994;55(11):582-83.
- Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ, Buel E, Culhane S, Finis CJ. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J Forensic Sci.* 2002;47(4):773-85.
- Leclair B. Large-scale comparative genotyping and kinship analysis: evolution in its use for human identification in mass fatality incidents and missing persons databasing. *International Congress Series.* 2004;261:42-4.
- Marian C, Anghel A, Bel SM, Ferencz BK, Ursoniu S, Dressler M, Popescu O, Budowle B, STR data for the 15 AmpFI STR identifier loci in the Western Romanian population; *Forensic Sci. Int.* 2007; 170:73-75.
- NanoDrop Spectrophotometers Technical Bulletin T042. Thermo Scientific.
- Raymond M, Rousset F, GENEPOP (v1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism; *J. Heredity*, 1995; 86:248-9.

- Romanian census 2002 official site: <http://www.recensamant.ro>
- Rousset F, Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux; *Mol. Ecol. Resources* 2008; 8:103-106.
- Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm JW, General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci, *BioTechniques* 1996; 20:266-76.
- Stanciu F, (A) Popescu OR, Stoian IM, Allele frequencies of 15 STR loci in Moldavia region (NE Romania); *Forensic Sci Int.(Genetics)* 2009; 4:39–40.
- Stanciu F, (B) Stoian IM, Popescu OR, Comprehensive STR data for the AmpFISTR Identifiler from Transylvania (NW Romania); *Legal Medicine* 2009; 11:48–50.
- Stanciu F, (C) Stoian IM, Popescu OR, Population Data for 15 Short Tandem Repeat Loci from Wallachia Region, South Romania; *Croat Med J.* 2009; 50:321-5.
- Stanciu F, (D) Stoian IM, Popescu OR, STR data for the AmpFISTR Identifiler from Dobruja region (SE Romania); *Forensic Sci Int.(Genetics)* 2009; 3:146–7.
- SV Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), 1999; Technical Manual No.050:4-5.
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:6463-71.
- Transylvania definition is available on online version of Oxford Dictionary:
- Tsukada K, Takayanagi K, Asamura H, Ota M, Fukushima H. Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO, and vWA loci. *Legal Med.* 2002;4:239-45.
- Wiegand P, Kleiber M. Less is more (length reduction of STR amplicons using redesigned primers). *Int J Legal Med.* 2001;114(4–5):285-7.
- Wilfinger WV, Mackey K, Chomczynski P, Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques.* 1997;22:474-81.
- Zhivotovsky LA, Feldman WM, Microsatellite variability and genetic distances; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:11549-11552.