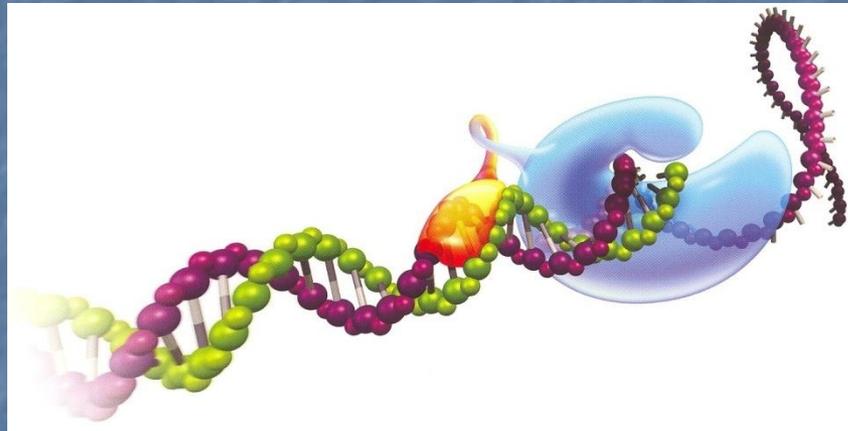


# Scuola di Specializzazione in Genetica Medica

Anno accademico 2009-2010

## GENETICA FORENSE



Docente

Dott. Ugo Ricci

Campioni ottenuti dalla  
scena del crimine o per un  
test di paternità

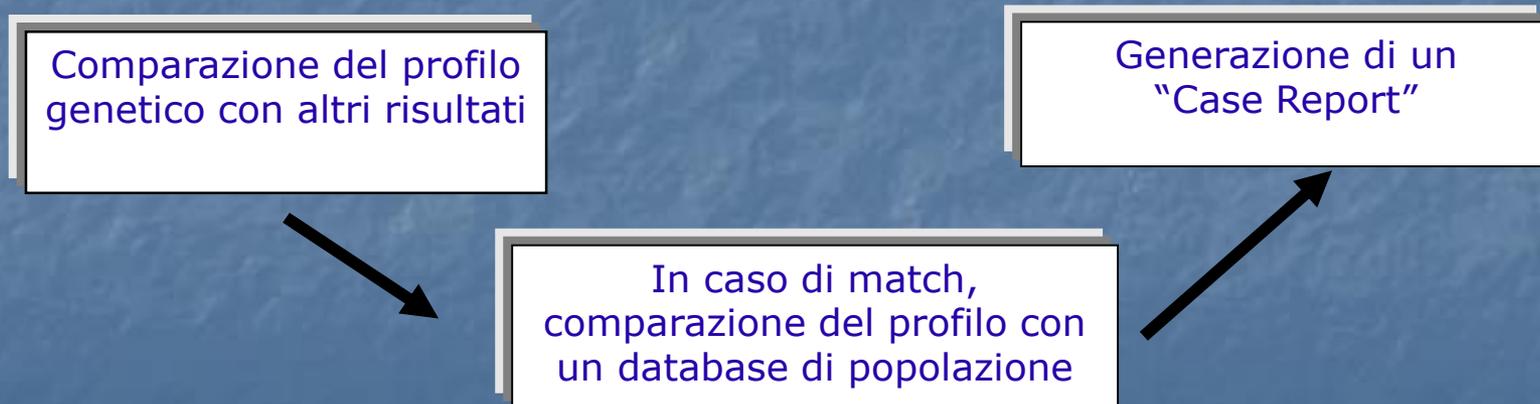
## Biologia



## Tecnologia



## Genetica



# Materiali biologici analizzabili

- Sangue
- Liquido seminale
- Saliva
- Urina
- Capelli
- Denti
- Ossa
- Tessuti



## Macchia di sangue

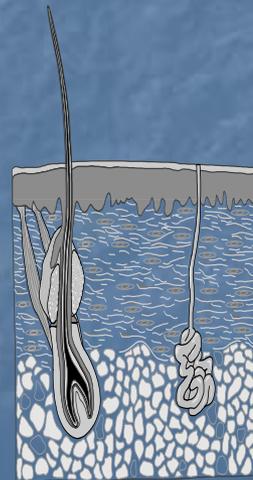
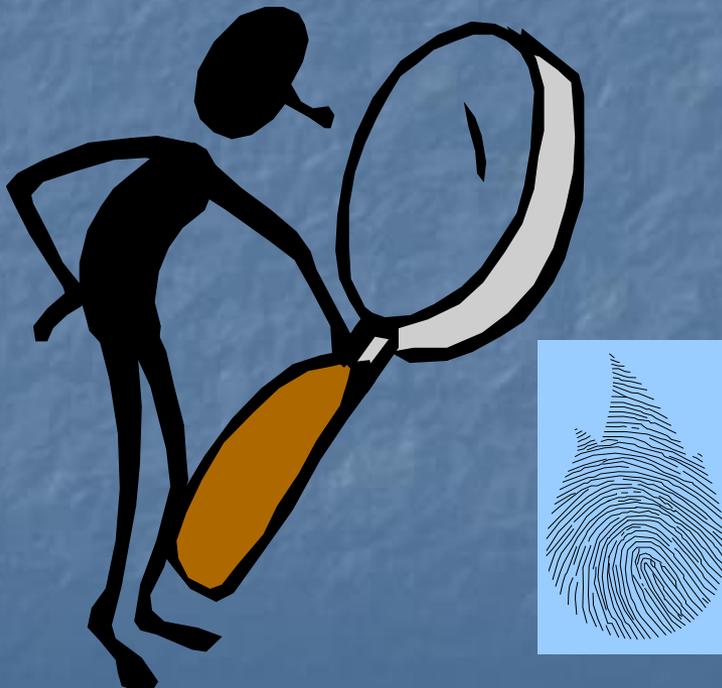
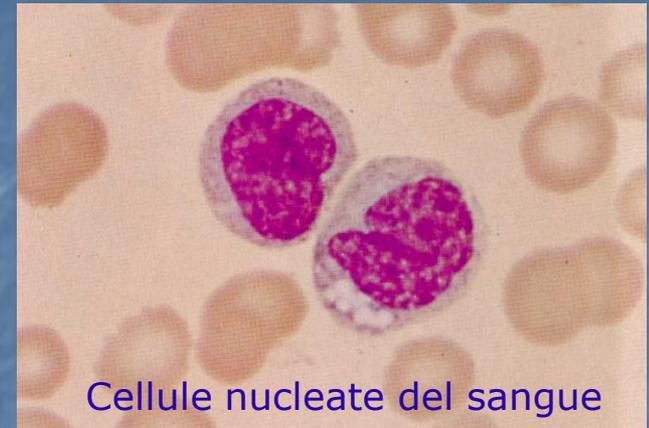
**E' richiesta solo una piccola parte di sangue per un profilo del DNA**

# Fonti di DNA

Praticamente ogni traccia biologica  
contiene DNA

Il DNA si trova in ogni materiale cellulare  
che contiene un nucleo

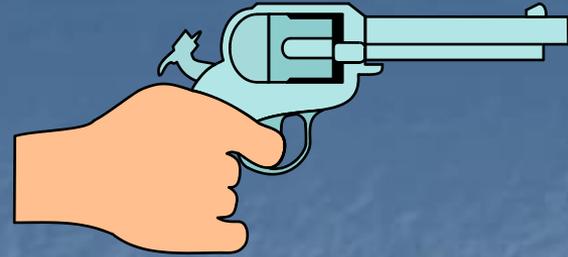
Presente in materiali biologici lasciati sulla  
scena del crimine



## Fonti di DNA per “contatto”

- DNA per contatto = da poche a 50 cellule
  - Mozziconi di sigaretta
  - Francobolli e buste chiuse con saliva
  - Forfora
  - Impronte digitali
  - Oggetti personali
    - rasoi, filo interdentale, chewing gum, orologio da polso, cerume, impronte labiali, spazzolini da denti, scarpe

## DNA con basso numero di copie (Low Copy Number)



Tracce di DNA si trovano dopo che un oggetto è stato toccato o maneggiato da qualcuno, che ha lasciato proprie cellule per contatto.

Definizione suggerita da Gill et al. (Forensic Sci Int 2000;112:17-40)  
"Tipizzazione di campioni contenenti meno di 100 pg di templato DNA."

Definizione suggerita da Budowle et al. (Twelfth International Symposium on Human identification 2001):  
"L'analisi di ogni risultato sotto la soglia stocastica per una normale interpretazione."

LCN ha diversi limiti, specialmente quando non si possono effettuare ripetizioni dell'amplificazione per verificare la riproducibilità dei risultati.

Il danneggiamento del DNA può simulare l'effetto LCN: effetto di processi ossidativi e idrolitici o attacchi delle nucleasi.

# Esistono differenti tipi di donatori

La capacità di lasciare tracce biologiche su un oggetto toccato è donatore-dipendente

**good shedder** - lasciano molte cellule quando toccano un oggetto

**power shedder** - lasciano poche cellule quando toccano un oggetto.

## Contenuto di DNA nucleare in tessuti

1 spermatozoo	3 picogrammi
1 cellula diploide	6 picogrammi
1 radice di capello	1 nanogrammo (=1000pg)
1 capello caduto	300 picogrammi
1 goccia di sangue	1.500 nanogrammi

## ESTRAZIONE ORGANICA



INCUBAZIONE (56 °C)



VORTEX



**Fase acquosa in nuovo tubo**



**Concentrazione del campione**  
(Centricon/Microcon-100 o precipitazione in etanolo)



QUANTIFICAZIONE

**PCR**

## ESTRAZIONE CON RESINE



INCUBAZIONE (ambiente)



RIMOZIONE supernatante



INCUBAZIONE (56°C)

INCUBAZIONE (100°C)



QUANTIFICAZIONE

**PCR**

## ESTRAZIONE DA SPOT



RIMOZIONE supernatante

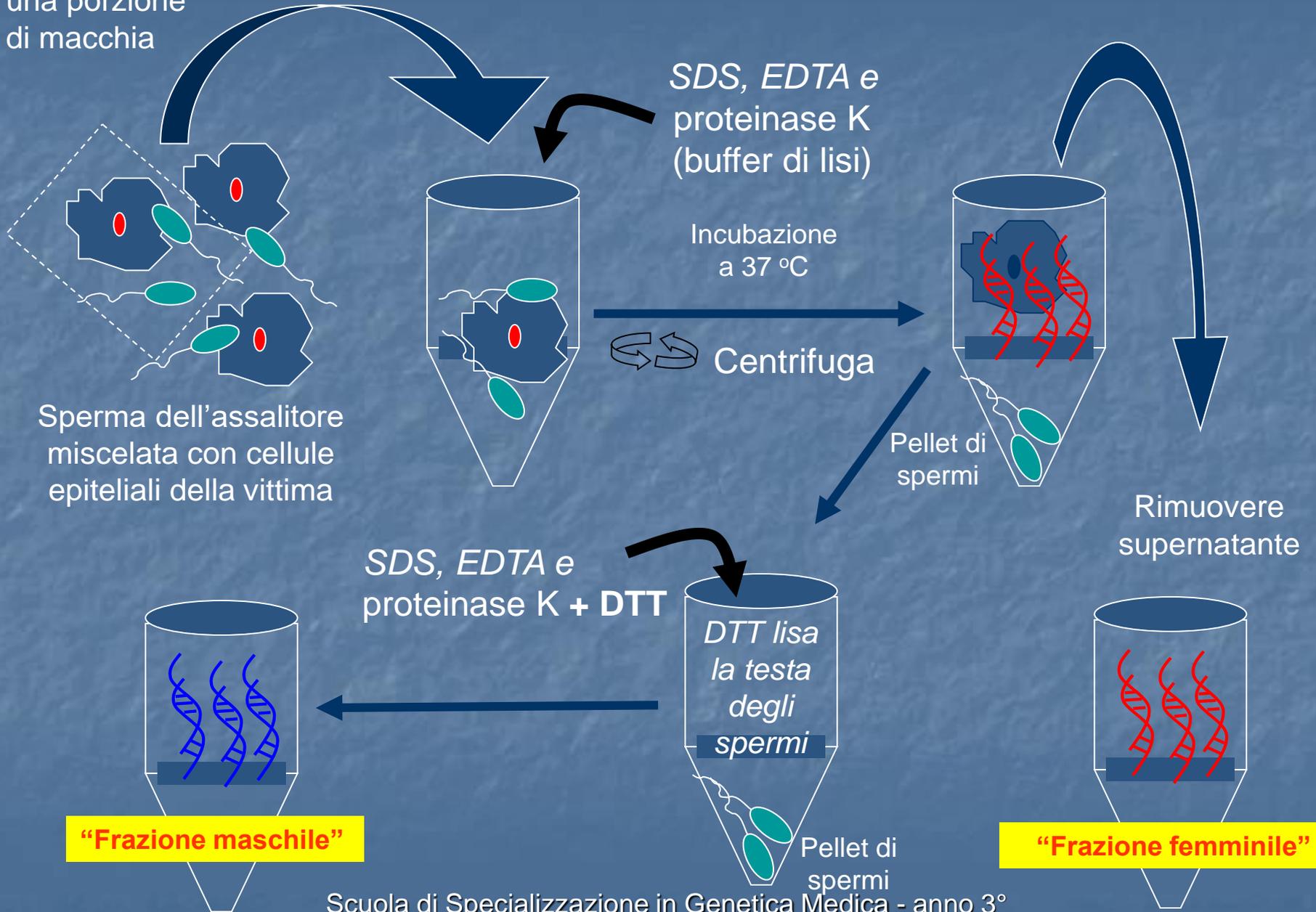


QUANTIFICAZIONE OMESSA  
CON CAMPIONI UNIFORMI

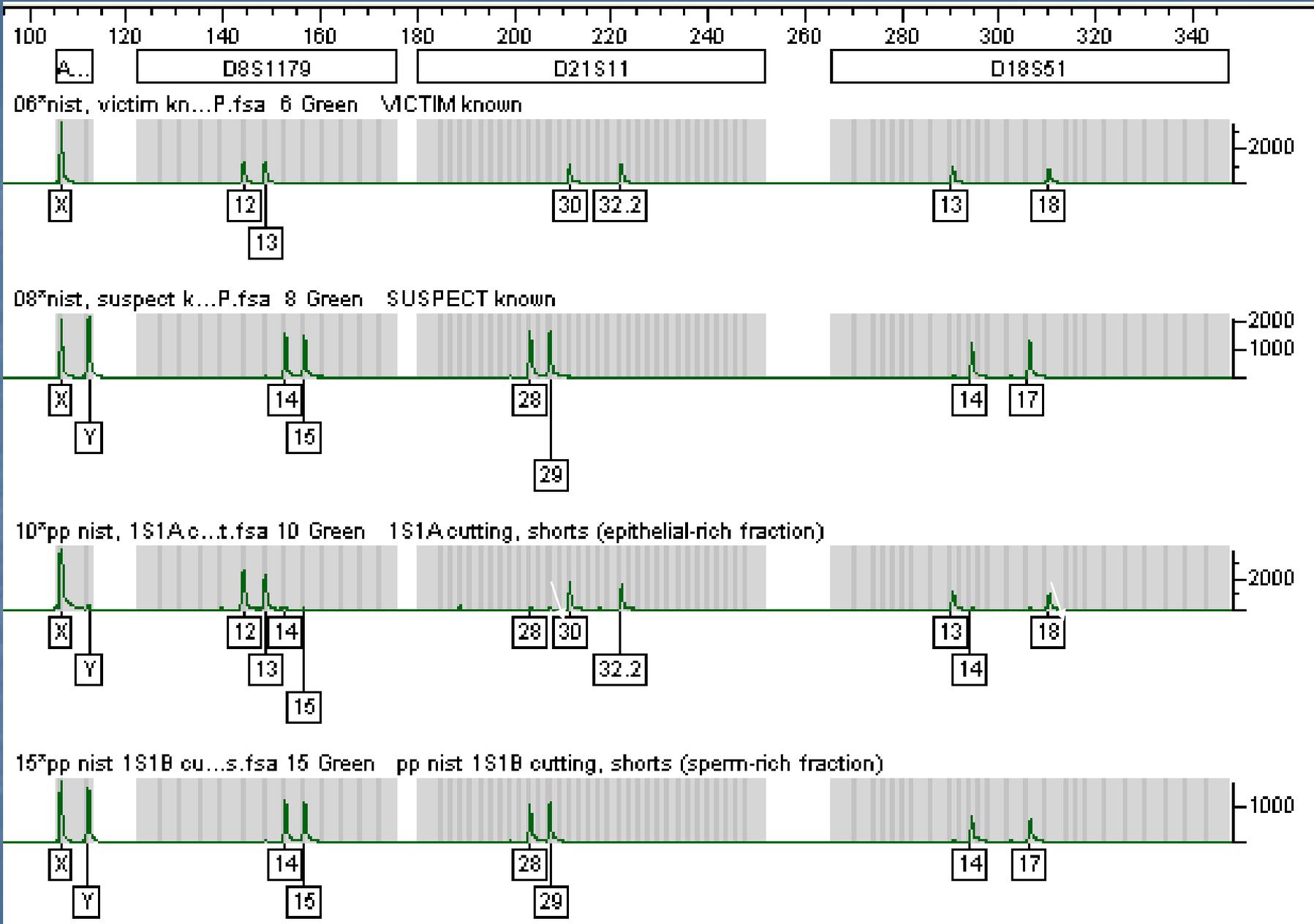
**PCR**

# Estrazione differenziale

Rimuovere una porzione di macchia



PCR product size (bp)



# Quantificazione

- Spettrofotometro – lettura a 260 nm: utile solo per DNA non degradato, estratto da sangue e tessuti.  
Non specifico per materiale umano e per il DNA;
- Elettroforesi in agarosio – non specifico per DNA umano
- Metodo degli spot in agarosio - non specifico per DNA umano
- Slot–blot hybridization – specifico per ciascuna specie e sensibile, ma impegnativo in termini di tempo
- Real time PCR – specifico per DNA umano, molto sensibile e rapido.

# Calcolo delle quantità di DNA nella cellula diploide

Importanti valori da considerare

1 bp = 618 g/mol

A: 313 g/mol; T: 304 g/mol; A-T base pairs = 617 g/mol

G: 329 g/mol; C: 289 g/mol; G-C base pairs = 618 g/mol

1 copia di genoma =  $\sim 3 \times 10^9$  bp = 23 cromosomi (uno per ciascuna coppia)

1 mole =  $6.02 \times 10^{23}$  molecole (numero di Avogadro)

Un'analisi standard via PCR di marcatori STR richiede tipicamente 1 ng di template DNA.

**Quante copie di ciascun STR esistono in 1 ng di DNA?**

1 copia di genoma =  $(\sim 3 \times 10^9 \text{ bp}) \times (618 \text{ g/mol/bp}) = 1.85 \times 10^{12} \text{ g/mol}$

=  $(1.85 \times 10^{12} \text{ g/mol}) \times (1 \text{ mole}/6.02 \times 10^{23} \text{ molecules})$

=  $3.08 \times 10^{-12} \text{ g} = \mathbf{3.08 \text{ picogrammi (pg)}}$

Poichè una cellula diploide contiene due copie di ciascun cromosoma

**Ciascuna cellula umana diploide contiene ~6 pg di DNA genomico**

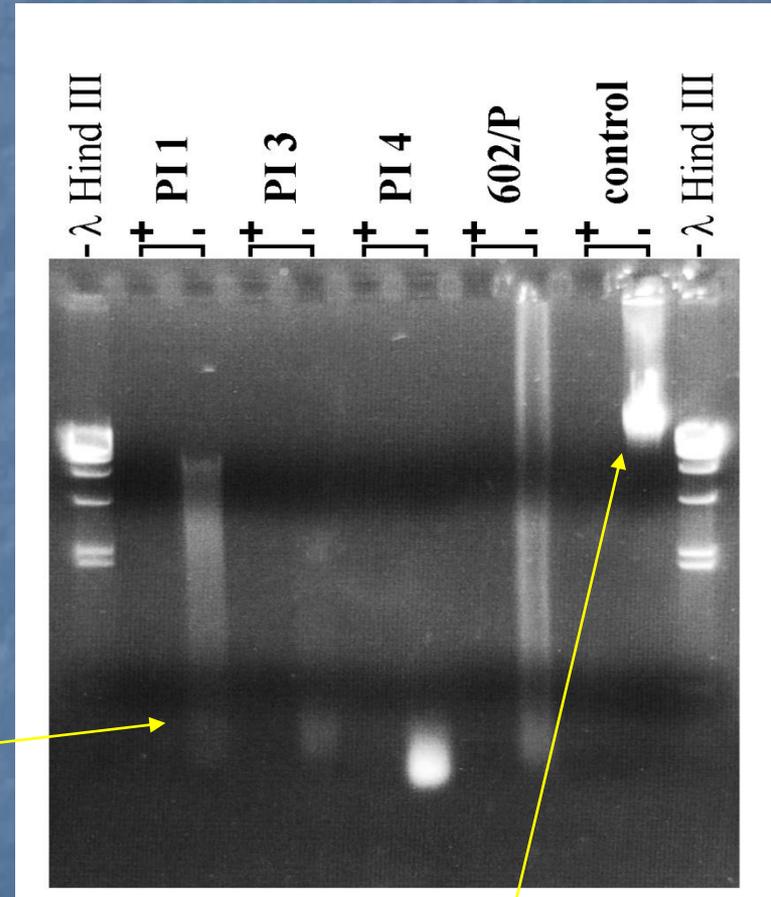
**$\therefore$  1 ng di DNA genomico (1000 pg) = ~333 copie di ciascun locus STR (2 per 167 genomi diploidi)**

## Metodo con agarosio

permette di valutare anche l'integrità del campione: non utilizzabile per campioni con poco DNA

- Elettroforesi in gel di agarosio di estratti da campioni forensi comparati con marcatori di peso molecolare noto

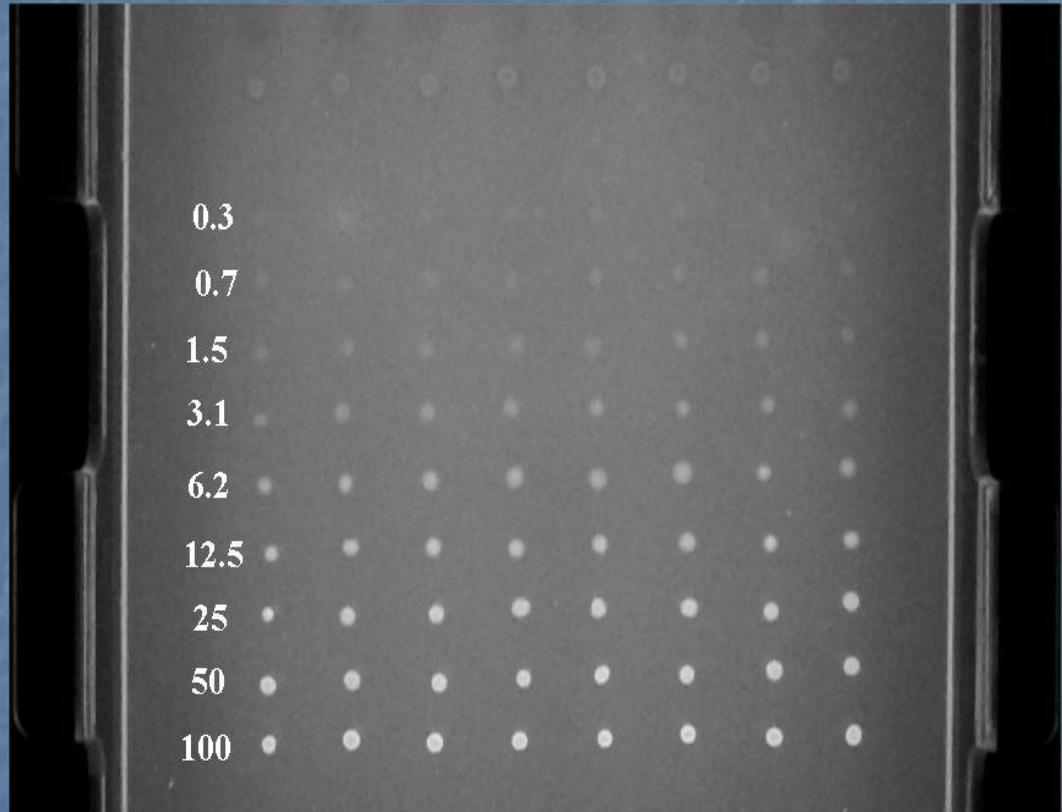
Gli *smear* indicano la frammentazione del DNA



DNA ad alto peso molecolare in unica banda

# Metodo degli spot in agarosio

- Buona regressione lineare solo nel range tra 50-12,5 ng
- I campioni vengono quantificati mediante comparazione con standard di DNA diluiti a varie concentrazioni



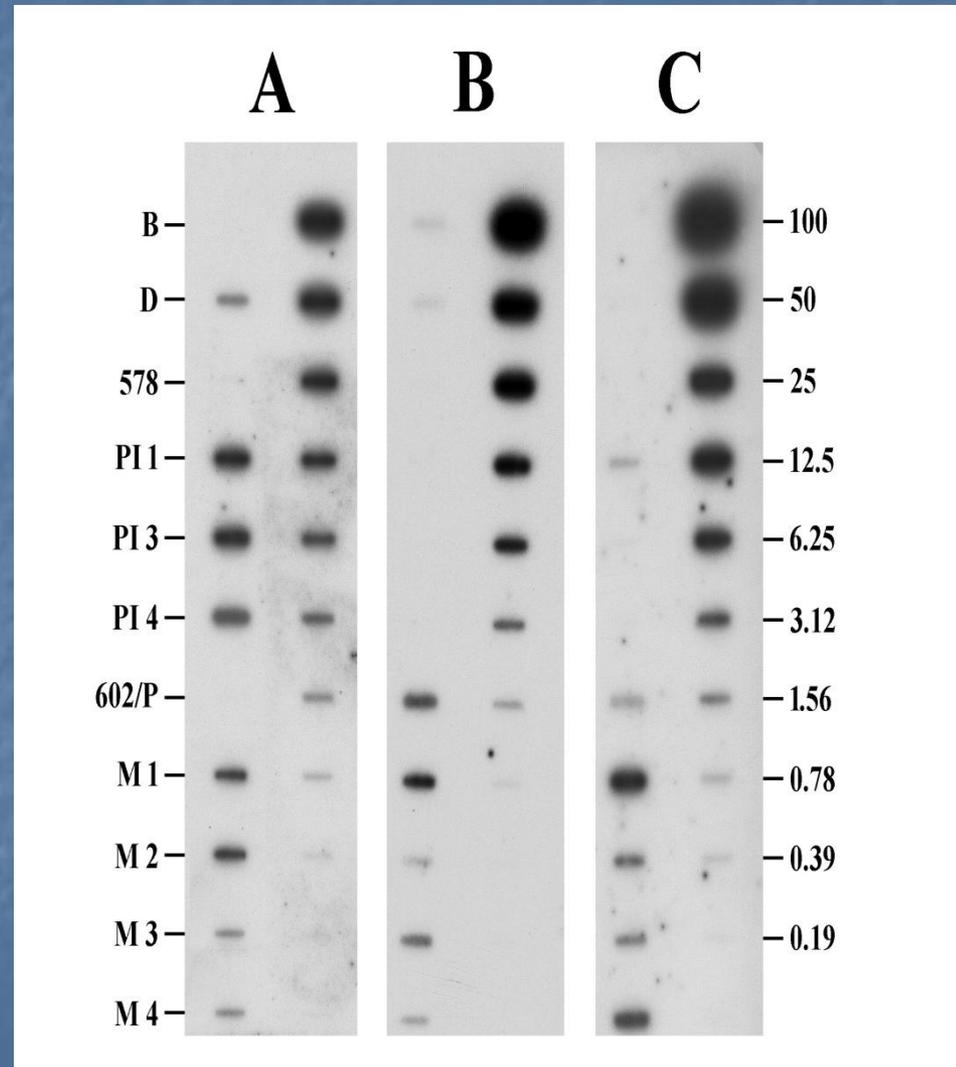
# Slot -Blot Hybridization

A. Sonda umana  
(262 bp Alu PCR fragment)

B. Sonda batterica  
(cDNA probe from *E. coli* 16S-  
23S rRNA)

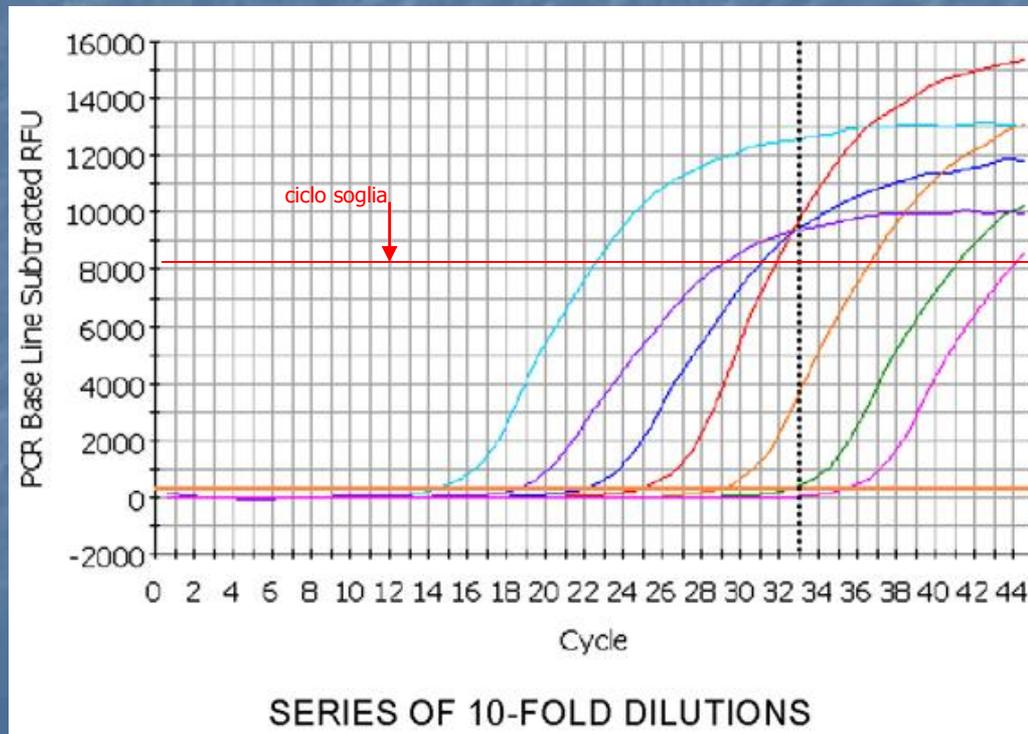
C. Sonda fungina  
(926 -bp PCR fragment  
18S rDNA *S. cerevisiae*)

Limite di sensibilità < 50 pg DNA



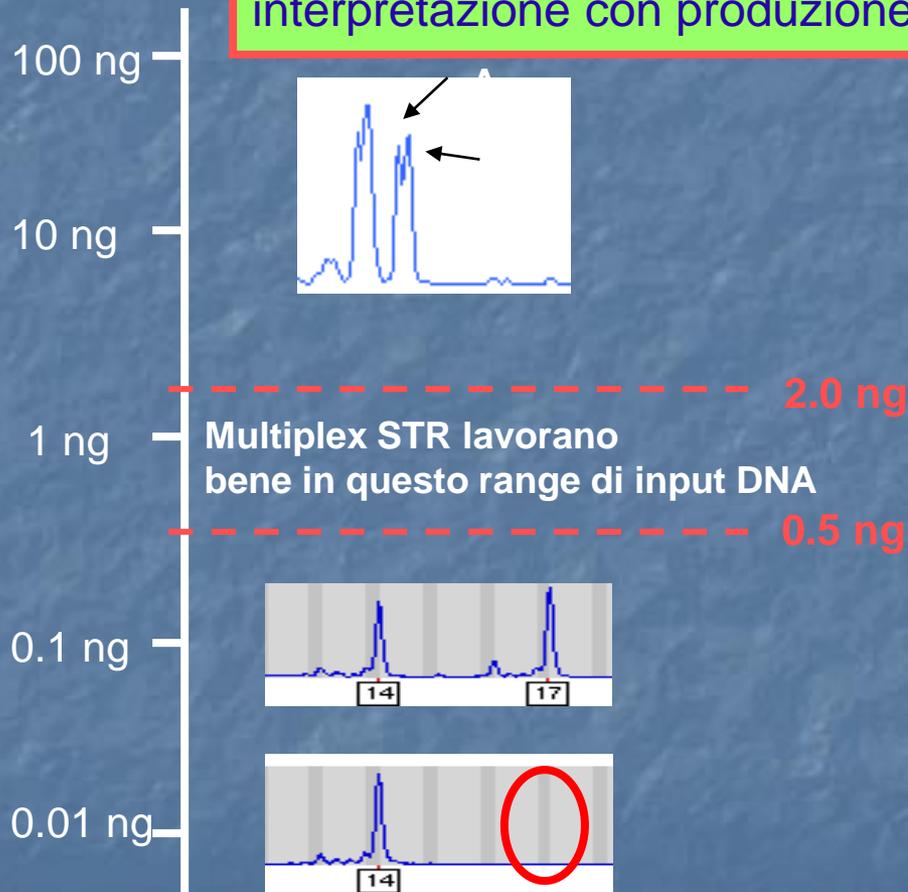
# Real Time PCR

- La quantificazione del DNA si basa sul numero di cicli richiesti per raggiungere un valore soglia  $C_t$ .
- Maggiore la quantità di templato DNA, prima si raggiunge il ciclo soglia.



# Importanza della quantificazione del DNA (prima di una multiplex PCR)

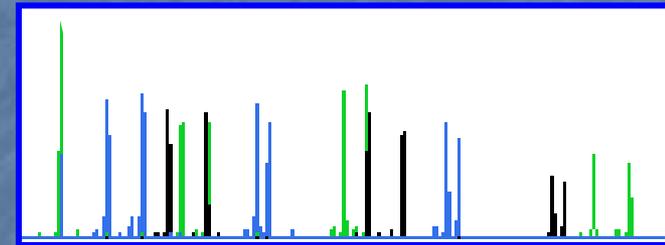
DNA (log scala)



Alti livelli di DNA creano problemi di interpretazione con produzione di artefatti

Troppo DNA

- Picchi fuori scala
- Picchi accessori (+/-A)
- Sbilanciamento tra loci

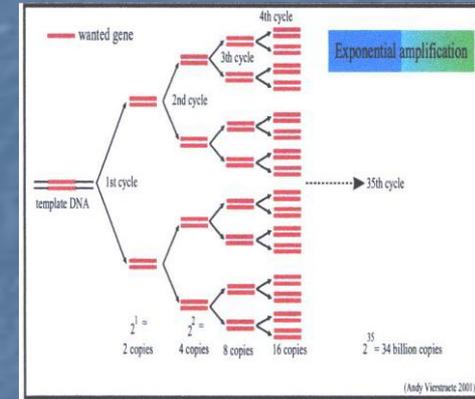
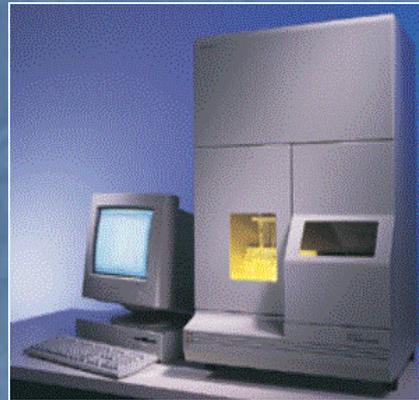
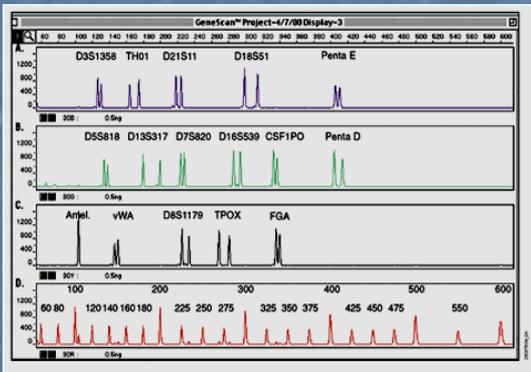
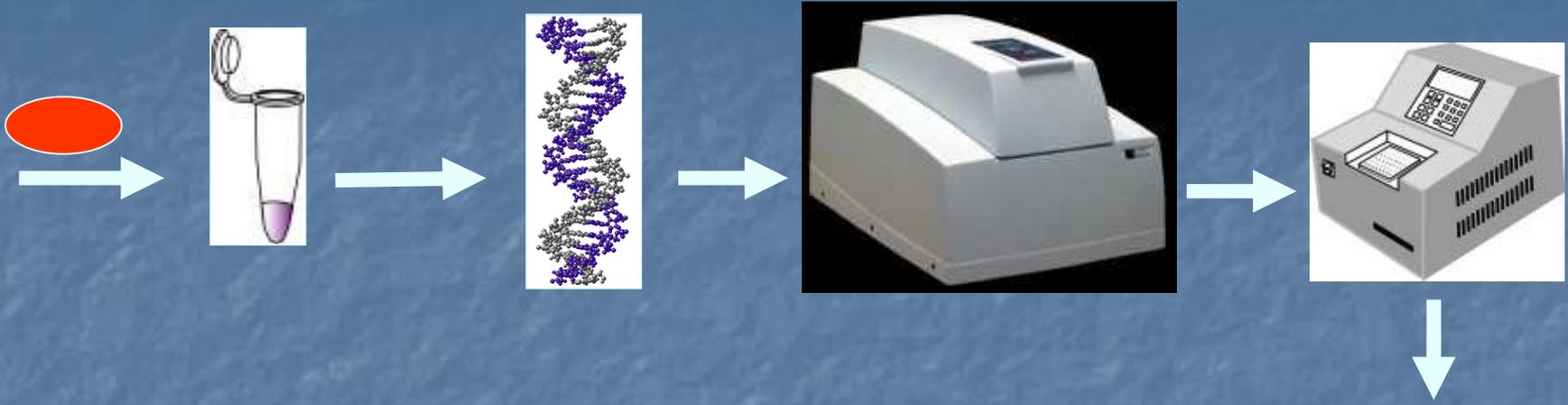


Troppo poco DNA

- Sbilanciamento degli eterozigoti
- Allele drop-out
- Sbilanciamento tra loci

L'effetto stocastico quando si amplificano bassi livelli di DNA produce allele dropout

# Tipizzazione del DNA con PCR



# PCR

- Vantaggi
  - possibilità di analizzare tracce molto ridotte;
  - si può usare DNA degradato;
  - contaminanti come funghi e batteri non si amplificheranno perchè i primer sono specifici per il DNA umano;
  - non necessità di sostanze radioattive;
  - tempi di analisi molto rapidi;
  - si possono analizzare contemporaneamente molti loci polimorfici ben caratterizzati;
  - disponibilità di kit commerciali.

# PCR

## ■ Svantaggi

- suscettibile di errori a causa di contaminazioni. Necessario accurato controllo di tutte le fasi pre e post PCR;
- numero di alleli più contenuto rispetto agli RFLP. Molti loci debbono essere usati per discriminare un individuo;
- l'amplificazione può fallire a causa di mutazioni nelle regioni di legame dei primer;
- il DNA bersaglio può non amplificare a causa di inibitori della PCR nel DNA estratto.

# Precauzioni per la conduzione della PCR nel laboratorio forense

- isolamento fisico - l'ambiente dove viene preparata la PCR deve essere diverso da quello dove sono presenti i termociclatori.
- la reazione di PCR dovrebbe essere allestita in una cappa sterile dedicata a questo uso: al termine della preparazione dovrebbe sempre seguire irradiazione con UV.
- pulizia degli ambienti - i banchi di lavoro dovrebbero essere periodicamente lavati con soluzioni di ipoclorito, che distrugge il DNA. Le aeree ove vengono maneggiati i DNA amplificati dovrebbero essere irradiate, al termine dell'attività, con luce UV.
- soluzioni sterili e reagenti - tutti i reagenti debbono essere sterili o autoclavati.
- uso dei guanti - l'impiego di guanti sterili e il loro cambio frequente riduce notevolmente il pericolo di contaminazione;
- uso di punte con filtro - la formazione di aerosol che contiene DNA amplificato, può portare a gravi inquinamenti. Utilizzare quindi punte con filtri, che trattengono queste pericolose fonti di inquinamento;
- aggiunta del DNA - dovrebbe essere addizionato alla miscela di reazione per ultimo e la provetta dovrebbe essere immediatamente richiusa;
- uso di controlli positivi e negativi di PCR -
- tipizzazione del personale - tutto il personale che opera per qualunque motivo nel laboratorio di genetica forense, dovrebbe essere tipizzato in modo da individuare immediatamente una eventuale fonte di contaminazione.

# I controlli della PCR

- Controllo negativo di estrazione – si tratta di un campione che ha seguito l'intero passaggio delle fasi di estrazione e contiene tutti i reattivi (buffer, proteinasi K, DTT, SDS, ecc.), ma non DNA;
- Controllo negativo di PCR – si tratta di un campione che contiene tutti i reagenti della PCR (dNTP, buffer, Mg<sup>+2</sup> ecc.), ma che contiene al posto del DNA acqua bidistillata;
- Controllo positivo di PCR – campione che contiene un DNA di cui è noto l'esatto profilo genetico per quei marcatori che si sta analizzando.

**TUTTI QUESTI CAMPIONI DEVONO ESSERE AMPLIFICATI IN PCR ED ANALIZZATI INSIEME AI CAMPIONI DA ESAMINARE**

# Elettroforesi su gel verticale od orizzontale di poliacrilamide denaturante

- Caricamento del campione, separazione e rivelazione possono essere automatizzati
- Separazioni avvengono in due-tre ore
- L'informazione è visualizzata in forma di bande e registrata per successive analisi ed archiviazioni.

# PowerPlex® 1.1

Fluorescein-labeled

TMR-labeled

505 nm scan

585 nm scan

D16S539

CSF1PO

D7S820

TPOX

Amelogenina

D13S317

TH01

D5S818

VWA

# PowerPlex® 2.1

505 nm scan

585 nm scan

Penta E

FGA

D18S51

TPOX

D21S11

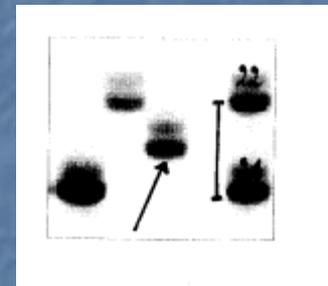
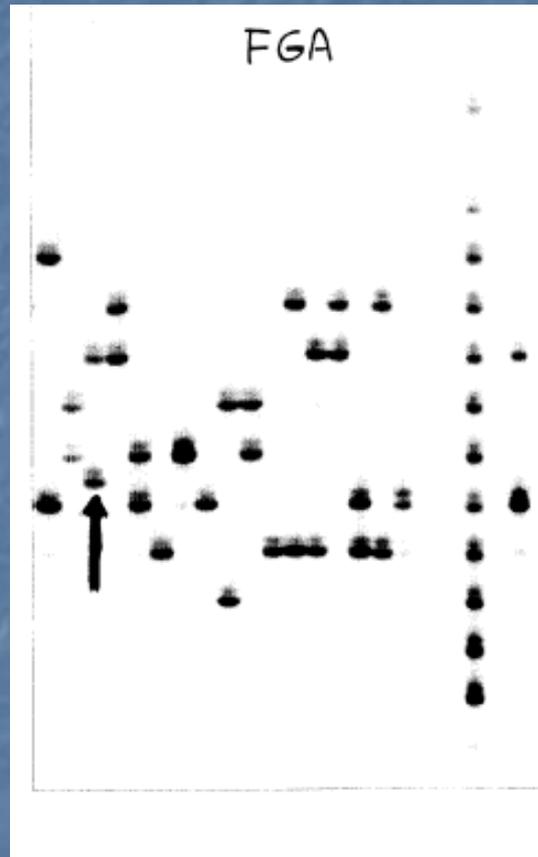
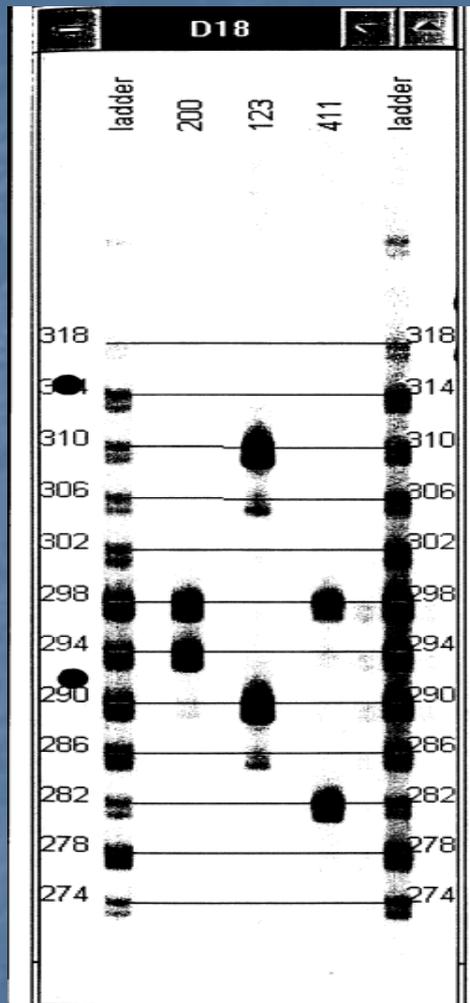
D8S1179

TH01

9.3/10

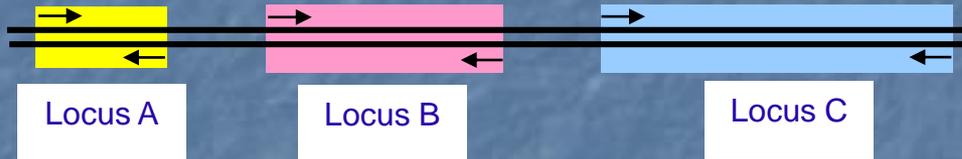
D3S1358

VWA

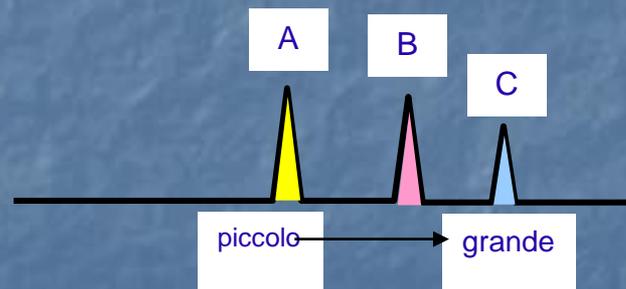


# Multiplex PCR

(A) Simultanea amplificazione di tre STR in un DNA templato

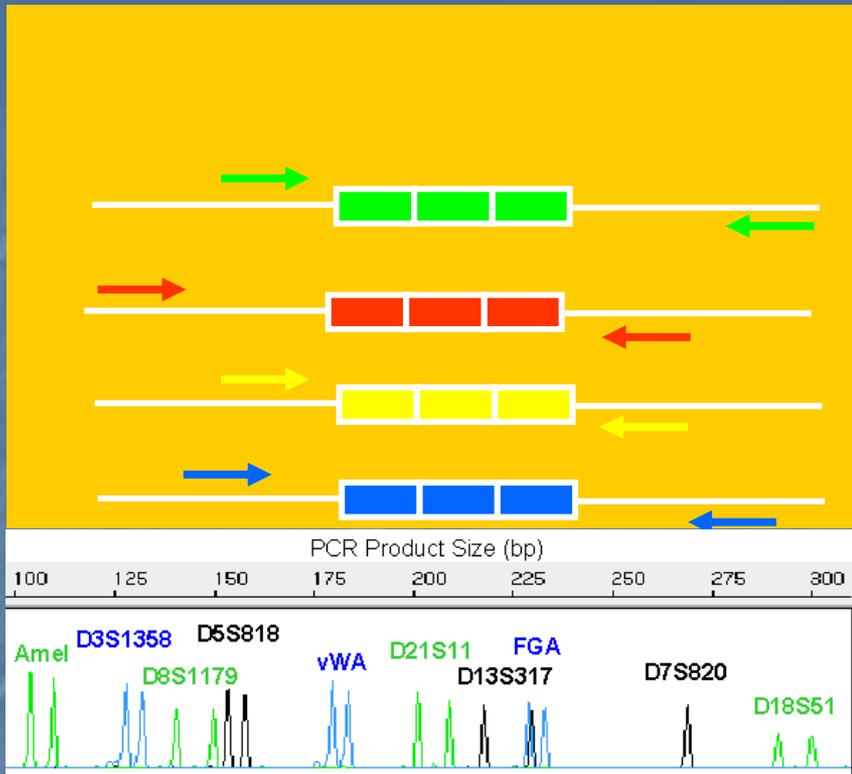


(B) Risoluzione dei prodotti di PCR con metodi di separazione basati sulle dimensioni



# Multiplex PCR

- Primer compatibili sono la chiave per realizzare una multiplex PCR
- STR kit sono disponibili in commercio
- 15 o più loci possono essere amplificati contemporaneamente

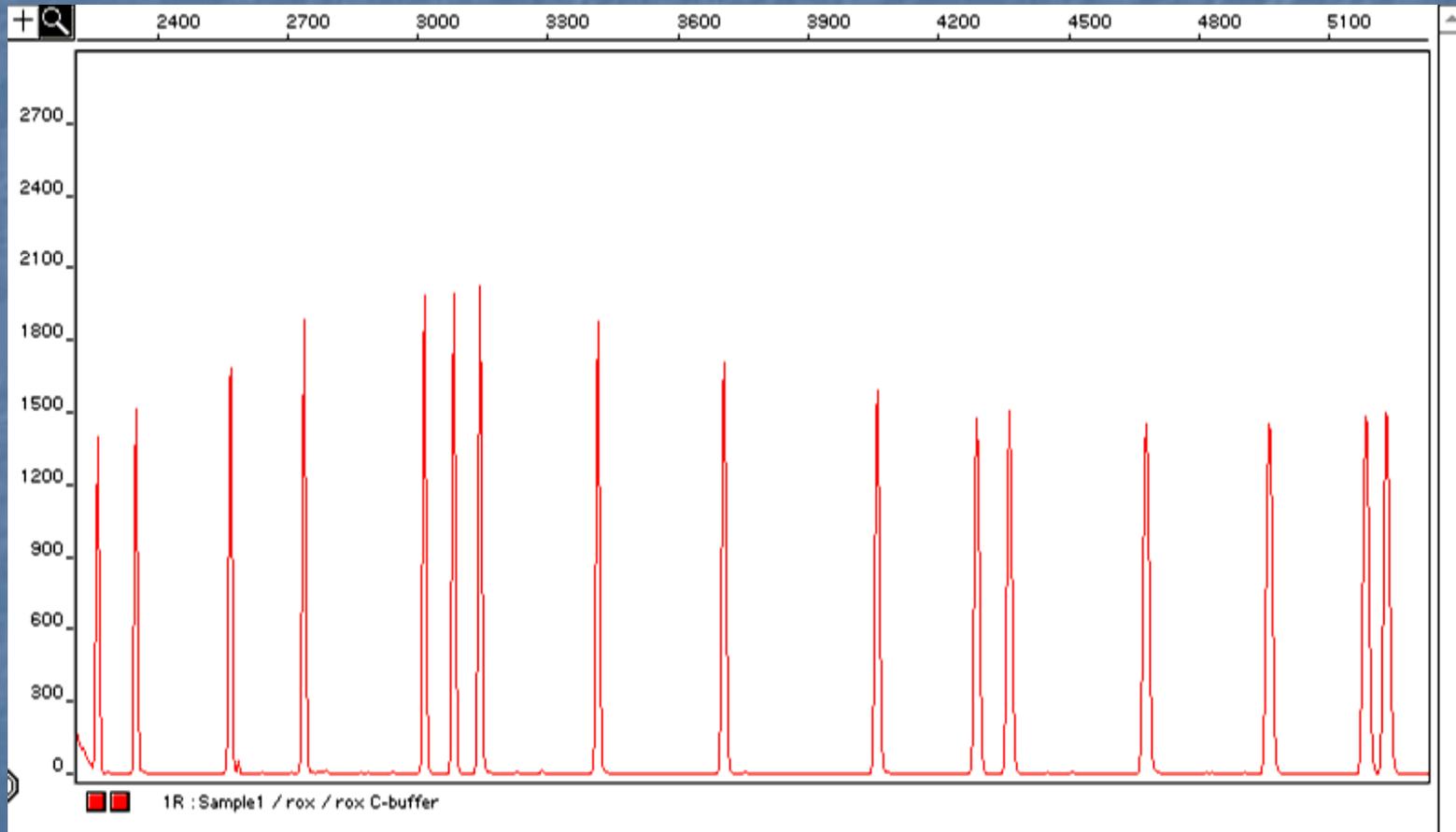


## Vantaggi di Multiplex PCR

- Aumento di informazioni ottenute nello stesso tempo (aumentato PD)
- Meno lavoro per ottenere un risultato
- Meno DNA template richiesto
- Maggiore controllo di eventuali contaminazioni

# Uso di ladder interni

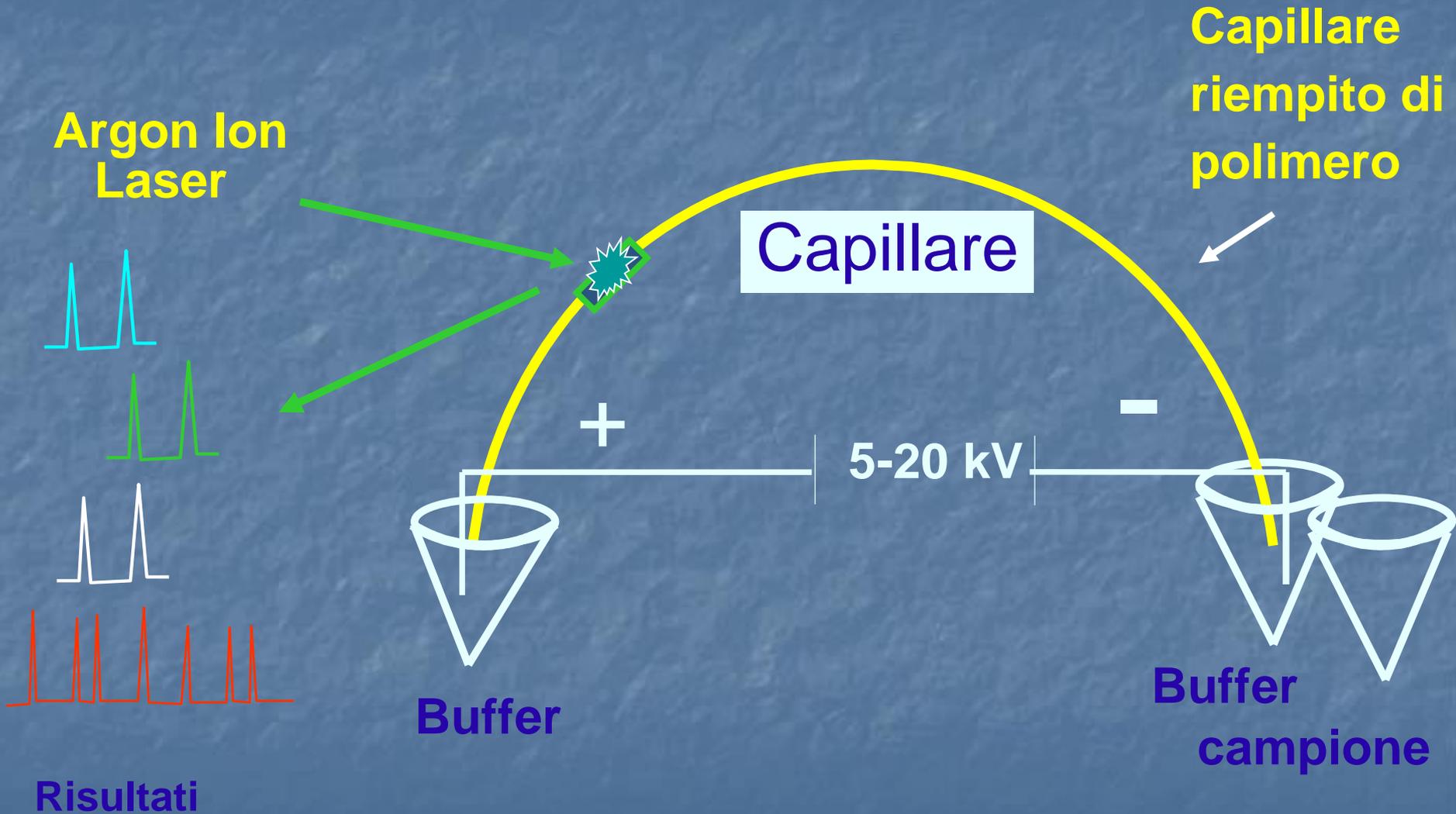
L'impiego di fluorocromi con diversa marcatura permette di far migrare l'amplificato di uno o più STR insieme ad uno standard di peso molecolare.



# Elettroforesi capillare

- Iniezione del campione, separazione e rivelazione sono automatizzati
- Separazioni rapide sono possibili, nel giro di 20-30 minuti
- L'informazione è visualizzata in forma di picchi e registrata per successive analisi ed archiviazioni.

# Elettroforesi capillare



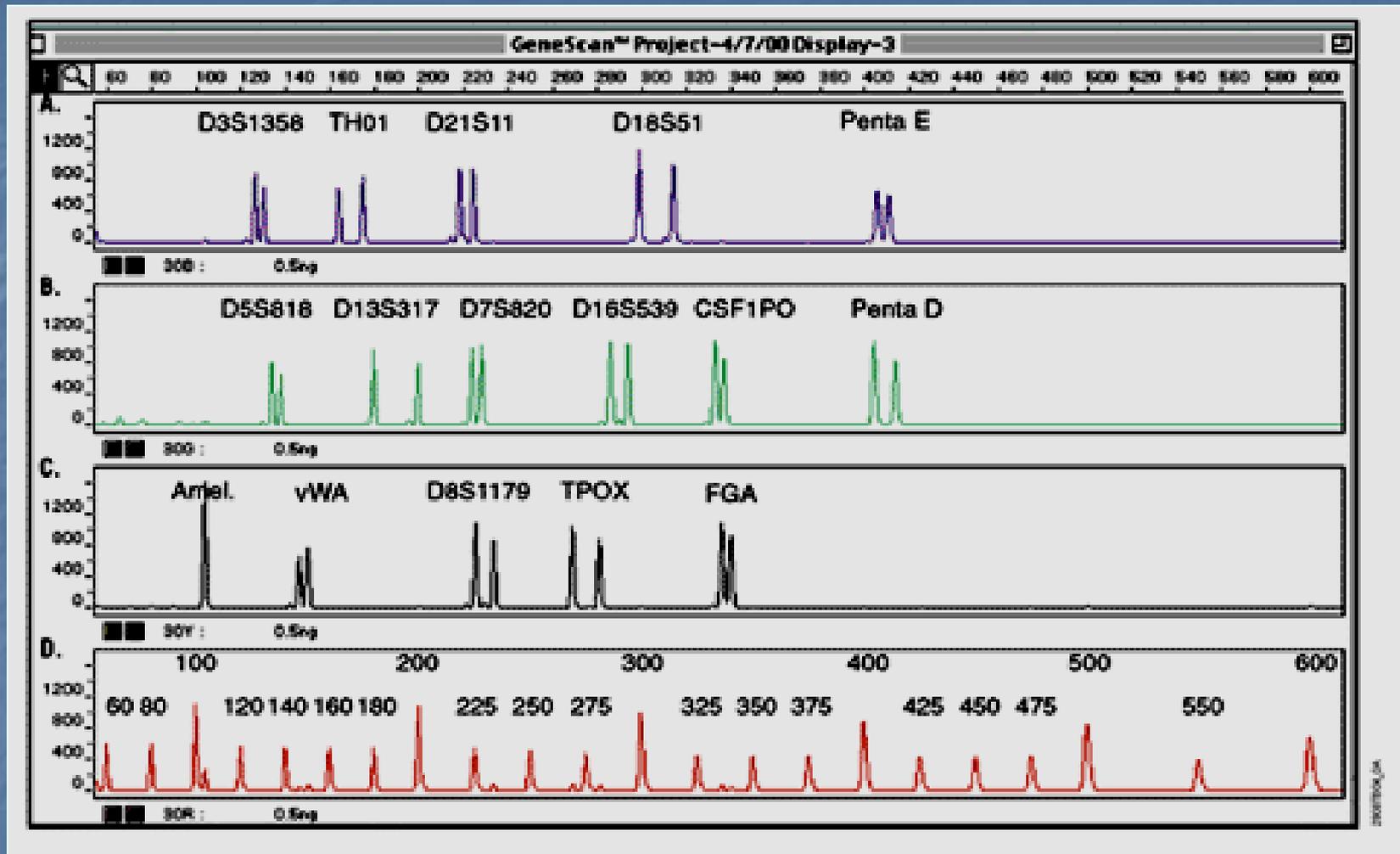
## La precisione è influenzata da:

- Conduzione della PCR
- Temperatura
- Migrazione dello standard vs campione
- Migrazione di un allele vs ladder
- Conformazione del DNA
- Stato del polimero
- Condizioni del capillare
- Concentrazione del buffer
- pH

# Stima delle dimensioni di un frammento di DNA con l'elettroforesi capillare

- Ciascun campione è corso insieme ad uno standard di peso molecolare
- Uno standard esterno è corso con lo stesso standard di peso molecolare
- La dimensione dell'allele sconosciuto è determinata per comparazione con una scala allelica di riferimento per quel sistema

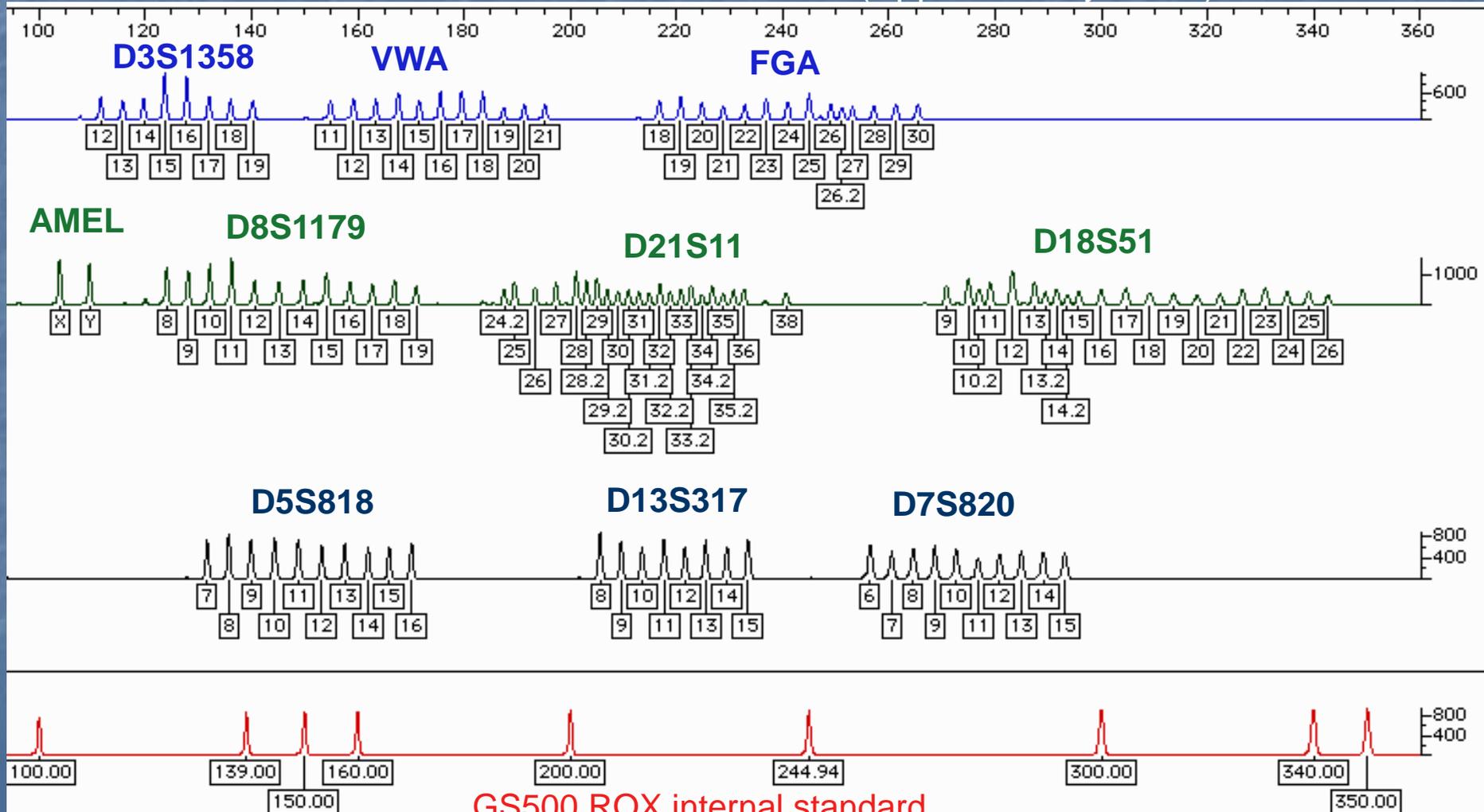
# Stabilire le dimensioni dei frammenti

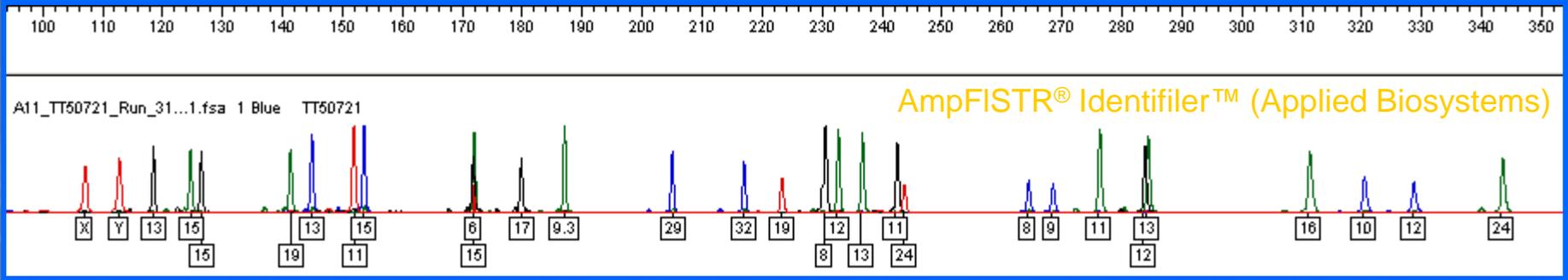


La corsa dello standard di peso molecolare stabilisce le dimensioni. Queste dimensioni sono comparate con una scala allelica.

# Scale alleliche vengono vendute nei Kit per consentire l'individuazione esatta dei genotipi

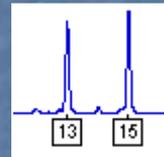
## Profiler Plus kit allelic ladders (Applied Biosystems)



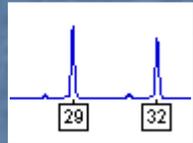


AmpFISTR® Identifiler™ (Applied Biosystems)

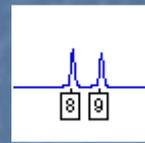
D8S1179



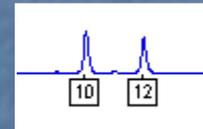
D21S11



D7S820



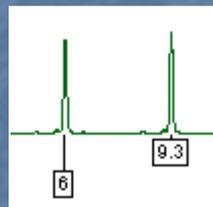
CSF1PO



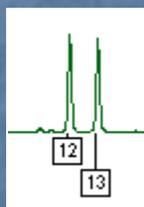
D3S1358



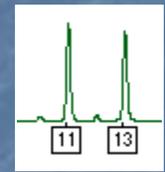
TH01



D13S317



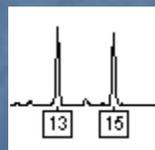
D16S539



D2S1338



D19S433



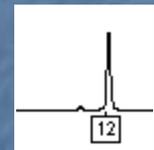
VWA



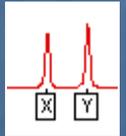
TPOX



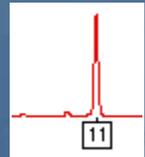
D18S51



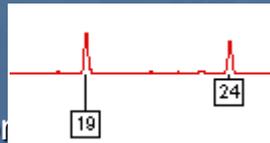
AMEL



D5S818



FGA



**1 analisi integrata  
contro 16 separate**

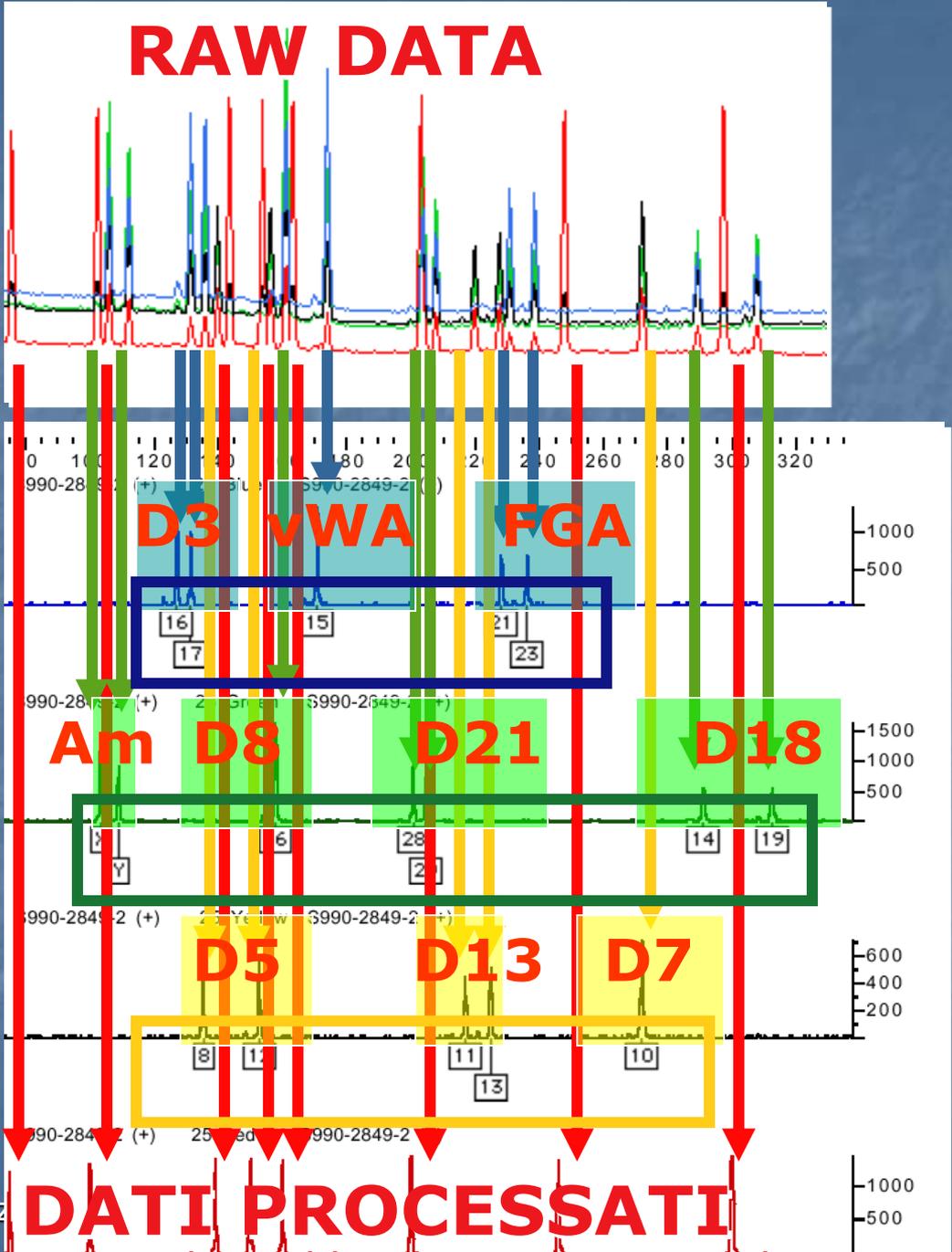
Un programma divide i dati grezzi nei rispettivi colori che corrispondono alla marcatura di ciascun polimorfismo:

- Blue
- Green
- Yellow
- Red

Un altro programma identifica i vari sistemi ed individua gli alleli di ogni STR in base alla dimensione. Il profilo di questo campione risulta:

- D3: 16, 17
- vWA: 15, 15
- FGA: 21,23
- Amelogenina: X, Y
- D8: 16, 16
- D21: 28, 29
- D18: 14, 19
- D5: 8, 12
- D13: 11, 13
- D7: 10 10

Scuola di Specializzazione



# **GENETICA FORENSE**

**Le indagini di paternità/maternità**

**Le indagini di criminalistica**

**La ricerca di persone scomparse**

**I database del DNA**

**Le analisi su DNA non umano**

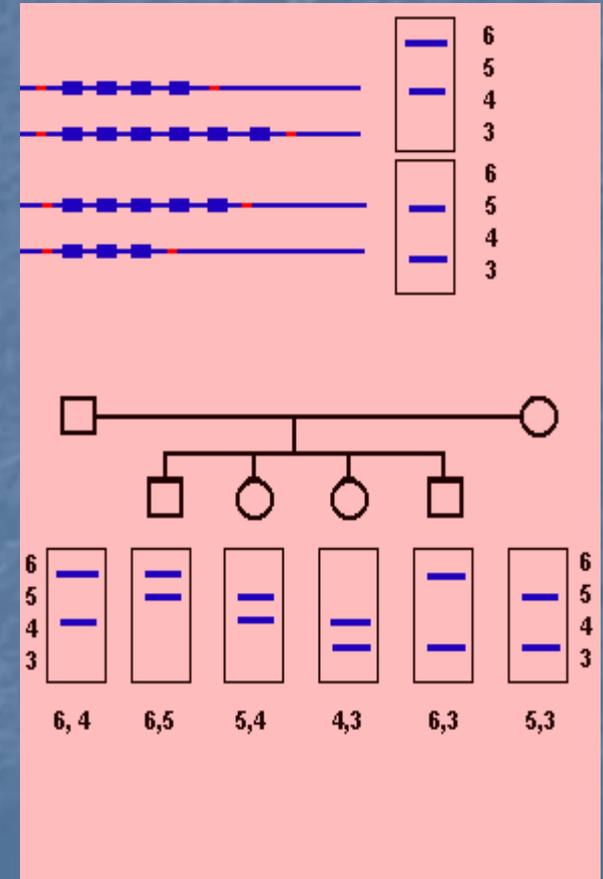
# INDAGINI DI PATERNITA'

## PRINCIPIO DEL METODO

Poiché ognuno di noi eredita metà corredo genetico dalla madre e metà dal padre, è possibile risalire all'esatto legame di filiazione dall'analisi del DNA.

I test di paternità si possono eseguire avendo a disposizione materiale biologico del figlio/a e del presunto padre, anche se defunto, oppure di soggetti ad esso correlati (*esami indiretti*).

La presenza della madre non è indispensabile, ma preferibile perché i *motherless* forniscono, in caso di compatibilità, risultati statisticamente meno probanti, a parità di marcatori esaminati.



# INDAGINI DI PATERNITA' A RICHIESTA DI PRIVATI

1. I coniugi si rivolgono all'analista per conoscere la realtà biologica sulla filiazione di un minore la cui condizione è di figlio legittimo, cioè contratto durante il matrimonio. Il test si può fare.
2. Uno solo dei coniugi desidera effettuare la prova del DNA. Si può eseguire se l'altro coniuge presta il consenso, pur non sottoponendosi agli esami.
3. Una persona diversa dai genitori (p. es. il possibile padre naturale di un bambino che porta il nome di un altro) desidera fare l'esame su un minore che è legalmente figlio di altre persone. In tal caso occorre il consenso di entrambi i genitori.
4. Un uomo desidera sapere se è padre naturale di un bambino che porta il cognome della madre. Il test si può eseguire solo se la madre presta il proprio consenso.
5. Una madre desidera sapere se il bambino che porta il suo nome è figlio di un uomo. E' necessario e sufficiente il consenso dell'uomo, anche se sposato con un'altra donna.
6. Un figlio maggiorenne desidera conoscere l'eventuale legame di filiazione con un uomo. E' sufficiente il consenso informato di quest'ultimo, anche in presenza del padre legittimo che non può eccepire alcunchè.

# I risultati possibili nelle indagini di paternità

## La compatibilità genetica

- Quando il padre presunto presenta almeno un carattere genetico identico al figlio/a, una volta sottratto da questo il carattere genetico di necessaria origine materna.

Sistema	Padre presunto	Figlio	Madre
D8S1179	11, <b>12</b>	*12, 13	13, 14

## La incompatibilità genetica

- Quando il padre presunto non possiede nel proprio genotipo alcun allele a comune con il figlio/a.

Sistema	Padre presunto	Figlio	Madre
D8S1179	10, 11	*12, 13	13, 14

\* Allele di necessaria provenienza paterna

# I gemelli identici

## Fratelli gemelli litigano per la paternita'

**martedì, maggio 22, 2007**

In America da 4 anni è in corso una **battaglia giudiziaria veramente insolita**: 2 fratelli gemelli monozigoti, Raymon and Richard Miller, si stanno contendendo la **non-paternità** di un bambino.

Entrambi gli uomini avevano in corso una relazione con la signora Holly Marie Adams, ed tutti e due avevano avuto un rapporto sessuale con lei a distanza di poche ore l'uno dall'altro, quando **la signora scoprì di essere**

**incinta**. Dopo nove mesi, la Adams dichiarò Raymon essere il padre, ma quest'ultimo **contestò la decisione** chiamando in causa suo fratello. Fu deciso quindi di fare un **test del DNA**, che ovviamente dette lo stesso risultato per entrambi: **99,9% di probabilità di essere il vero padre** del bambino.

Risultato? Nessuno dei due fratelli vuole pagare gli alimenti, ma la corte ha deciso che in caso di parità del test del DNA, Raymon, in quanto "nominato" dalla signora, rimarrà il padre.

Raymon ha quindi deciso di appellarsi alla corte federale per far valere le proprie ragioni.



# La verifica delle ipotesi rilevanti: l'indice di paternità

Il metodo più usato per pesare la prova riguardo ad una paternità consiste nel mettere in rapporto la frequenza con cui il padre presunto può produrre uno spermio recante l'appropriato allele di origine paterna e la frequenza con cui uno spermio recante il medesimo allele può essere prodotto da un uomo preso a caso.

$$PI = \frac{X}{Y}$$

Dove

X = probabilità che ha il padre presunto di trasmettere l'allele presente nel figlio

Y = probabilità che ha un uomo sconosciuto di trasmettere l'allele presente nel figlio

# Il giudizio

## DALLE INCOMPATIBILITA' ALL'ESCLUSIONE DI PATERNITA'

Le esclusioni devono essere confermate almeno per tre marcatori genetici.

L'esclusione è un dato certo, al netto di errori di laboratorio (p.es. scambio di campioni prima o dopo l'analisi, errori nella classificazione ecc.). L'errore si può stimare nell'effettiva occorrenza di tre eventi di mutazioni, nell'ordine di  $< 10^{-9}$ .

## DALLE COMPATIBILITA' ALL'ATTRIBUZIONE DI PATERNITA'

In Italia non vi è un limite di legge superato il quale un test di paternità che dimostri compatibilità possa affermare automaticamente l'attribuzione. Una Raccomandazione GeFI indica di presentare la notazione in termine numerico, senza espressione percentuale, per non enfatizzare il risultato di laboratorio.

Legislazione della Germania ( $>0,9972$ )

Legislazione dei Paesi Bassi ( $>0,9990$ )

# Le mutazioni germinali

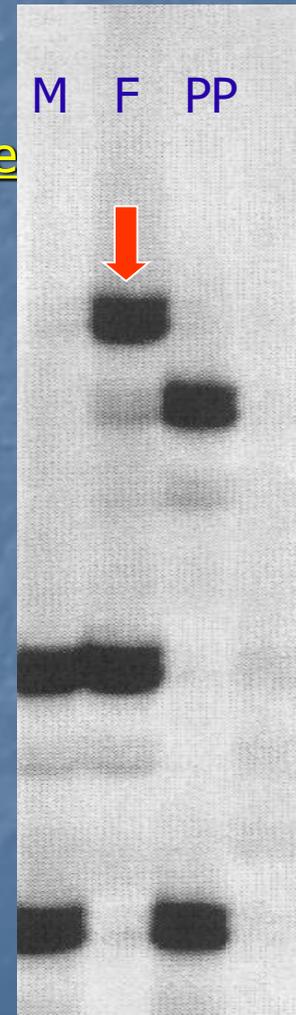
Eventi relativamente frequenti negli STR ( $\sim 1,8 \times 10^{-3}$ )

Variazioni in genere di un repeat per espansioni o contrazioni che producono incompatibilità genetiche. Queste devono essere trattate come basse probabilità di paternità.

Si richiede di analizzare un numero addizionale di polimorfismi ( $>20$ ); se tutti dimostrano compatibilità e se l'incompatibilità osservata è *single-step*, allora si tratta verosimilmente di una mutazione vera.

In letteratura sono descritti casi di doppie e anche triple mutazioni in un singolo test di paternità.

Si tratta probabilmente di vere ESCLUSIONI e l'alto valore di compatibilità osservata è dovuta all'aver esaminato un padre presunto correlato con il padre vero.

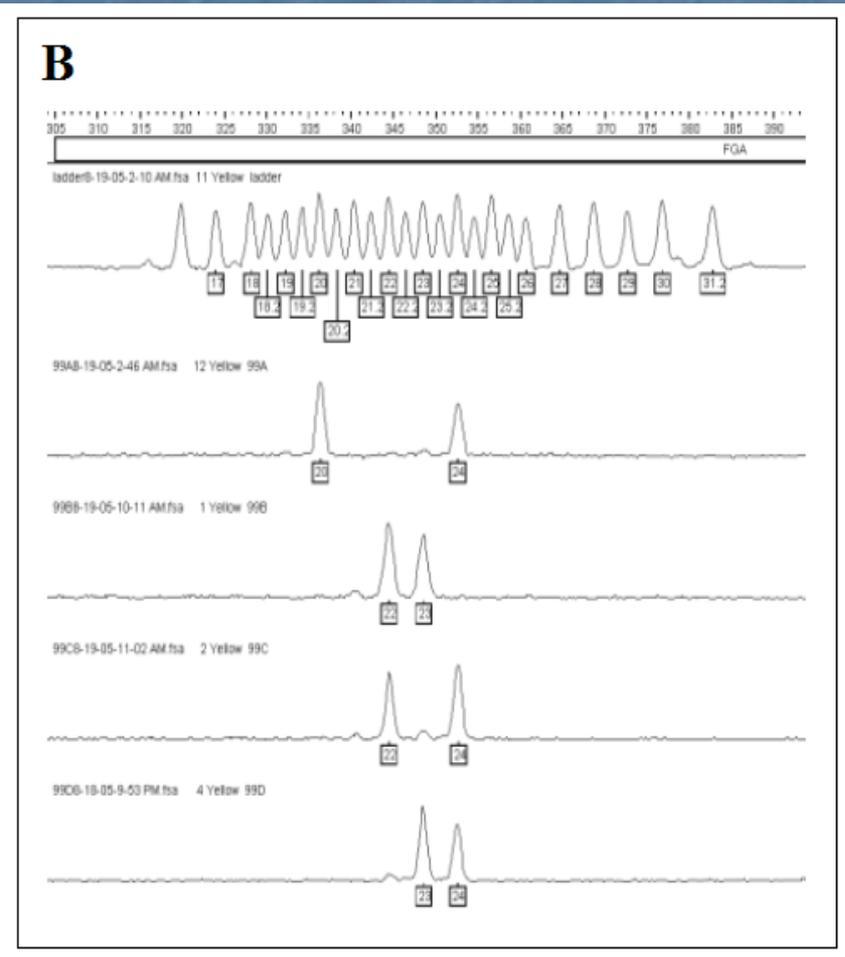
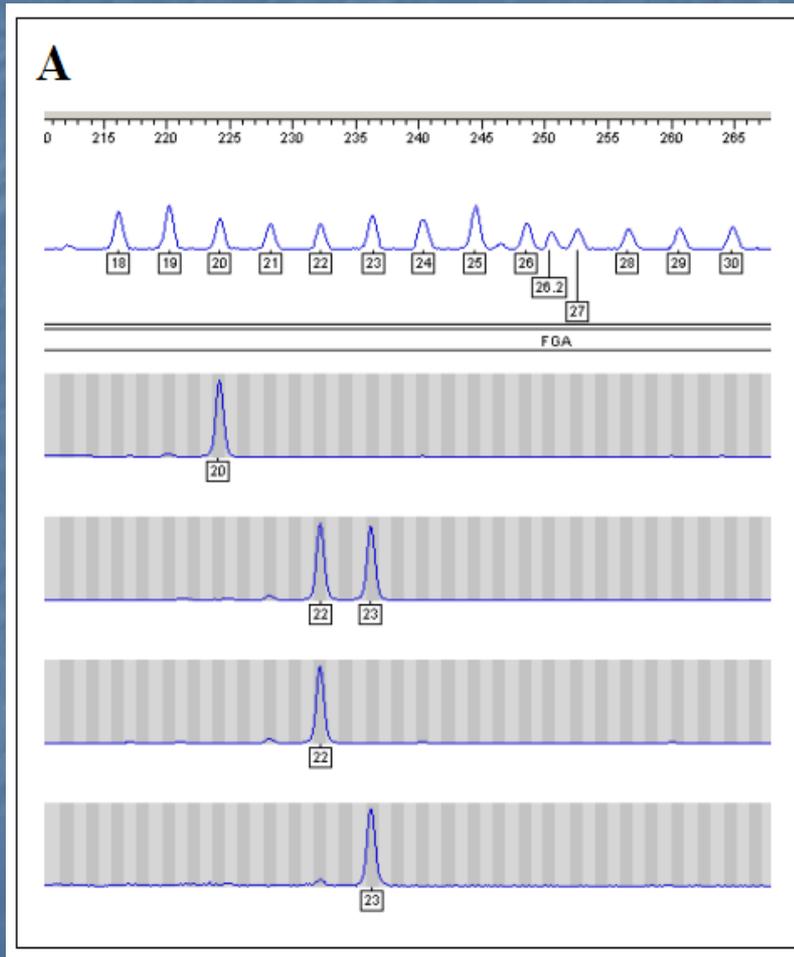


# Un caso vero

## A Single Mutation in the FGA Locus Responsible for False Homozygosities and Discrepancies between Commercial Kits in an Unusual Paternity Test Case

System	Alleged father	Mother	Son	Daughter
TPOX	9, 11	8	8, 11	8, 11
D3S1358	14, 17	14, 17	14	17
FGA	20, 24	22, 23	22, 24	23, 24
CSF1PO	10, 12	10, 12	10, 12	10, 12
D5S818	11, 13	11, 12	11, 12	11
D7S820	7, 8	10, 12	7, 12	7, 12
D8S1179	10, 15	11, 13	10, 11	10, 11
TH01	6	9, 9.3	6, 9	<b>9</b>
VWA	16, 17	14, 16	16	16, 17
D13S317	9, 11	12, 13	11, 12	11, 13
D16S539	8, 12	12	8, 12	8, 11
D21S11	29, 31.2	29, 30	29, 30	29, 31.2
D18S51	13, 14	13, 16	13	16, <b>18</b>
D2S1538	19, 23	22, 25	19, 22	19, 25
D19S433	14, 15.2	16, 17	15.2, 17	14, 16
Penta D	8, 12	10, 13	10, 12	10, 12
Penta E	14, 15	10, 11	10, 14	11, 15
SE33	18, 19	18, 26.2	18, 19	18, <b>24.2</b>
F13B	8, 10	9, 10	9, 10	10
Paternity index	-	-	$2,6 \times 10^{-10}$	-

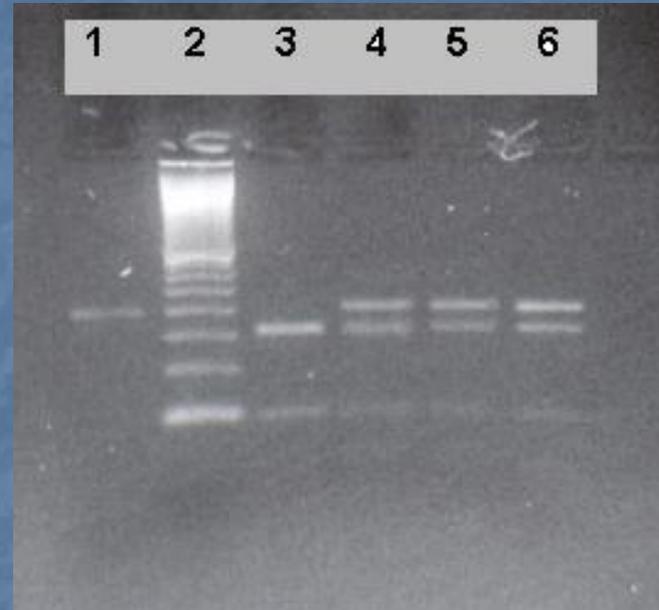
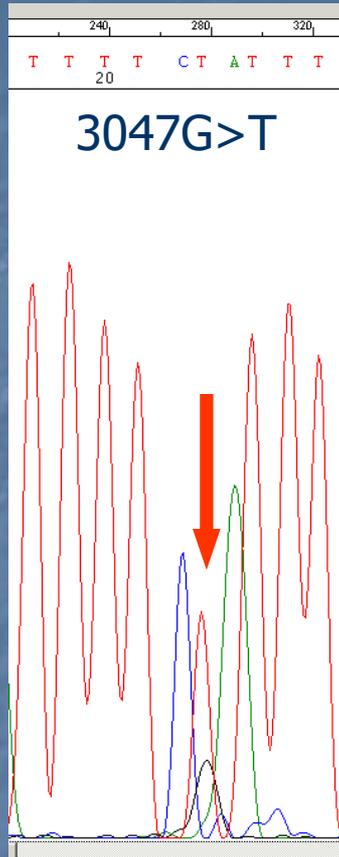
# Un caso vero



# Un caso vero

2701	acacctttaa tgtggaaatt	aattccaaag ttaaggtttc	aaagttcttc tttcaagaag	ttctatattt aagatataaa	<b>ctttgggatt</b> gaaaccctaa	<b>actaattgct</b> tgattaacga
2761	attaggacat taatcctgta	cttaactggc gaattgaccg	attcatggaa taagtacctt	<u>ggctgcaggg</u> ccgacgtccc	<u>cataacatta</u> gtattgtaat	tccaaaagtc aggttttcag
2821	aatgccccca tttacggggt	taggttttga atccaaaact	actcacagat tgagtgtcta	taaactgtaa at ttgacatt	<u>ccaaaaataaa</u> ggtttttattt	<u>attaggcata</u> taatccgtat
2881	tttacaagct aatgttcga	agtttctttc tcaaagaaa	tttctttttt aaagaaaaaa	ctctttcttt gagaaagaaa	ctttctttct gaaagaaaga	ttctttcttt aagaaagaaa
2941	ctttctttct gaaagaaaga	ttctttcttt aagaaagaaa	ctttctcctt gaaagaggaa	ccttcctttc ggaaggaaag	ttcctttctt aaggaaagaa	ttttgctggc aaaacgaccg
3001	aattacagac <u>ttaatgtctg</u>	aaatcactca <u>tttagtgagt</u>	gcagctactt <u>cgtcgatgaa</u>	caataaccat gttattggta	at tttc <b>G</b> att taaaag <b>C</b> taa	tcagaccgtg agtctggcac
3061	ataataccta tattatggat	caaccgagtg gttggctcac	tcagaggatc agtctcctag	tgagaagcag actcttcgct	aattgaagtc ttaacttc <u>ag</u>	ctgaagcgca <u>gacttcgagt</u>
3121	aagtcataga <u>ttcagtatct</u>	aaaagtacag <u>ttttcatgtc</u>	catatccagc gtataggtcg	ttctgcagaa aagacgtctt	aaatgttaga tttacaatct	cctcagttgg cgagtcaacc

# Un caso vero



1 – M prima del taglio

2 – 100 bp

3 – M dopo il taglio

4 – PP dopo il taglio

5 – F1 dopo il taglio

6 – F2 dopo il taglio

↓  
Sito TCGA con TaqI

# INDAGINI DI MATERNITA'

## PRINCIPIO DEL METODO

Poiché ognuno di noi eredita metà corredo genetico dalla madre e metà dal padre, è possibile risalire all'esatto legame di filiazione dall'analisi del DNA.

I test di maternità si possono eseguire avendo a disposizione materiale biologico del figlio/a e della presunta madre, anche se defunta, oppure di soggetti ad essa correlati (*esami indiretti*).

Oltre allo studio del DNA autosomico viene eseguito l'esame del DNA mitocondriale, che deve risultare identico in caso di maternità biologica.

# GENETICA FORENSE

**Le indagini di paternità/maternità**

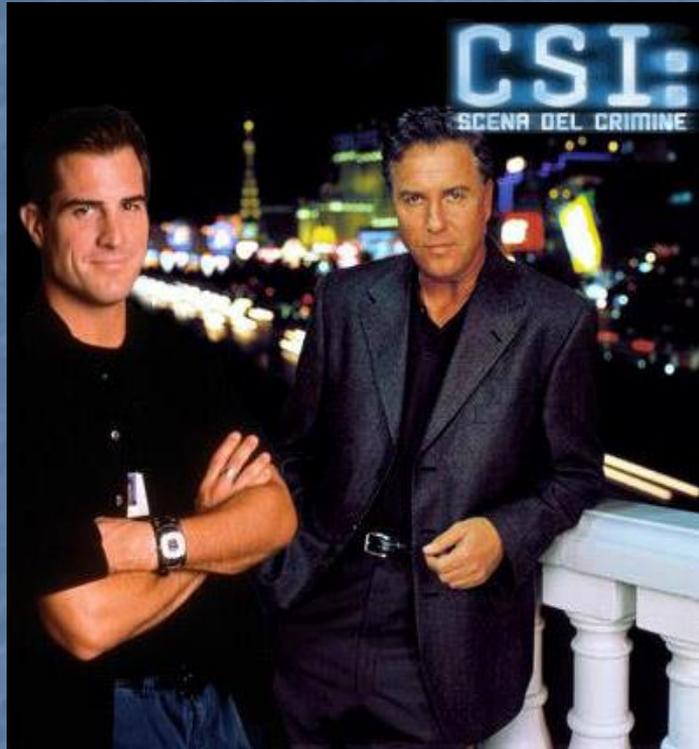
**Le indagini di criminalistica**

**La ricerca di persone scomparse**

**I database del DNA**

**Le analisi su DNA non umano**

# GENETICA FORENSE ED ANALISI DEL CRIMINE



# Analisi biologica

**diagnosi generica**

**identifica la natura del campione**

**diagnosi di specie**

**identifica la specie animale di appartenenza**

**diagnosi individuale**

**individua il soggetto da cui il campione biologico deriva**

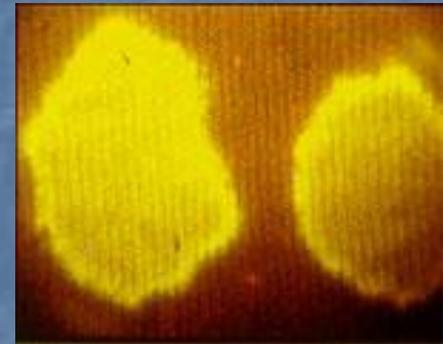
# Diagnosi generica – i test di orientamento

---

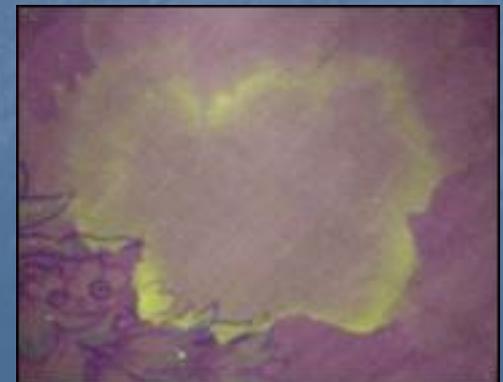
## Illuminatori a diverse $\lambda$



## Saliva



## Sperma



# Diagnosi generica – i test di orientamento

---

Suggeriscono la presenza di un certo tipo di campione biologico

**Test al luminol per sostanza ematica**



**Falsi positivi**

**Detergenti**

**Tensioattivi**

**Vernici**

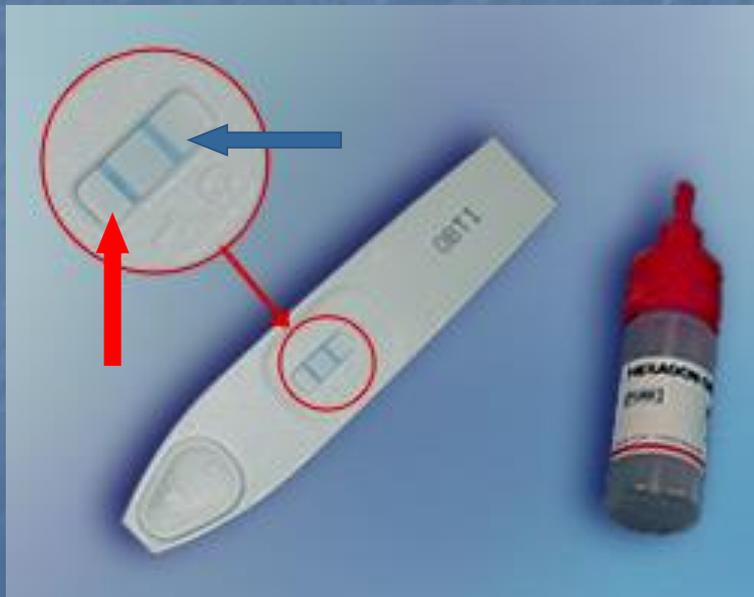
**Succhi di frutta**

# Diagnosi generica – i test di certezza

---

La diagnosi di natura deve sempre essere confermata con un'analisi di conferma con metodi specifici per una certa sostanza.

## Test OBTI per sostanza ematica



**Falsi positivi**

**Emoglobina di altri primati**

# diagnosi di specie

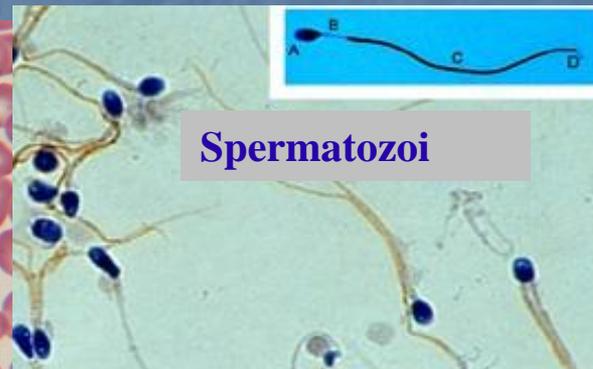
Una volta stabilita la natura biologica del materiale repertato è indispensabile stabilire a quale **specie animale** appartenga.

- . metodi morfologici
- . metodi immunologici

## METODI MORFOLOGICI

Consistono nell'identificare quegli elementi caratteristici che consentono di differenziare le varie specie tra loro.

Ad esempio, se il materiale in esame è ematico, una prima differenza può essere fatta tra eritrociti dei mammiferi, nucleati e quelli dei vertebrati, enucleati.



# diagnosi individuale

## INDAGINI DI IDENTIFICAZIONE PERSONALE PRINCIPIO DEL METODO

Poiché ognuno di noi è costituito da un insieme di cellule che contengono lo stesso DNA, almeno potenzialmente è possibile stabilire l'appartenenza di un campione biologico ad un soggetto confrontando i profili genetici di un campione-prova con quello di un sospettato.

Sono comparabili tra loro profili autosomici, del cromosoma Y, del cromosoma X e del DNA mitocondriale.

La capacità probatoria di questi sistemi è molto diversa, allo scopo di formulare giudizi di attribuzione; più elevata per formulare giudizi di esclusione.

# I risultati possibili nelle indagini di identificazione personale

## La compatibilità genetica

- Quando il profilo genetico del campione-prova risulta identico a quello del sospettato, per tutti i polimorfismi esaminati.

Campione	D8S1179	TPOX	TH01	CSF1P0
Traccia	11, 12	8, 8	6, 9	10, 10
sospetto	11, 12	8, 8	6, 9	10, 10

## La incompatibilità genetica

- Quando il profilo genetico del campione-prova risulta diverso a quello del sospettato, per uno o più marcatori genetici.

Campione	D8S1179*	TPOX	TH01	CSF1P0*
Traccia	11, 12	8, 8	6, 9	10, 10
sospetto	11, 11	8, 8	6, 9	9, 10

\* Loci incompatibili tra traccia e sospetto

# Le mutazioni somatiche

Eventi estremamente rari avvengono durante lo sviluppo embriogenico, cosicchè due tipi cellulari con differente genotipo possono coesistere e dare un pattern a tre loci.

Non vi sono casi descritti di identificazione personale con mutazioni somatiche nei loci STR comunemente usati nella pratica forense, per i quali vi siano state differenze tra il campione-prova e quello di riferimento.

Variazioni per mutazioni che producono incompatibilità genetiche nel confronto tra due campioni.

Nell'esame del DNA mitocondriale esistono casi di eteroplasmia per cui reperti provenienti da un medesimo soggetto possono avere profili genetici diversi. Per esempio nell'esame di formazioni pilifere sono stati osservati gradi di eteroplasmia in uno stesso fusto.

# Un terzo possibile risultato

- Sia nei test di paternità/maternità che nell'identificazione di tracce esiste la possibilità che il test del DNA non supporti un risultato accettabile.
- Ciò può avvenire per un numero di motivi diversi (scarsità del materiale, contaminazione, inibizione ineliminabile, profili misti troppo complessi ecc.).
- Questo tipo di risultato viene definito:  
**Inconclusivo** – I dati acquisiti dall'esame genetico non forniscono sufficienti evidenze per supportare alcun risultato. Questo risultato potrebbe p.es. emergere se due analisti restano in disaccordo dopo aver esaminato i profili genetici acquisiti da un'analisi, oppure se viene stabilito che il livello di contaminazione dei campioni è superiore ad una certa soglia.

# TRE METODI PER VALUTARE L'EVIDENZA SCIENTIFICA PER L'IDENTIFICAZIONE DI TRACCE

- . Approccio intuitivo: basato sulla rarità di un carattere o di un profilo genetico;
- . Approccio comparativo: basato sulla valutazione di ipotesi contrapposte;
- . Approccio probabilistico: basato sulla legge di Bayes.

# Approccio intuitivo

Con l'esame del DNA viene determinato il profilo genetico della traccia.

Valutazione del profilo genetico. Possiamo sapere se si tratta del sangue di un uomo o di una donna!

La traccia viene poi comparata con quelle della vittima, degli eventuali testimoni, degli inquirenti.

N°	Amelog.	D3S1358	vWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	CSF1PO	TH01	TPOX
traccia	X-Y	15-16	18-20	21-23	10-10	30-31	11-11	9-10	7-10	8-11
vittima	X-Y	14-15	16-17	19-20	8-9	28-28	9-10	9-9	8-9	6-6
sospetto	X-Y	15-16	18-20	21-23	10-10	30-31	11-11	9-10	7-10	8-11
testimone	X-Y	14-17	16-17	19-20	8-11	29-29	11-11	11-12	6-7	6-11
inquirente	X-X	15-18	15-16	24-25	11-12	29-32	12-13	12-13	9-11	6-11

# Approccio intuitivo

Se non vi sono errori nella tipizzazione, se quindi possiamo essere certi del risultato analitico ed escludere errori nella repertazione, nel campionamento, nell'etichettatura, nelle performance del laboratorio, i profili possono fornire dei risultati concreti:

Incompatibilità → giudizio di esclusione

N°	Amelog.	D3S1358	vWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	CSF1PO	TH01	TPOX
<b>traccia</b>	X-Y	15-16	18-20	21-23	10-10	30-31	11-11	9-10	7-10	8-11
<b>vittima</b>	X-Y	14-15	16-17	19-20	8-9	28-28	9-10	9-9	8-9	6-6
<b>sospetto</b>	X-Y	15-16	18-20	21-23	10-10	30-31	11-11	9-10	7-10	8-11
<b>testimone</b>	X-Y	14-17	16-17	19-20	8-11	29-29	11-11	11-12	6-7	6-11
<b>inquirente</b>	X-X	15-18	15-16	24-25	11-12	29-32	12-13	12-13	9-11	6-11

## Approccio intuitivo

N°	Amelog.	D3S1358	vWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	CSF1PO	TH01	TPOX
<b>traccia</b>	X-Y	15-16	18-20	21-23	10-10	30-31	11-11	9-10	7-10	8-11
<b>vittima</b>	X-Y	14-15	16-17	19-20	8-9	28-28	9-10	9-9	8-9	6-6
<b>sospetto</b>	X-Y	15-16	18-20	21-23	10-10	30-31	11-11	9-10	7-10	8-11
<b>testimone</b>	X-Y	14-17	16-17	19-20	8-11	29-29	11-11	11-12	6-7	6-11
<b>inquirente</b>	X-X	15-18	15-16	24-25	11-12	29-32	12-13	12-13	9-11	6-11

L'esame di 13 STR su una traccia fornisce dei valori di probabilità di associazione casuale inferiori a  $10^{-12}$ . La diffusione del profilo genetico nella popolazione è circa 1 su 1.000.000.000.000 persone.

La probabilità di trovare due profili genetici identici per solo effetto del caso è intuitivamente molto bassa.

L'unica eccezione sono i gemelli monozigoti.

# La probabilità di associazione casuale *random match*

- Viene determinata utilizzando le frequenze alleliche per ogni polimorfismo ed applicando la legge di Hardy-Weinberg
- Per l'omozigote la frequenza è  $p^2$
- Per l'eterozigote la frequenza è  $2 \times p \times q$

La probabilità di associazione casuale (PM) esprime la rarità di un profilo genetico

# Stima statistica: the "product rule", la regola del prodotto

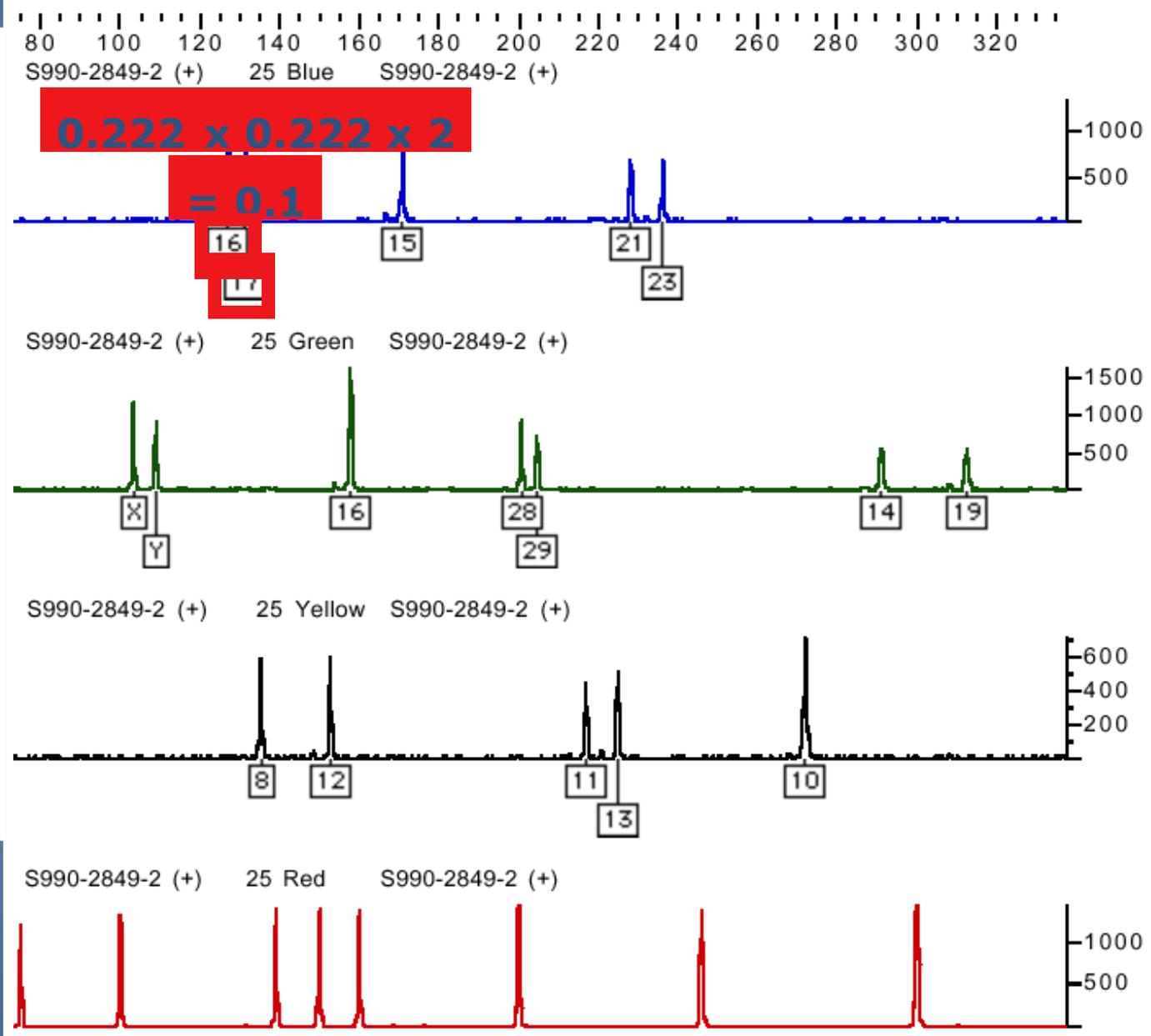
## Allele Frequencies

Locus D3S1358  
 Race Caucasian  
 (N = 203)

Allele	Frequency
12	0.012
13	0.012
14	0.140
15	0.222
16	0.222
17	0.222
18	0.183
19	0.012

Locus vWA  
 Race Caucasian  
 (N = 196)

Allele	Frequency
11	0.012
12	0.012
13	0.012
14	0.102
15	0.082



# Stima statistica: the "product rule", la regola del prodotto

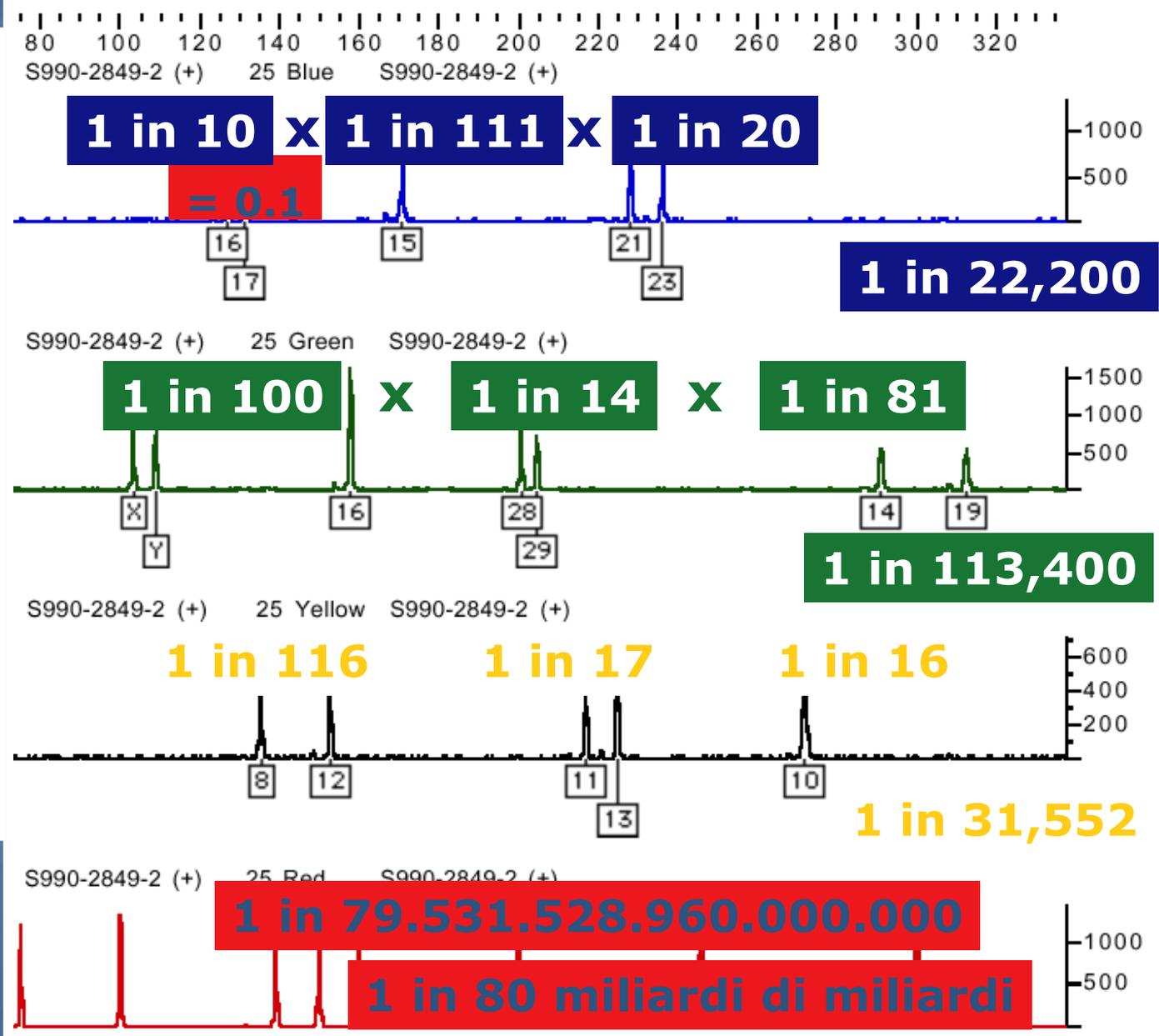
## Allele Frequencies

Locus D3S1358  
Race Caucasian  
(N = 203)

Allele	Frequency
12	0.012
13	0.012
14	0.140
15	0.246
16	0.222
17	0.222
18	0.163
19	0.012

Locus vWA  
Race Caucasian  
(N = 196)

Allele	Frequency
11	0.012
12	0.012
13	0.012
14	0.102
15	0.082



# UN PROFILO FREQUENTE

	D8	D21	D7	CSF	D3	TH01	D13	D16	vWA	TPO	D18	D5	FGA
<b>Cam</b>	13, 14	29, 30	10, 11	11, 12	15, 16	6, 7	11, 12	11, 12	16, 17	8, 8	12, 14	11, 12	21, 22
<b>Freq</b>	13%	11%	12%	20%	13%	13%	18%	17%	12%	28%	5%	22%	6%

Frequenza del profilo stimata in una popolazione italiana

1 su 200.000.000.000

La probabilità di discriminare *a priori* un soggetto falsamente accusato di aver lasciato quella traccia è > 99,999%

# TRE METODI PER VALUTARE L'EVIDENZA SCIENTIFICA PER L'IDENTIFICAZIONE DI TRACCE

- . Approccio intuitivo: basato sulla rarità di un carattere o di un profilo genetico;
- . Approccio comparativo: basato sulla valutazione di ipotesi contrapposte;
- . Approccio probabilistico: basato sulla legge di Bayes.

# Approccio comparativo

Ipotesi differenti vengono comparate  
dal punto di vista matematico

PROVA



*Likelihood ratio* → rapporto di verosomiglianza

$$LR = \frac{\text{ipotesi dell'accusa}}{\text{ipotesi della difesa}}$$

# Approccio comparativo

Il rapporto di verosomiglianza

*likelihood ratio*

LR =  $\frac{\text{il sospetto ha lasciato la traccia sulla scena del delitto}}{\text{qualcun altro diverso dal sospettato ha lasciato la traccia}}$

# Approccio comparativo

## Il rapporto di verosomiglianza likelihood ratio

Nei casi più semplici, ove si presuma di conoscere il donatore di una traccia (ipotesi dell'accusa) e non siano sospettati soggetti correlati, il numeratore è uguale a 1 (100%) e il denominatore corrisponde alla *match probability*

$$LR = \frac{1}{PM}$$

# Approccio comparativo

## Un esempio

Sia trovato un "match" tra il profilo di una traccia di sangue e quello del sospettato, Sig. Verdi.

Il valore di LR risulti 300.

Ciò può essere così interpretato:

l'ipotesi che la compatibilità tra i profili genetici, sia dovuta alla provenienza del sangue dal Sig. Verdi è 300 volte più probabile rispetto allo scenario opposto, cioè che il sangue origini da un altro individuo non correlato al Sig. Verdi.

# TRE METODI PER VALUTARE L'EVIDENZA SCIENTIFICA PER L'IDENTIFICAZIONE DI TRACCE

- . Approccio intuitivo: basato sulla rarità di un carattere o di un profilo genetico;
- . Approccio comparativo: basato sulla valutazione di ipotesi contrapposte;
- . Approccio probabilistico: basato sulla legge di Bayes.

## Approccio probabilistico

Approccio basato sull'uso delle probabilità.  
Deve essere utilizzato solo per i test di paternità,  
mentre ne è sconsigliato l'uso nelle indagini di  
identificazione personale.

## Il punto di vista della Corte

**OBIETTIVO:** valutare la colpevolezza di un imputato prima e dopo che venga introdotta la "prova DNA";

Gli organi giudicanti devono attribuire una probabilità variabile di colpevolezza, in base agli elementi che emergono nel dibattito, prima della testimonianza dell'esperto forense.

Questo valore è la **probabilità a priori**  $Pr_{PRIORI}$

## Il punto di vista dell'esperto forense

**OBIETTIVO:** dare elementi utili alla Corte, basati su evidenze scientifiche, perché essa possa obiettivamente decidere sulla colpevolezza dell'imputato.

La "prova DNA" è valutata come rapporto di verosomiglianza **LR**.

$$Pr_{TOTALE} = LR \times Pr_{PRIORI}$$

# Esempio di uso di normogrammi

Riancho JA and Zarrabeitia MT, *The prosecutor's and defendant's Bayesian nomograms. Int J Leg Med* 2002;116:312-313.

Sia stato determinato match tra una traccia ed il DNA di un sospetto.

Il valore trovato dall'esperto forense risulta pari a **LR = 100.000**

Qual è la probabilità che la traccia venga da quella persona, impiegando varie probabilità a priori, fornite dal Giudice?

0,10 = 10.000 a 1 (99,99%)

0,50 = 100.000 a 1 (99,9999%)

0,90 = 1.000.000 a 1 (99,99999%)

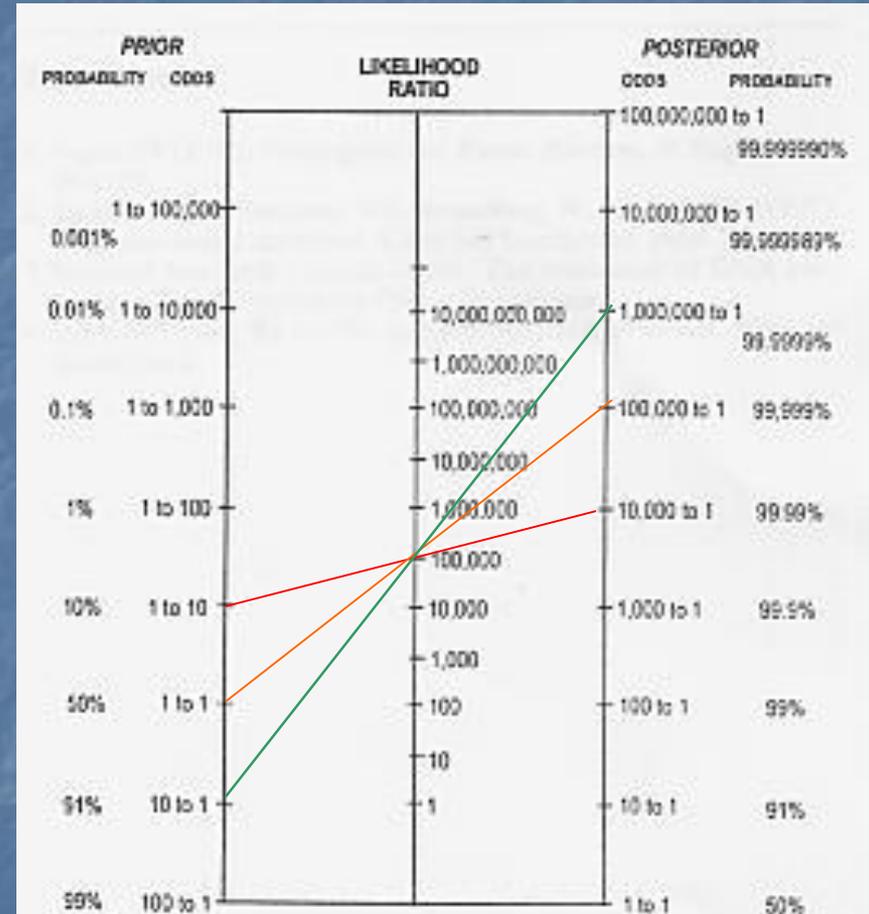


Fig. 1 The "prosecutor's nomogram", to be used when the likelihood ratio is higher than 1

# Predicati verbali

## Likelihood ratio

da 1 a 10

da 10 a 100

da 100 a 1000

più di 1000

## Equivalente verbale

sostegno limitato

sostegno moderato

sostegno forte

sostegno molto forte

L'FBI ha tentato di ovviare al problema di presentare la statistica del DNA alla giuria adottando la regola per la quale "una positiva identificazione si realizza quando la frequenza del profilo eccede 260 miliardi a 1".

A questo livello le *odds* contro un simile *match* trovate da qualunque altra parte negli USA sono 1000 a 1.

# Il consenso per le analisi

Per effettuare analisi di identificazione personale su oggetti occorre che chi richiede l'analisi detenga il possesso legale della cosa, oggetto sul quale vuole sia effettuato il test.

Esami senza il previo consenso dell'avente diritto sono vietati, a meno che non siano autorizzati dal Giudice.

# LA SINDROME DI MUNCHAUSEN BY PROXY

La patologia fittizia prende comunemente il nome di sindrome di Munchausen. L'omonimo barone (1720-1797), dopo anni di servizio nella cavalleria, ormai in ritiro nelle sue terre, amava distrarre gli amici con racconti in cui si attribuiva straordinarie prodezze.

Il termine di sindrome di Munchausen fu utilizzato per la prima volta nel 1951 su Lancet per comprendere situazioni caratterizzate dal ripetuto verificarsi di ricoveri ospedalieri per la cura di malattie apparentemente acute, di cui il paziente riferisce una storia e una causa plausibile, ma che si rivelano tutte false.

**ANCHE PER PROCURA** - Tale comportamento criminale è il risultato del desiderio della madre di essere al centro dell'attenzione del personale medico e del mondo in generale, mediante la malattia della figlia/o.



# Un esempio vero

Una signora si presentò ad un ospedale dell'area metropolitana dicendo che il figlio di circa 1 anno aveva delle perdite sporadiche di sangue. A dimostrazione di ciò portò un pannolino con delle evidenti macchie rossastre, verosimilmente di sostanza ematica.

Non era la prima volta che la signora denunciava episodi simili e l'ospedale decise di effettuare approfondimenti, sospettando che la signora diceva il falso. Ci fu fatta richiesta di comparare le tracce di sangue sul pannolino con il DNA della signora e del bambino, presenti nella banca del DNA del servizio di genetica. Alla nascita, infatti, erano stati effettuati prelievi per una sospetta patologia genetica.

Gli esami sul pannolino confermarono in effetti la presenza di sangue umano, ma non ritenemmo possibile l'esecuzione dell'esame, in mancanza del consenso informato della madre, che naturalmente era stata tenuta all'oscuro dai medici.

Fu effettuata però la caratterizzazione del sesso genetico sulle macchie di sangue. L'esame mise in evidenza trattarsi di sangue FEMMINILE, che quindi non poteva appartenere al figlio maschio della signora.

Di fronte all'evidenza la signora confessò ai medici di essere stata lei a macchiare il pannolino con il suo sangue, per simulare la patologia.



**DONAZIONI ANONIME** Ovuli e sperma preparati per un'inseminazione artificiale in una clinica della fertilità di Roma. (REUTERS)

## Papà era un donatore di sperma A 15 anni lo rintraccia su Internet

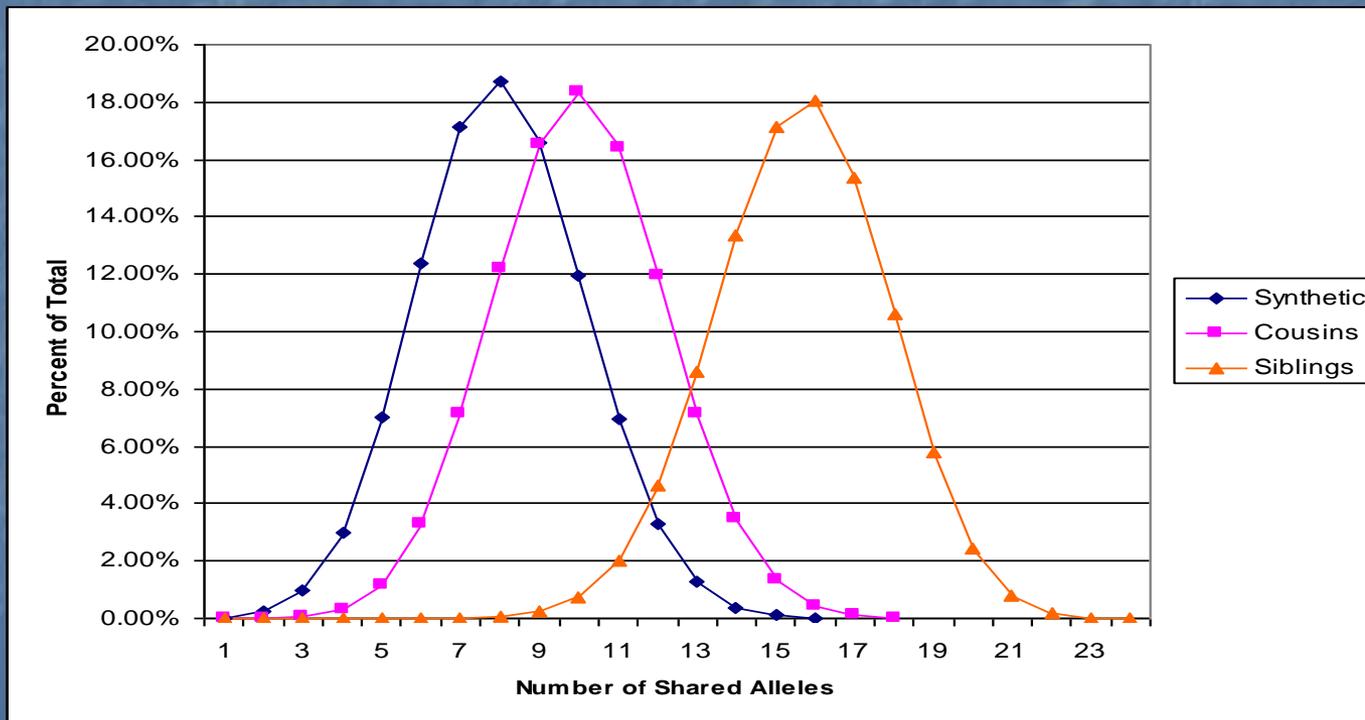
**LONDRA - La saliva e Internet. Sono bastati questi due elementi a un adolescente britannico, nato attraverso una donazione anonima di sperma, per rintracciare il suo padre biologico. La notizia mette a rischio l'anonimato dei donatori di sperma nel mondo.**

La storia del ragazzo - si sa soltanto che è americano e ha 15 anni - è stata pubblicata dalla rivista *New Scientist*. L'adolescente ha prelevato un campione di saliva dall'interno della sua guancia. Ha inviato il tampone al sito [www.familytreedna.com](http://www.familytreedna.com), specializzato nella ricostruzione di alberi genealogici. Pagando 289 dollari (240 euro) ha ottenuto il suo Dna e che il suo cromosoma Y (che passa di padre in figlio praticamente senza modificarsi) venisse confrontato con quelli di uomini presenti in un database. Dopo nove mesi, il ragazzo ha saputo che il suo cromosoma somigliava a quello di due soggetti. Significava che tutti e tre avevano il 50% di probabilità di avere uno stesso padre, nonno o bisnonno. Inserendo i cognomi dei due probabili parenti sul sito, [www.omnitrace.com](http://www.omnitrace.com), oltre alla sua data di nascita e ai pochi dettagli forniti dalla clinica di fertilità che aveva aiutato sua madre, il 15enne ha quindi trovato il suo papà biologico. (ANSA, CITY)

Metro, 04-11-2005

## Presenza di soggetti correlati

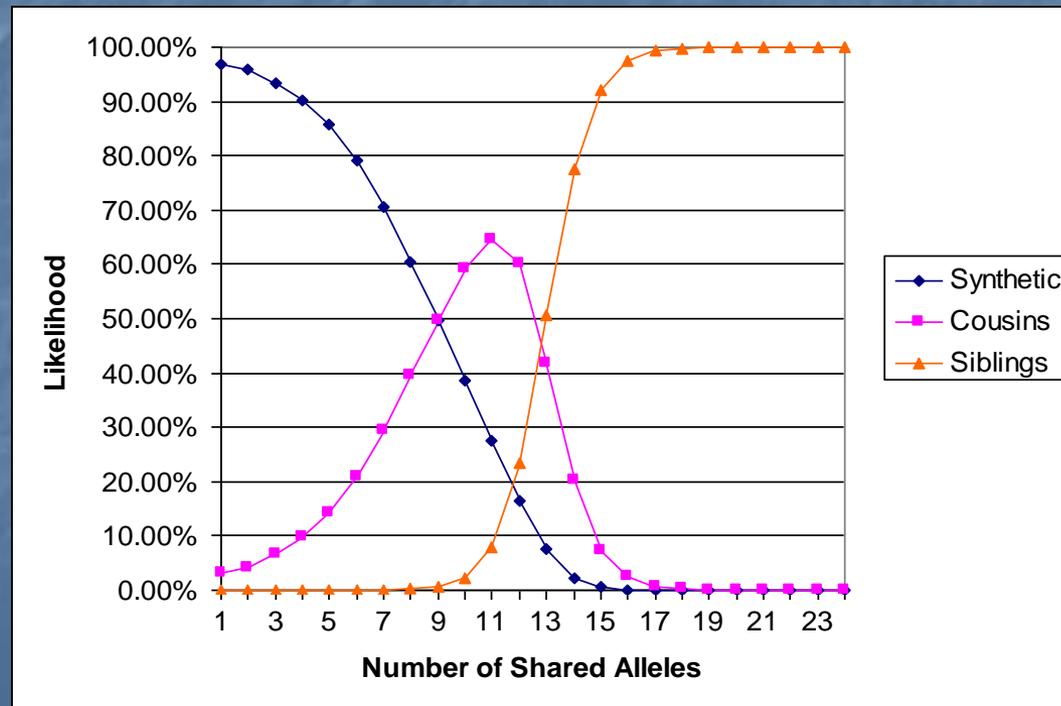
Soggetti correlati hanno maggiori possibilità di condividere un certo numero di alleli a differenti loci. Maggiore è il coefficiente di correlazione tra queste persone, maggiore è il numero di alleli condivisi.



## Presenza di soggetti correlati

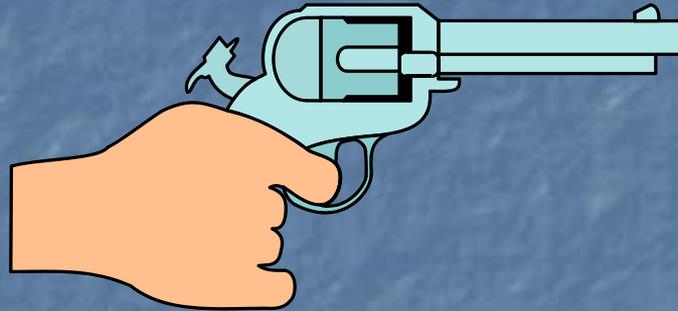
Esaminando due profili genetici è possibile stimare attraverso il rapporto di verosomiglianza l'ipotesi che i due soggetti siano o meno correlati.

Con queste stime si può per esempio rispondere al quesito se due soggetti siano fratelli o sorelle, anche in assenza dei rispettivi genitori.



# ALCUNE COMPLICAZIONI NELLE ANALISI GENETICO FORENSI

## Profili con basso numero di copie di template (low copy number LCN)



Tracce di DNA si trovano dopo che un oggetto è stato toccato o maneggiato da qualcuno, che ha lasciato proprie cellule.



# Sensibilità

Il DNA di partenza dovrebbe essere tra 0,5-1,25 ng

(AmpF/STR® Identifiler User's Manual)

Diluizioni seriali di DNA genomico 250-12,5 pg

Gill et al. in FSI 2000;112:17-40;  
Whitaker et al. in FSI 2001; 123:215-223

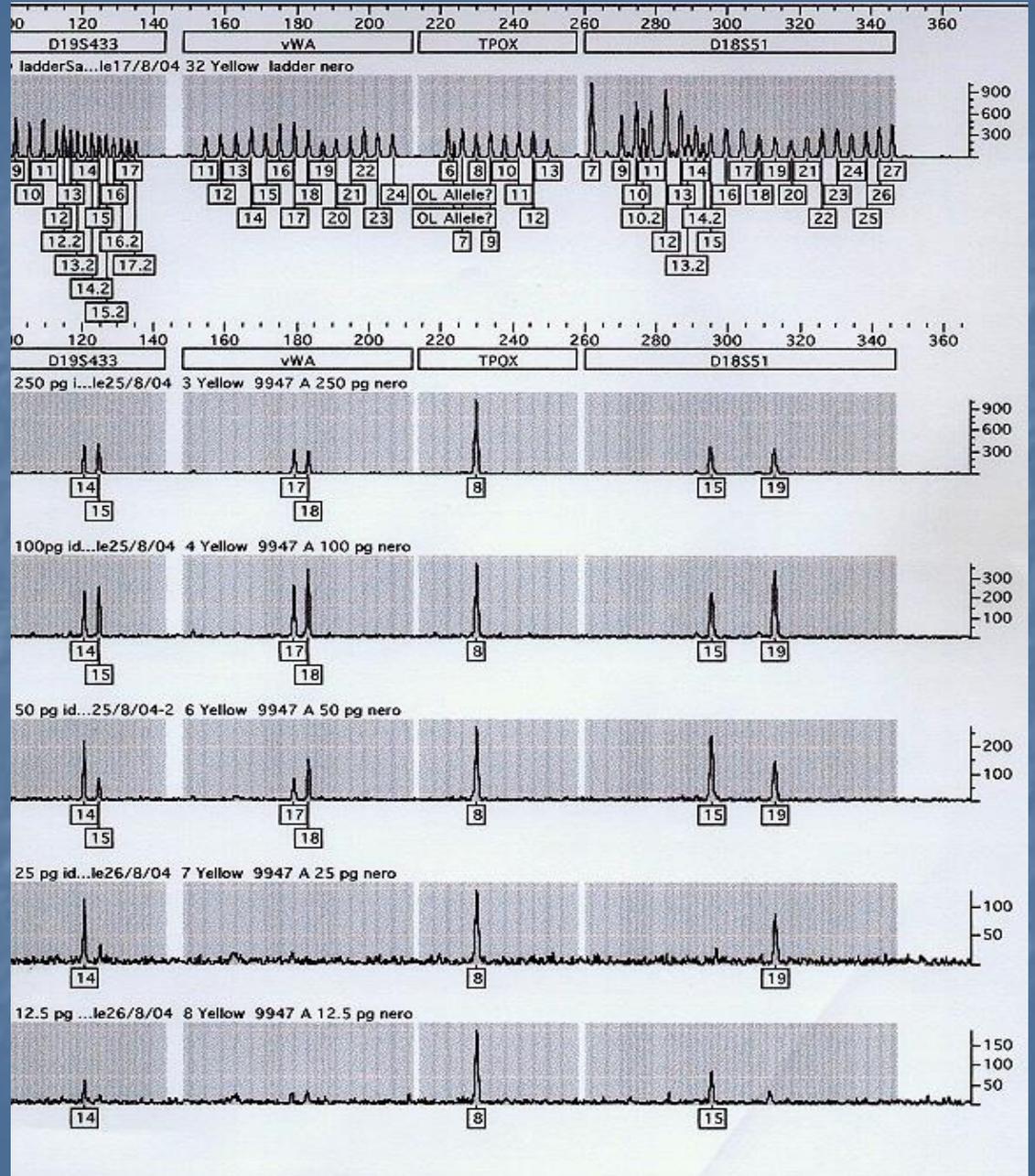
250 pg

100 pg

50 pg

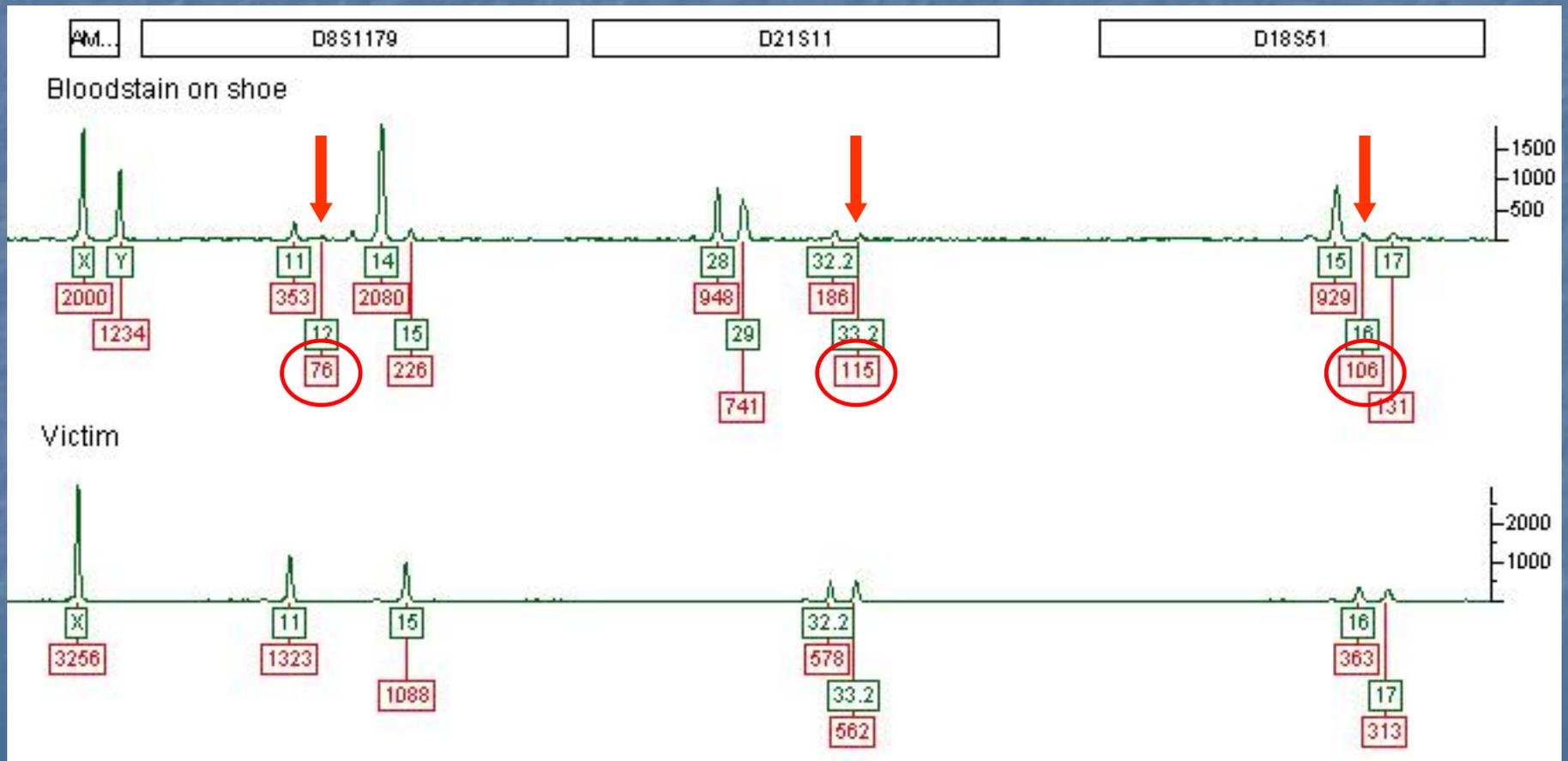
25 pg

12.5 pg

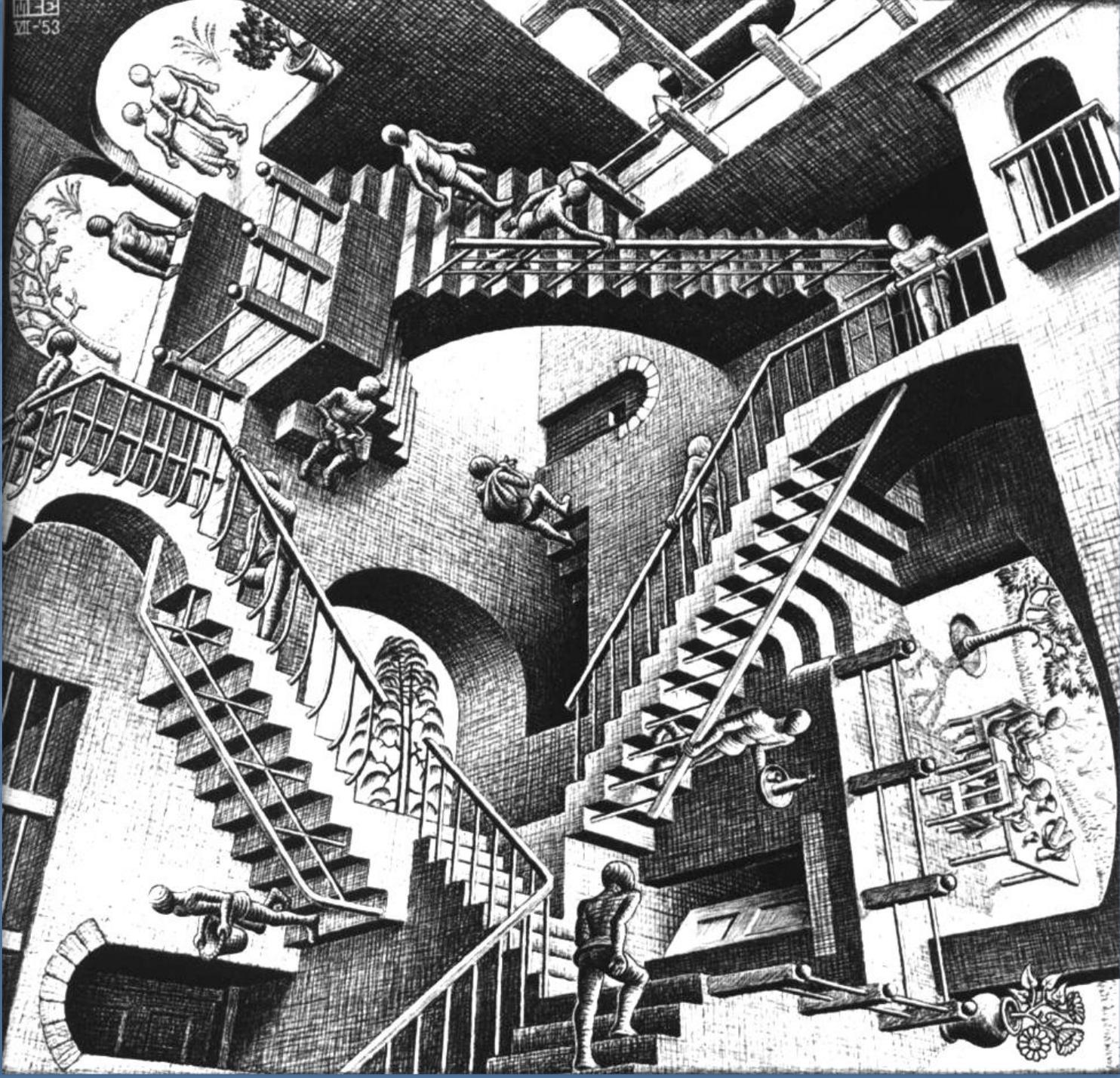


# I profili possono essere di interpretazione soggettiva

Ogni laboratorio usa dei valori soglia per descrivere la presenza di una particolare forma allelica. Per esempio se un laboratorio adotta la soglia di 120 RFU, i seguenti alleli non dovrebbero essere riportati nel profilo genetico sottostante.



**Б  
У  
Н  
О  
Д  
И  
К  
С  
И  
С**



# Degradazione

4 diverse analisi dello stesso campione

↓ Alleli aggiuntivi

↓ Alleli mancanti

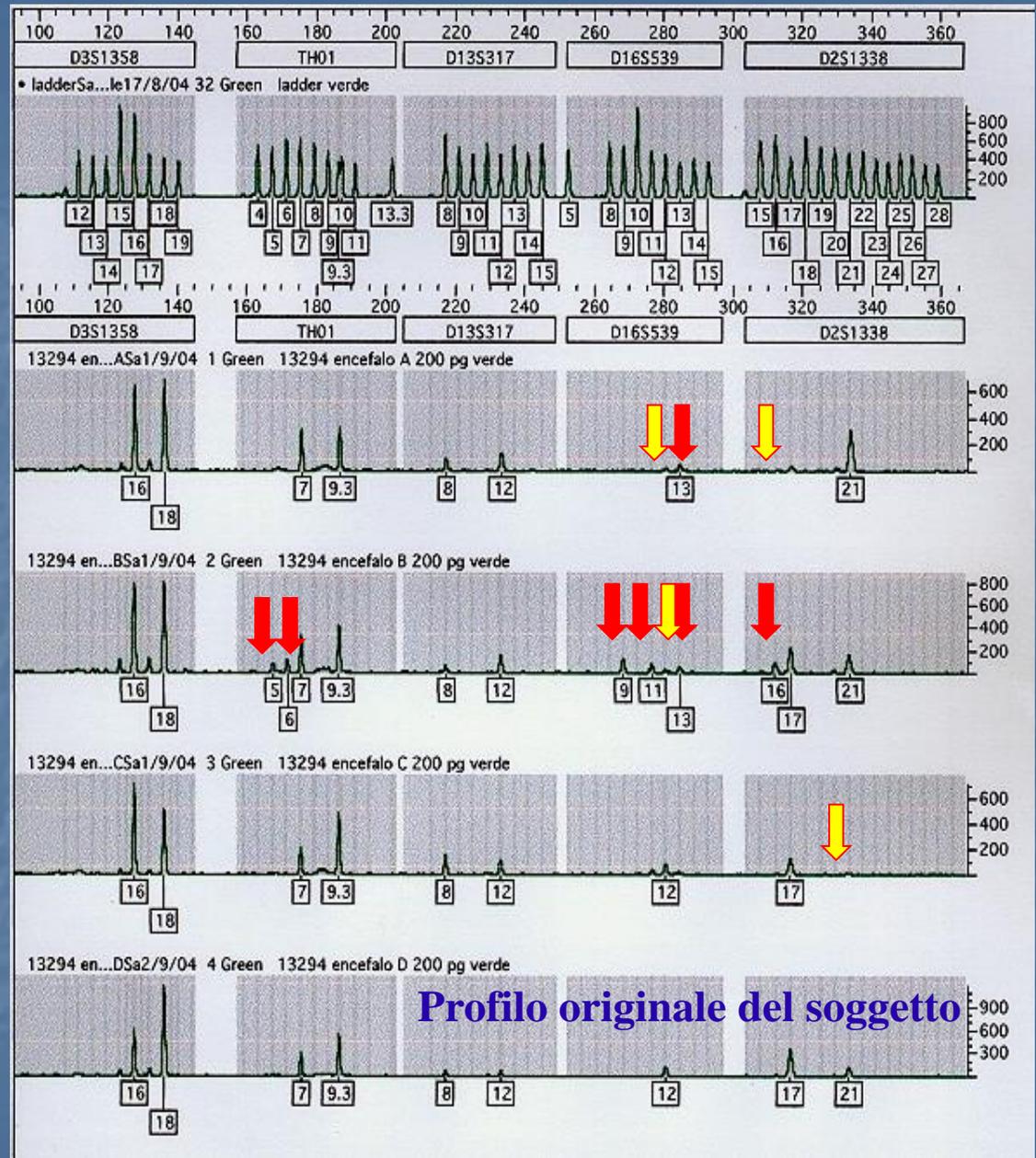
A, B e C: campioni degradati artificialmente

A

B

C

D

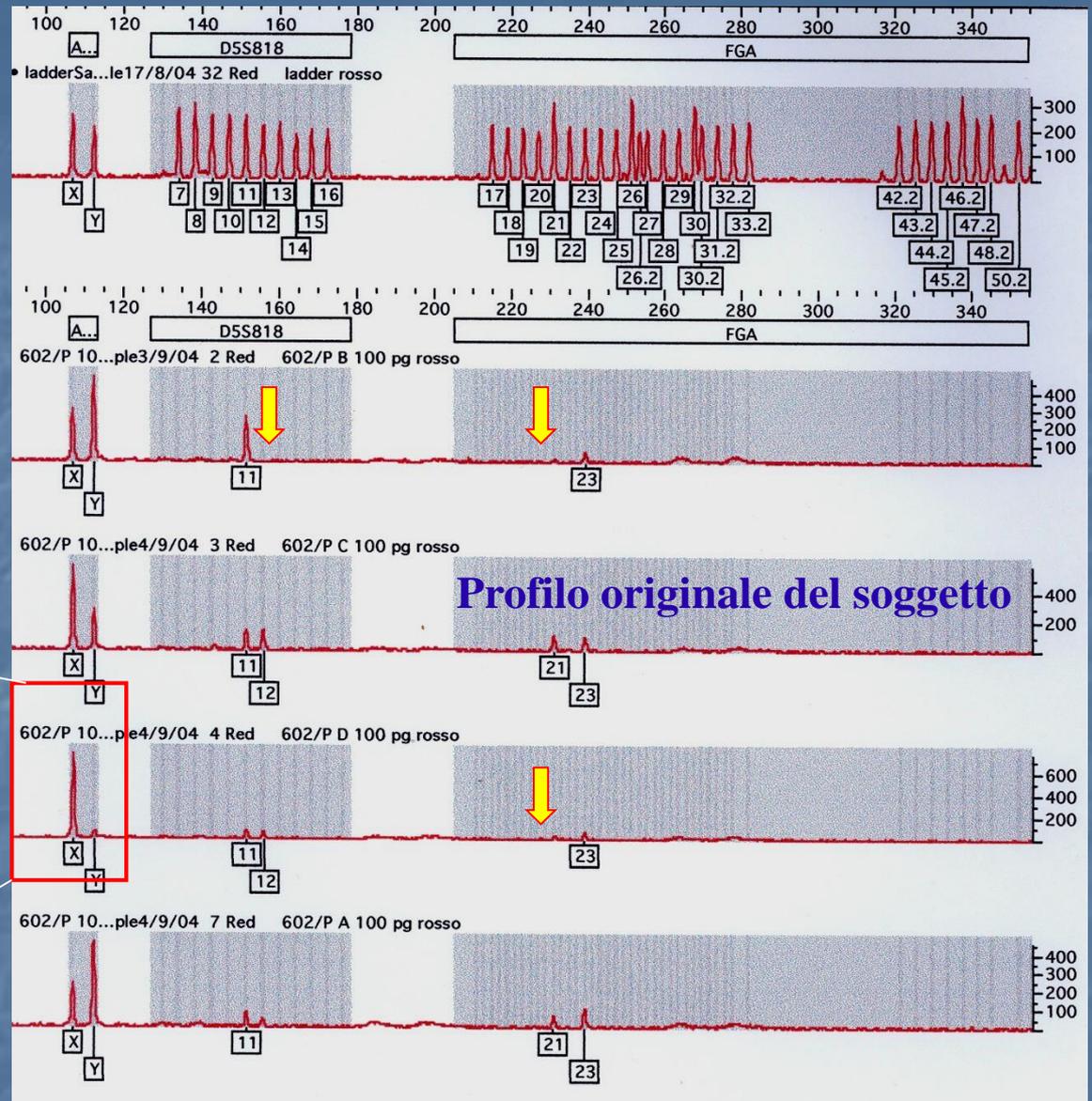
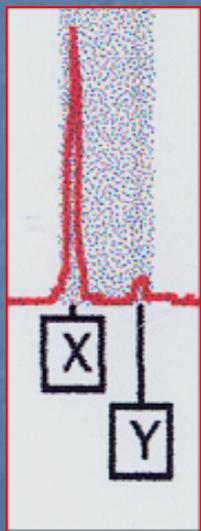


# Degradazione

4 diverse analisi dello stesso campione

↓ Alleli aggiuntivi A

↓ Alleli mancanti B



A, C e D: campioni degradati artificialmente

ADO

## Interpretazione di profili genetici STR in condizioni di Low Copy Number (LCN)

- Profili genetici generati in condizioni di LCN sono affetti da variazioni stocastiche associate con campionamento ed amplificazione di piccole quantità di template o da template parzialmente degradato.
- Aumento della asimmetria degli eterozigoti, aumento dell'incidenza della perdita allelica (allelic dropout) ed aumento della proporzione di stutter negli alleli  
Whitaker et al. in FSI 2001;123:215-223
- L'esame in PCR di questi campioni può essere favorito dall'aumento del numero di cicli di amplificazione. Il limite massimo suggerito è di 34, non essendoci alcun vantaggio ad un aumento ulteriore.  
Gill et al. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. FSI 2000;112:17-40

# Contaminazione

L'esame di "controlli negativi" in provette sterili senza DNA, condotto a 34 cicli di amplificazione, mostra la presenza di forme alleliche sporadiche, dovute a contaminazione non meglio identificata.

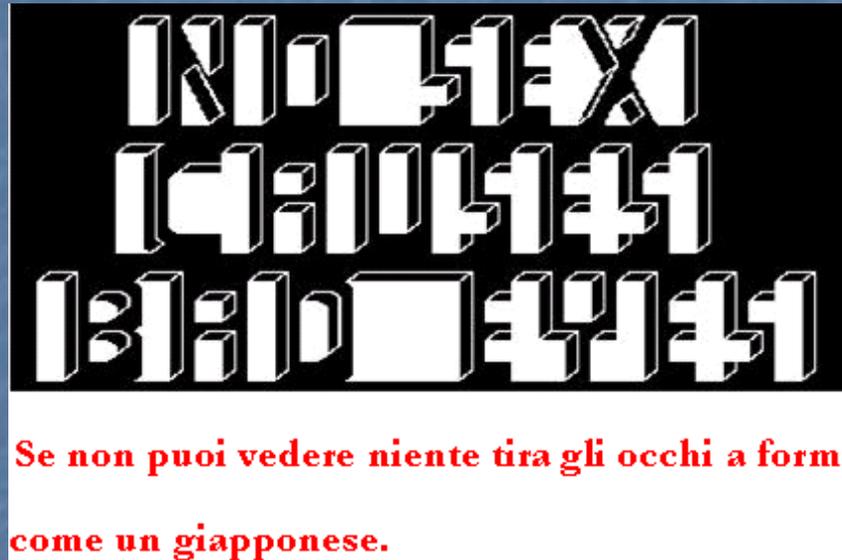
Gill et al. *Forensic Sci Int* 112, 2000, 17-43.

Table 1  
A compilation of spurious alleles found in 30 replicate negative controls (AMPFISTR SGM plus)<sup>a</sup>

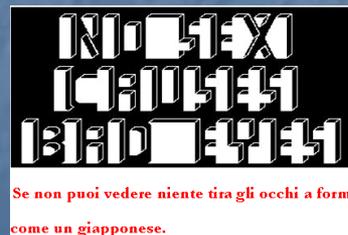
Sample	Amelo	D19	D3	D8	TH01	VWA	D21	FGA	D16	D18	D2
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	X	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-
10	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	X	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-
17	X	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	X	14	-	14	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-
21	-	-	-	-	-	-	33.2	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	10	-	-	25.27	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	X	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
28	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	15	-	-	16	-	-	-	-	-
30	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ve	X,Y	14,15	15,17	11,12	6,7	16,17	28,31.2	23,25	11,13	12,13	17,22
-ve	-	-	-	-	9,3	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Amelo, amelogenin; TH01, HUMTH01; D21, D21S11; D18, D18S51; D8, D8S1179; VWA, HUMVWA31/A; FGA, HUMFGA/FGA; D19, D19S433; D16, D16S539; D2, D2S1338; D3, D3S1179.

# Sapere come guardare



# Cambiare punto di vista



## Interpretazione di profili genetici in LCN

- L'amplificazione in doppio con la generazione di un "consensus profile" è supportata statisticamente.
- Con l'incremento dei cicli di PCR vi è incremento della contaminazione di base del laboratorio che è inevitabile.
- I controlli negativi non sono un indicatore affidabile per rilevare questa contaminazione che è "single-tube dependent".
- La replicazione dei risultati di una PCR per produrre un "consensus profile" è una dimostrazione della riproducibilità.

Gill et al. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. FSI 2000;112:17-40

# GENETICA FORENSE

**Le indagini di paternità/maternità**

**Le indagini di criminalistica**

**La ricerca di persone scomparse**

**I database del DNA**

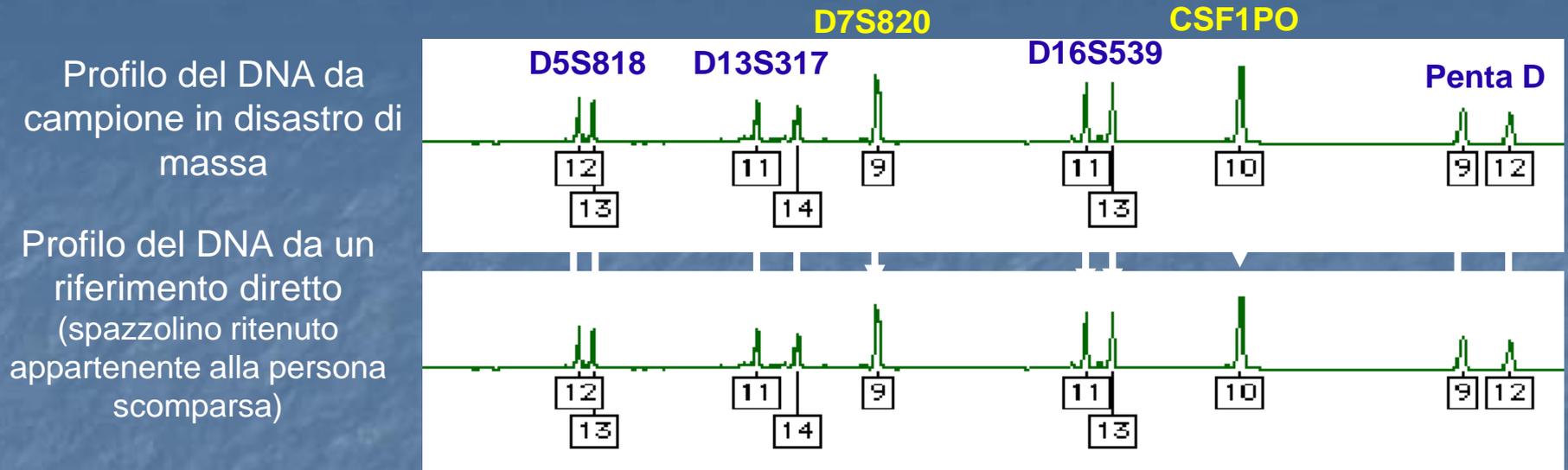
**Le analisi su DNA non umano**

# La ricerca di persone scomparse

Il DNA consente di stabilire l'identità di una persona scomparsa:

- . Esami diretti – confronto tra il DNA della persona scomparsa e materiale biologico di sua certa provenienza (presente su oggetti come pettini, spazzolini da denti, indumenti ecc.)
- . Esami indiretti – si basa sulle regole di trasmissione e sui principi dell'eredità. Viene effettuato il confronto dei profili genetici di parenti biologici della persona scomparsa.

## (A) Comparazione diretta



## (B) Analisi indiretta

vittima	<b>D5S818</b>	<b>D13S317</b>	<b>D7S820</b>	<b>D16S539</b>	<b>CSF1PO</b>	<b>Penta D</b>	
	11,13	8,12	8,12	8,9	10,12	8,10	moglie
	11,13	8,14	8,9	9,13	10,10	9,10	figlio
<b>Profilo previsto della vittima</b>	11,? or ? ,13	? ,14	9,?	? ,13	? ,10	9,?	<b>vittima (padre)</b>
	<b>12,13</b>	<b>11,14</b>	<b>9,9</b>	<b>11,13</b>	<b>10,10</b>	<b>9,12</b>	<b>Profilo esame diretto</b>

# GENETICA FORENSE

**Le indagini di paternità/maternità**

**Le indagini di criminalistica**

**La ricerca di persone scomparse**

**I database del DNA**

**Le analisi su DNA non umano**

# I DATABASE DI DNA

I campioni biologici da cui ricavare i profili genetici custoditi in un database possono provenire da soggetti identificati secondo modalità differenti, come qui di seguito esemplificato:

campioni biologici ottenuti da criminali condannati per specifici reati di natura violenta (omicidi, violenze sessuali);

campioni biologici ottenuti da criminali condannati per reati minori, da persone formalmente indagate e da chiunque sia sospettato e acconsenta volontariamente o meno al prelievo;

campioni biologici di coloro che svolgono funzioni particolari, come gli stessi appartenenti alle forze dell'ordine e il personale medico;

tracce rinvenute sul luogo di un reato;

campioni biologici da persone decedute;

campioni biologici ottenuti dai famigliari di soggetti scomparsi.

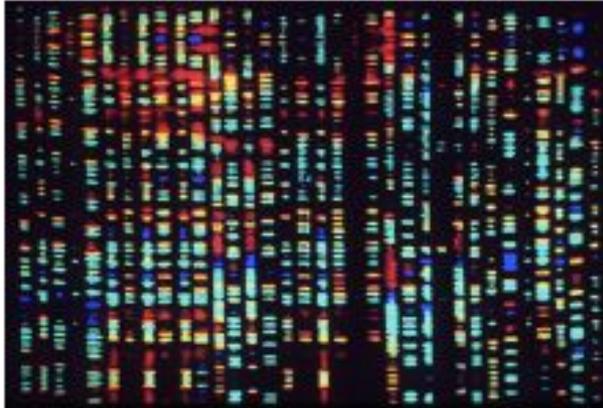
# I DATABASE DI DNA

Anno di attivazione	Nazione
1995	Inghilterra
1996	Irlanda del Nord, Scozia
1997	Paesi Bassi, Austria
1998	Germania, Slovenia
1999	Finlandia, Norvegia
2000	Danimarca, Svizzera, Svezia, Croatia, Bulgaria
2001	Francia, Repubblica Ceca
2002	Belgio, Estonia, Lituania, Slovacchia
2003	Ungheria, Lettonia
in preparazione Grecia e Italia	

# Schedato in segreto il Dna di migliaia di persone

Beatrice Montini

**Unità 18.05.2006**



Un archivio segreto in cui viene raccolto, schedato e conservato il Dna di centinaia, forse migliaia di cittadini. Un archivio, del tutto illegale, costruito nel corso degli anni conservando le «tracce biologiche» raccolte dai Carabinieri durante normali attività investigative. Un database che il Ris, la scientifica dell'Arma, usa normalmente per identificare i presunti autori di reati. La storia è scritta nero su bianco nel verbale di un processo per il furto di alcune auto e di gioielli, avvenuto a

Gargazzone (nei pressi di Merano) tre anni fa. L'imputato è un cittadino albanese che adesso si trova in carcere proprio a causa di questo database illegale e che, tramite il suo avvocato Francesco Coran, presenterà un esposto al garante della Privacy.

Questi, in sintesi, i fatti. La mattina del 25 settembre del 2003, un rivenditore d'auto di Gargazzone, svegliandosi si accorge che la sua casa è stata svaligiata: sono spariti orologi, gioielli e due automobili. Scatta immediatamente la denuncia ai Carabinieri. Un paio di giorni dopo viene ritrovata una delle auto rubate: all'interno un mozzicone di sigaretta, un paio di guanti, un fazzoletto di carta e un passamontagna. Il tutto viene inviato, come prassi, alla Sezione Biologia del Ris di Parma, punto di raccolta dei reperti provenienti da tutti i comandi e Procure del Nord Italia. Poco tempo dopo il Ris comunica i risultati: il dna del mozzicone appartiene a un cittadino albanese, pregiudicato. L'uomo viene preso e incarcerato.

Ma come si è giunti all'identificazione? Lo spiega, durante il processo, un maggiore dei Carabinieri del Ris di Parma che, come si legge nel verbale, racconta, candidamente: «Come sistema generale riceviamo tutto (*ndr* tutti i reperti) e poi abbiamo realizzato un nostro software fatto in casa, dove appunto immagazziniamo tutti questi dati da tutti i referti o soggetti che ci vengono inviati come eventuali sospetti per i diversi casi». Nel caso del furto di Gargazzone, spiega ancora il carabiniere, dai mozziconi di sigaretta emerge l'identikit genetico di 3 diversi soggetti: «Questi tre profili, che poi ripeto sono una serie di tanti numeri, sono stati infilati in questo software che non fa altro che comparare dei numeri e vedere se contemporaneamente ci sono queste coppie di numeri uguali». Risultato: uno dei tre identikit genetici combacia perfettamente con il dna di un uomo che «era già risultato in altri due reati». In particolare, racconta il comandante, il dna dell'albanese era stato analizzato e schedato nel corso di un'inchiesta su uno stupro avvenuto nel '99 a Bressanone: «La Procura all'epoca prolungò le indagini molto su questo caso e ci mandarono nell'arco di due anni circa 400 campioni di confronto». In realtà nessuno dei 400 presunti colpevoli aveva un dna compatibile con il violentatore e il caso è quindi rimasto irrisolto. «Il Ris, però, non ha distrutto i risultati delle analisi come avrebbe dovuto secondo quanto stabilito in primis dalla legge sulla Privacy che vieta la conservazione segreta di dati sensibili - sottolinea l'avvocato Coran - Ma li ha inseriti nel famigerato software fatto in casa per riusarli ogni volta che si tratta di identificare un dna sospetto».

**Unità 18.05.2006**

# GENETICA FORENSE

**Le indagini di paternità/maternità**

**Le indagini di criminalistica**

**La ricerca di persone scomparse**

**I database del DNA**

**Le analisi su DNA non umano**

[J Forensic Sci.](#) 2006 Mar;51(2):274-81.

[Related Articles](#), [Links](#)



**A proposal for standardization in forensic canine DNA typing: allele nomenclature of six canine-specific STR loci.**

[Hellmann AP](#), [Rohleder U](#), [Eichmann C](#), [Pfeiffer I](#), [Parson W](#), [Schleenbecker U](#).

[Anim Genet.](#) 1997 Aug;28(4):247-52.

[Related Articles](#), [Links](#)

**Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing.**

[Bowling AT](#), [Eggleston-Stott ML](#), [Byrns G](#), [Clark RS](#), [Dileanis S](#), [Wictum E](#).

Veterinary Genetics Laboratory, University of California, Davis 95616, USA.

[Anal Bioanal Chem.](#) 2003 Aug;376(8):1225-33. Epub 2003 Jun 13.

[Related Articles](#), [Links](#)



**Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses.**

[Alghanim HJ](#), [Amirall JR](#).

# Il genetista forense

Colui che fornisce al privato o alla giustizia gli elementi obiettivi per decidere su fatti importanti, come l'attribuzione o l'esclusione di una paternità, oppure per stabilire la precisa identità di una persona.

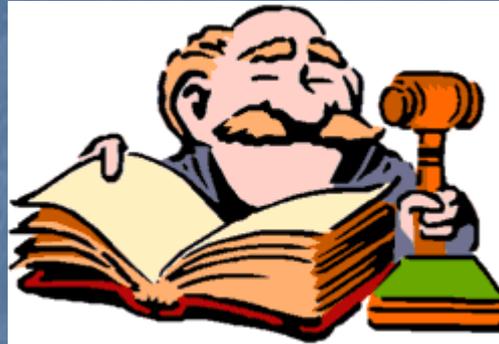


Nelle vicende giudiziarie, sia civili che penali, è sempre il giudice a decidere su un fatto, come l'attribuzione di una paternità o la colpevolezza di un imputato, indipendentemente dai risultati a cui il laboratorio perviene.



Nelle richieste private l'analista si trova a dover fornire all'utente risultati molto importanti, come l'attribuzione di una paternità o l'attribuzione di una traccia ad un individuo.

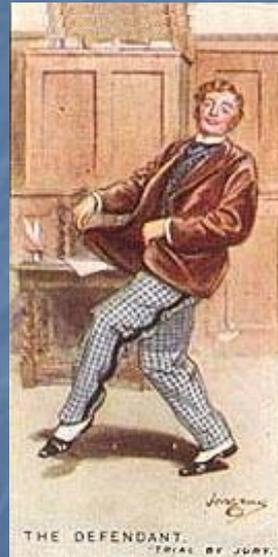
# Le parti nel processo civile e penale



**Genetista forense**



**Genetista forense**



**Genetista forense**



# Il ruolo del consulente

“Sulla base della mia esperienza  
accumulata in tanti anni  
di lavoro, sono certo  
dei miei risultati”



Pericolo di essere  
autoreferenziali!

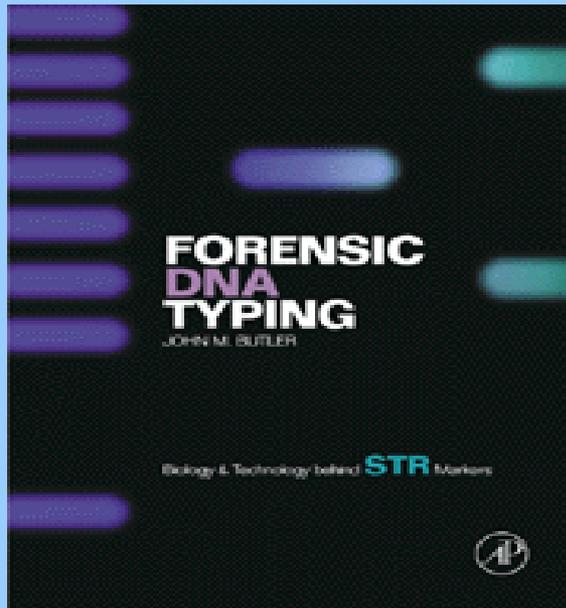
Occorre massima obiettività da parte del consulente nella valutazione dei risultati e poi formulazione dei giudizi.

Sulla base dei risultati ottenuti ho valutato le ipotesi contrapposte riguardo alla provenienza del profilo genetico che ho determinato sul reperto.  
Risulta 100 volte più probabile che esso provenga dal sospetto che da una persona sconosciuta non imparentata con il sospetto.



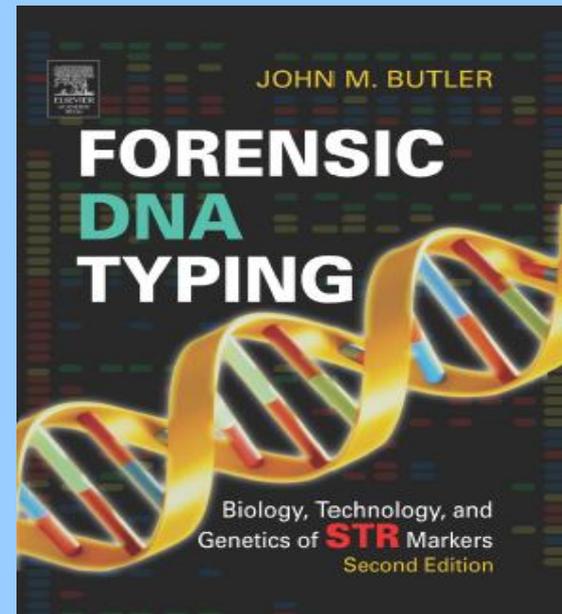
John Butler (2004). Forensic DNA typing. Accademic Press.

1° edizione



Gennaio 2001

2° edizione

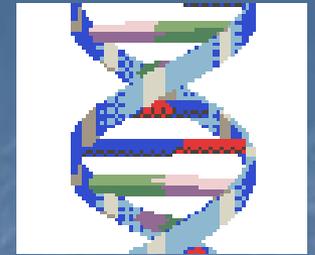


Febbraio 2005

Testo completo sulla teoria ed applicazioni dei  
microsatelliti in genetica forense.

Scuola di Specializzazione in Genetica Medica - anno 3°

## Riferimenti web



- Peter de Knijff's Y STR web page:
  - <http://ruly70.medfac.leidenuniv.nl/~fldo/hptekst.html>
- Y STR Haplotype database:
  - <http://ystr.charite.de>
- STRBase
  - <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>



“Il DNA forense è come una scatola di cioccolatini.

Non sai com'è finchè non li hai provati”

*John Butler*