

**Centro di Riferenza Nazionale per
la Medicina Forense Veterinaria**

GENETICA FORENSE



Biotecnologie nella Diagnostica Veterinaria e nel Controllo degli Alimenti
Firenze 14-15 Dicembre 2011

**Introduzione al Centro di
Medicina Forense Veterinaria**

Introduzione alla Genetica Forense

Marker STR - Applicazioni

Sequenziamento - Applicazioni

Significato del test statistico



MINISTERO DEL LAVORO, DELLA SALUTE E DELLE POLITICHE SOCIALI

DECRETO 18 giugno 2009.

Istituzione di nuovi Centri di riferimento nazionali nel settore veterinario.

IL MINISTRO DEL LAVORO, DELLA SALUTE E DELLE POLITICHE SOCIALI

Visto il decreto legislativo 30 luglio 1999, n. 300 e ss. mm., recante «Riforma dell'organizzazione del governo a norma dell'art. 11 della legge 15 marzo 1997, n. 59»;

Visto il decreto-legge 16 maggio 2008, n. 85, recante «Disposizioni urgenti per l'adeguamento delle strutture di Governo in applicazione dell'art. 1, commi 376 e 377 della legge 24 dicembre 2007, n. 244, convertito con modificazioni dalla legge 14 luglio 2008, n. 121 e, in particolare, l'art. 1, comma 6;

Visto il decreto legislativo 30 giugno 1993, n. 270, recante «Riordinamento degli Istituti zooprofilattici sperimentali, a norma dell'art. 1, comma 1, lettera h), della legge 23 ottobre 1992, n. 421» e, in particolare, l'art. 2, comma 3, lett. l);

Vista la legge 23 giugno 1970, n. 503, concernente l'ordinamento degli Istituti zooprofilattici sperimentali, e successive modificazioni;

Vista la legge 23 dicembre 1978, n. 833 e successive

Visto il decreto del Ministro della sanità del 2 novembre 1991, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 265 del 12 novembre 1991, recante istituzione del «Centro di Riferenza nazionale per l'epidemiologia, la programmazione e l'informazione» presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise;

Visto il decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 28 febbraio 2003, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 52 del 4 marzo 2003, concernente «recepimento dell'Accordo recante disposizioni in materia di benessere degli animali da compagnia e pet-therapy»;

Vista l'ordinanza del Ministro del lavoro, della salute e delle politiche sociali 18 dicembre 2008, pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana n. 13 del 17 gennaio 2009, recante «Norme sul divieto di utilizzo e di detenzione di esche o di bocconi avvelenati»;

Visto il decreto del Ministro del lavoro, della salute e delle politiche sociali 23 maggio 2008, recante «delega delle attribuzioni del Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali, per taluni atti di competenza dell'Amministrazione, al Sottosegretario di Stato on.le Francesca Martini» registrato alla Corte dei conti il 10 giugno 2008, foglio n. 27;

Viste ed esaminate le richieste presentate, ai fini dell'istituzione di nuovi Centri di riferimento nazionali e del cambio di denominazione di Centri di riferimento nazionali

Art. 2.

1. Le principali attività del Centro di riferimento nazionale di cui al precedente articolo riguardano in via prioritaria:

a) la promozione della Ricerca per la standardizzazione di protocolli operativi per il controllo sanitario e comportamentale degli animali impiegati nei programmi di IAA (interventi assistiti con gli animali);

b) il potenziamento delle collaborazioni fra medicina umana e veterinaria per individuare sinergie operative e di ricerca in grado di garantire un miglioramento dei risultati delle attività svolte nel settore di interesse;

c) il miglioramento delle conoscenze circa l'applicabilità di tali interventi in determinate categorie di pazienti (anziani, bambini affetti da autismo, disabili psichici);

d) l'organizzazione e gestione di percorsi formativi;

e) la raccolta di dati e la diffusione di informazioni alla comunità scientifica internazionale.

Art. 3.

1. Presso la sede territoriale di Grosseto dell'Istituto zooprofilattico sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana è attivato il «Centro di riferimento nazionale per la medicina Forense Veterinaria».

Art. 4.

1. Le principali attività del Centro di riferimento na-

b) l'organizzazione di corsi di formazione per il personale del Servizio sanitario nazionale e degli organi di polizia a livello territoriale per la standardizzazione dei rilievi di campo relativi ad indagini medico legali riguardanti l'uccisione di animali domestici e selvatici.

Art. 5.

1. La denominazione del «Centro di riferimento nazionale per l'epidemiologia, la programmazione e l'informazione», attivato presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise con decreto del Ministro della sanità del 2 novembre 1991, è sostituita dalla seguente denominazione: «Centro di riferimento nazionale per l'epidemiologia veterinaria, la programmazione, l'informazione e l'analisi del rischio».

Art. 6.

1. Le principali attività del Centro di riferimento nazionale di cui al precedente articolo riguardano in via prioritaria:

a) lo svolgimento di analisi del rischio con particolare riferimento alla sanità animale e alla sicurezza alimentare;

b) l'elaborazione e l'attuazione di programmi operativi finalizzati alla formazione del personale.

Art. 7.

Art. 2.

1. Le principali attività del Centro di riferimento nazionale di cui al precedente articolo riguardano in via prioritaria:

a) la promozione della Ricerca per la standardizzazione di protocolli operativi per il controllo sanitario e comportamentale degli animali impiegati nei programmi di IAA (interventi assistiti con gli animali);

b) il potenziamento delle collaborazioni fra medicina umana e veterinaria per individuare sinergie operative e di ricerca in grado di garantire un miglioramento dei risultati delle attività svolte nel settore di interesse;

c) il miglioramento delle conoscenze circa l'applicabilità di tali interventi in determinate categorie di pazienti (anziani, bambini affetti da autismo, disabili psichici);

d) l'organizzazione e gestione di percorsi formativi;

e) la raccolta di dati e la diffusione di informazioni alla comunità scientifica internazionale.

Art. 3.

1. Presso la sede territoriale di Grosseto dell'Istituto zooprofilattico sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana è attivato il «Centro di riferimento nazionale per la medicina Forense Veterinaria».

Art. 4.

1. Le principali attività del Centro di riferimento nazionale di cui al precedente articolo riguardano in via prioritaria:

a) lo sviluppo e la standardizzazione di tecniche di laboratorio e di tossicologia forense per:

1) il rilevamento delle sostanze tossiche utilizzate a scopo doloso;

2) la determinazione delle cause di morte per dolo a carico di specie selvatiche, o domestiche, oggetto, a qualsiasi titolo, di misure di salvaguardia e protezione;

3) le analisi comparative di campioni di tessuti freschi o congelati, di sangue, peli o altro materiale organico appartenente a specie selvatiche protette o di interesse venatorio, mediante tecniche di biologia molecolare, per la repressione del bracconaggio;

4) l'identificazione individuale (DNA typing), l'attribuzione della paternità, l'identificazione del sesso, il riconoscimento degli ibridi intraspecifici mediante tecniche di genetica forense per la lotta al commercio clandestino di animali selvatici;

b) l'organizzazione di corsi di formazione per il personale del Servizio sanitario nazionale e degli organi di polizia a livello territoriale per la standardizzazione dei rilievi di campo relativi ad indagini medico legali riguardanti l'uccisione di animali domestici e selvatici.

Art. 5.

1. La denominazione del «Centro di riferimento nazionale per l'epidemiologia, la programmazione e l'informazione», attivato presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise con decreto del Ministro della sanità del 2 novembre 1991, è sostituita dalla seguente denominazione: «Centro di riferimento nazionale per l'epidemiologia veterinaria, la programmazione, l'informazione e l'analisi del rischio».

Art. 6.

1. Le principali attività del Centro di riferimento nazionale di cui al precedente articolo riguardano in via prioritaria:

a) lo svolgimento di analisi del rischio con particolare riferimento alla sanità animale e alla sicurezza alimentare;

b) l'elaborazione e l'attuazione di programmi operativi finalizzati alla formazione del personale.

Art. 7.

1. Alle spese di funzionamento dei centri di riferimento di cui al presente decreto, gli Istituti zooprofilattici sperimentali titolari, provvedono con le quote del Fondo sanitario nazionale annualmente assegnate.

Il presente decreto, inviato alla Corte dei conti per la registrazione, entra in vigore il giorno della pubblicazione nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 18 giugno 2009

p. Il Ministro
il Sottosegretario di Stato
MARTINI

Registrato alla Corte dei conti il 21 agosto 2009

Ufficio di controllo preventivo sui Ministeri dei servizi alla persona e dei beni culturali, registro n. 5, foglio n. 314

Decreto 18 giugno 2009

Art. 4

Le principali attività del Centro di Referenza Nazionale riguardano in via prioritaria:

1. la determinazione delle cause di morte per dolo a carico di specie selvatiche, o domestiche, oggetto, a qualsiasi titolo, di misure di salvaguardia e protezione
2. il rilevamento delle sostanze tossiche utilizzate a scopo doloso contro gli animali
3. le **analisi genetiche** per:
 - a) l'identificazione di specie selvatiche o di interesse venatorio a partire da tessuti e campioni forensi per la repressione del bracconaggio
 - b) l'identificazione individuale, la paternità, la determinazione del sesso, il riconoscimento degli ibridi intraspecifici per la lotta al commercio clandestino di animali selvatici
4. la formazione per il personale del servizio sanitario nazionale e per gli organi di polizia a livello territoriale

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA
Centro di Referenza Nazionale per la Medicina Forense Veterinaria

GROSSETO

Anatomo-istopatologia
Determinazione cause di morte
Balistica e Munizionamento
Formazione

RIETI

Genetica

FIRENZE

Tossicologia

ROMA

Diagnostica
Entomologia
Virologia, Batteriologia
Informatica, Elettronica, Grafica

Medicina Forense Veterinaria

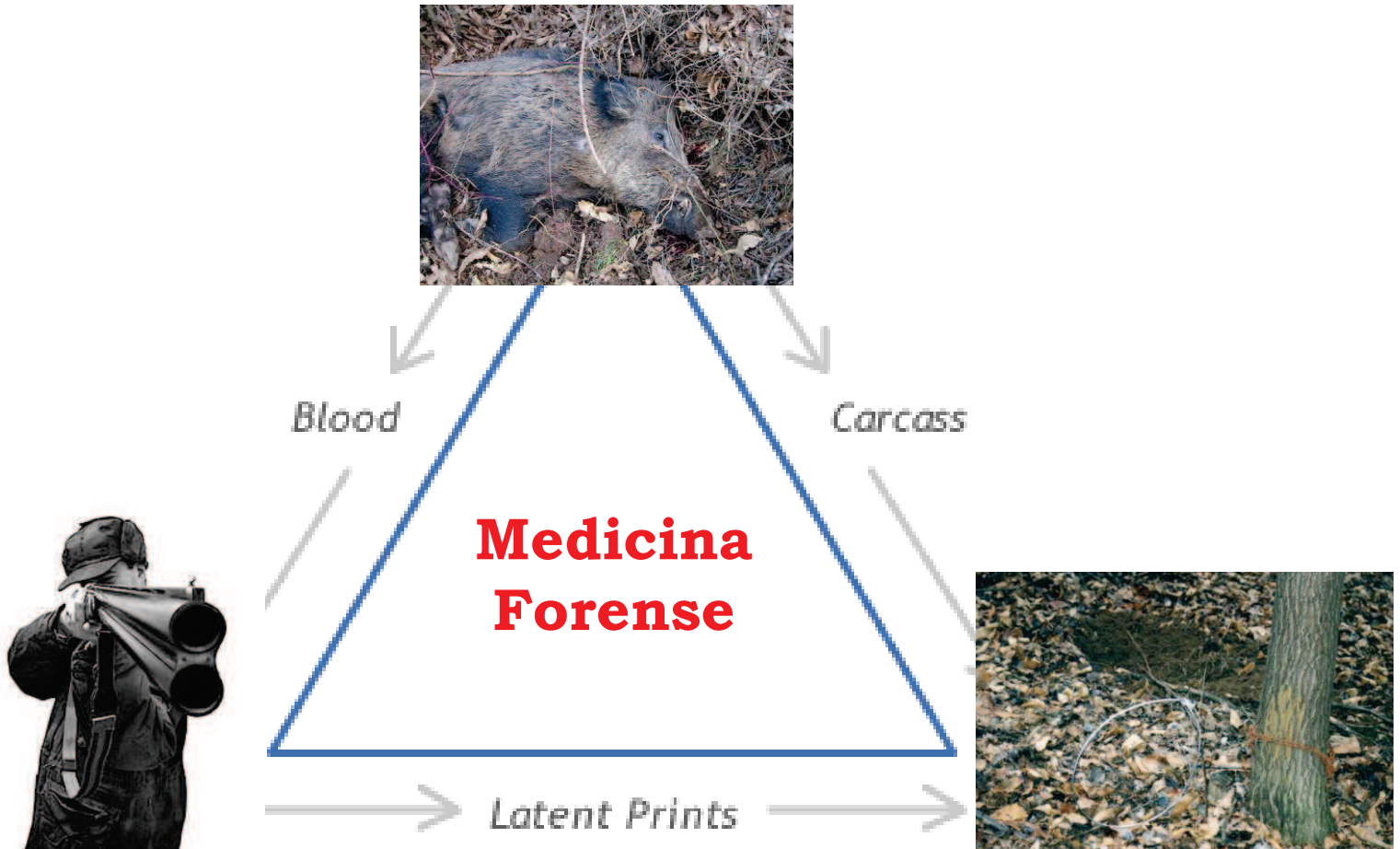
Branca della Medicina Legale che
utilizza le Scienze Forensi, mediche e
non, per le indagini connesse a casi
di interesse giudiziario
che riguardano i reati contro gli animali

Scienze Forensi

Aiutare i giudici, le giurie o chi ha titolo per farlo, a prendere delle decisioni per risolvere questioni legali (crimini o controversie civili)

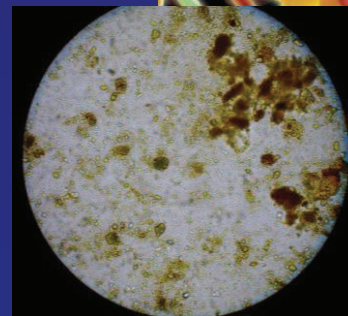
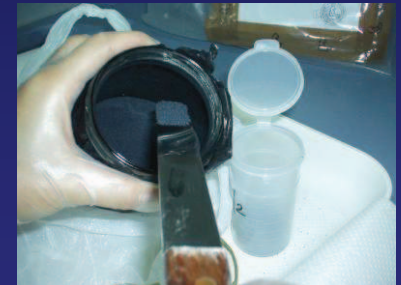
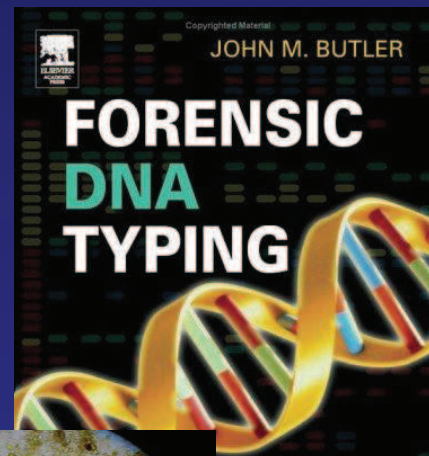
forensis: dal latino "prima che il forum"

Indagini Giudiziarie

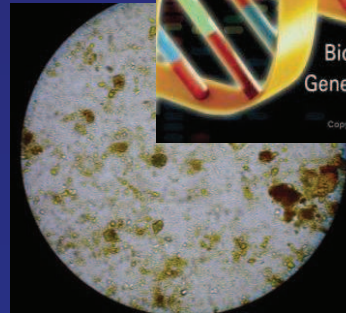
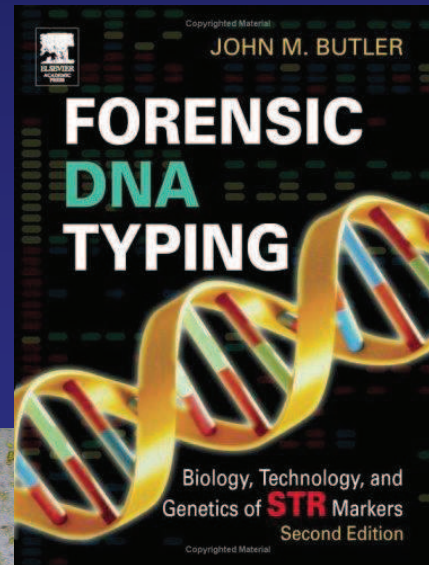


Gli strumenti

- Anatomico-istopatologia
- Tossicologia
- Genetica
- Entomologia
- Botanica
- Odontologia
- Balistica
-



Genetica Forense



Diagnostica Forense Animale

Identificazione di specie

DNA match

(corrispondenza tra due profili genetici)

Determinazione del sesso

Test di paternità

Parentele

Identificazione della popolazione di origine

(forme affini appartenenti allo stesso *taxon*)

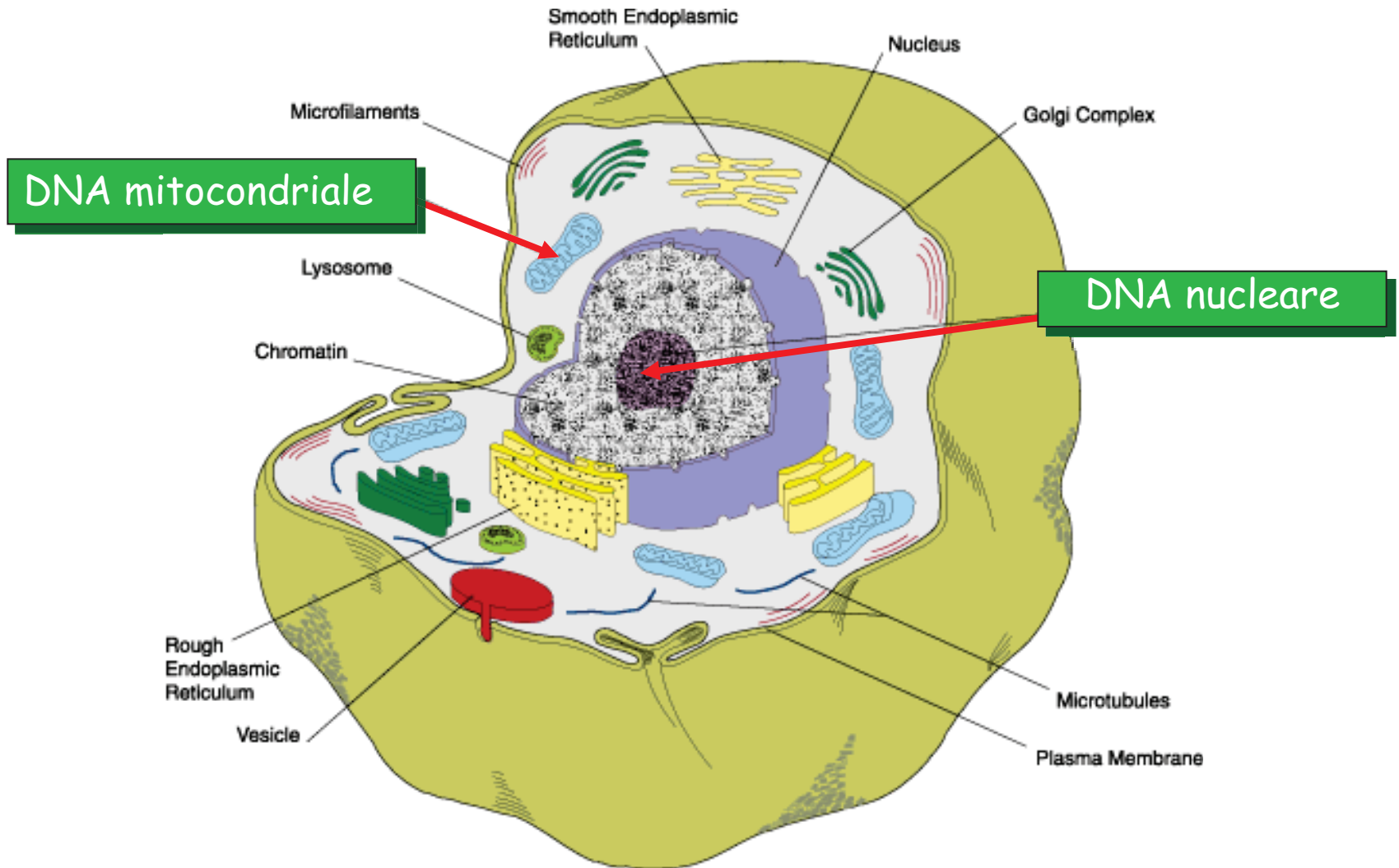
Riconoscimento degli ibridi intraspecifici

**VARIABILITA'
GENETICA**

DIFFERENZIAMENTO



Marker Diagnostici



Variabilità Genetica

a) variabilità di sequenza

.....GAATCAAGGATC.....

.....GAATGAAGGTTC.....

b) variabilità di lunghezza

...(CA)₂ (CA)₂(CA)₂(CA)₂...

..... (CA)₂(CA)₂(CA)₂.....

Variabilità Genetica

DNA nucleare ripetitivo

STR Short Tandem Repeats

Microsatelliti

variabilità di lunghezza

...(CA)₂ (CA)₂(CA)₂(CA)₂...

..... (CA)₂(CA)₂(CA)₂.....

STR

Unità costituite da corte sequenze
di 2-6 basi ripetute “in tandem”

perfetti

$(CG)_n$

$(CTG)_n$

$(TAAA)_n$

imperfetti o interrotti

$(GT)_3AT(GT)_5$

$(CA)_2CATG(CA)_2$

STR

allele 126



.....GAATCAAGGATC(CA)₂(CATG)₂(CA)₂CCTAGTCCTATC...



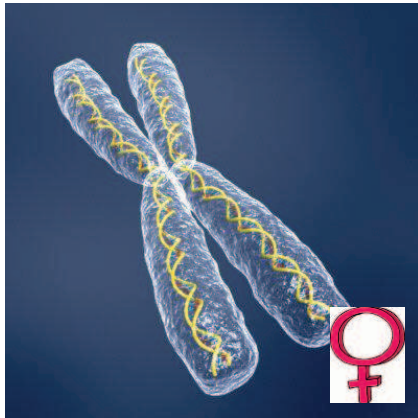
..GAATCAAGGATC (CA)₂ (CA)₂(CATG)₂(CA)₂CCTAGTCCTATC...

allele 130

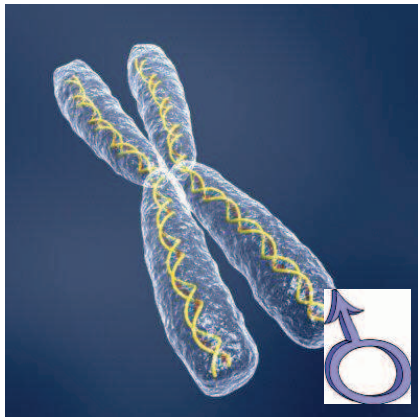
DNA nucleare ripetitivo

STR (Short Tandem Repeats)

Microsatelliti



.....GAATCAAGTC(CA)₂(CATG)₂(CA)₂CCTAGTCCTC...



...GAATCAAGTC(CA)₂(CA)₂(CATG)₂(CA)₂CCTAGTCCTC...

Caratteristiche

Biparentali

Specie-specifici

Eredità mendeliana semplice

Non codificanti

Alta instabilità (tasso mutazione $\approx 10^{-3}$)

STR....altre caratteristiche

❖ Meccanismo di Mutazione:

appaiamento asimmetrico - DNA slippage (**replicazione**)

conversione genica/crossing-over ineguale (**ricombinazione**)

❖ Modello mutazionale: Stepwise Mutation Model

❖ Funzione biologica: ??

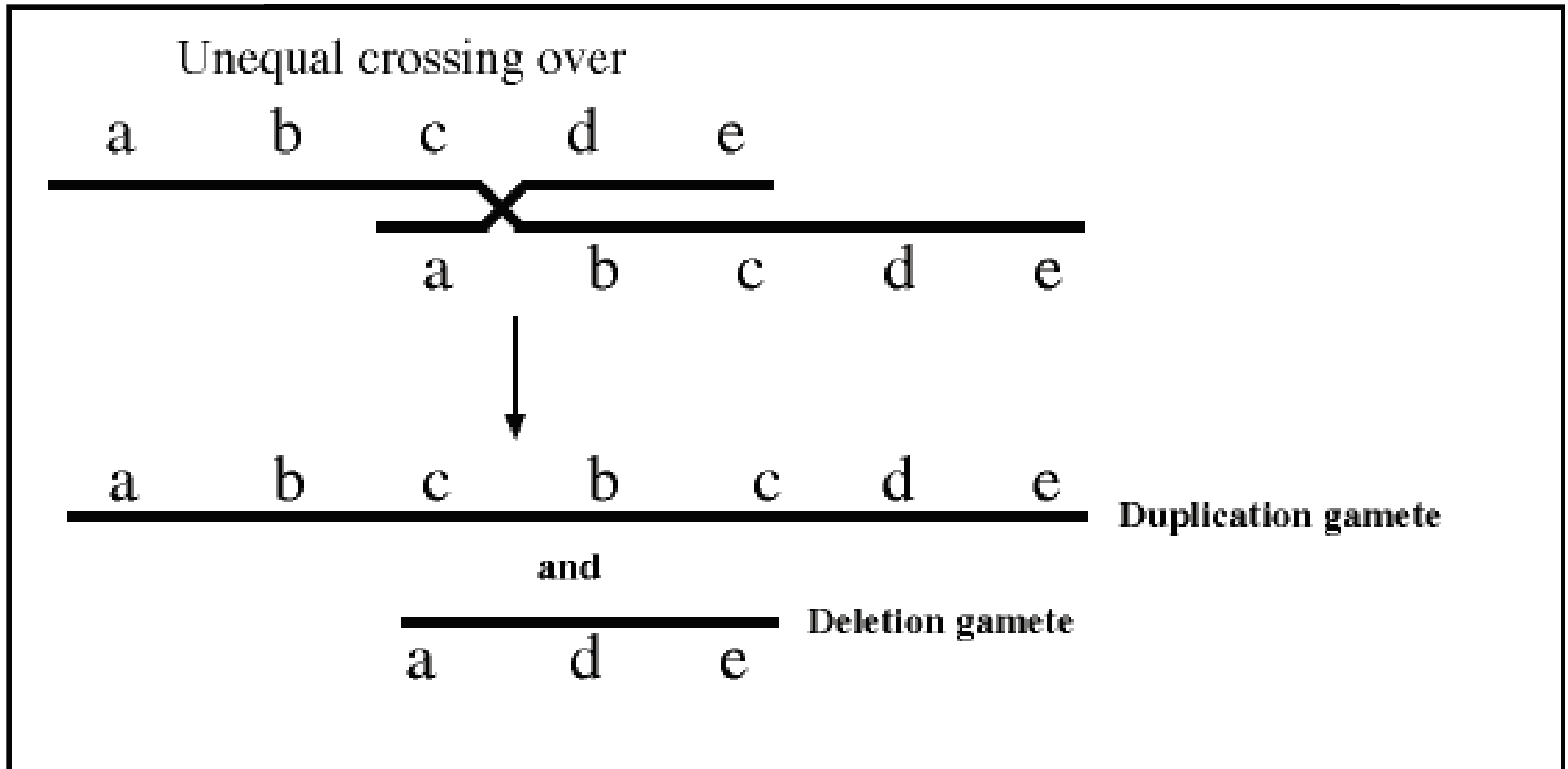
DNA slippage

5' - AATCCTAGTATATA → → →
3' - TTAGGATCATATATGTGCTTAA - 5'

AG
T T
C A
5' - AATC TATA → → →
3' - TTAGGATCATATATGTGCTTAA - 5'

AG
T T
C A
5' - AATC TATATACA → → →
3' - TTAGGATCATATATGTGCTTAA - 5'

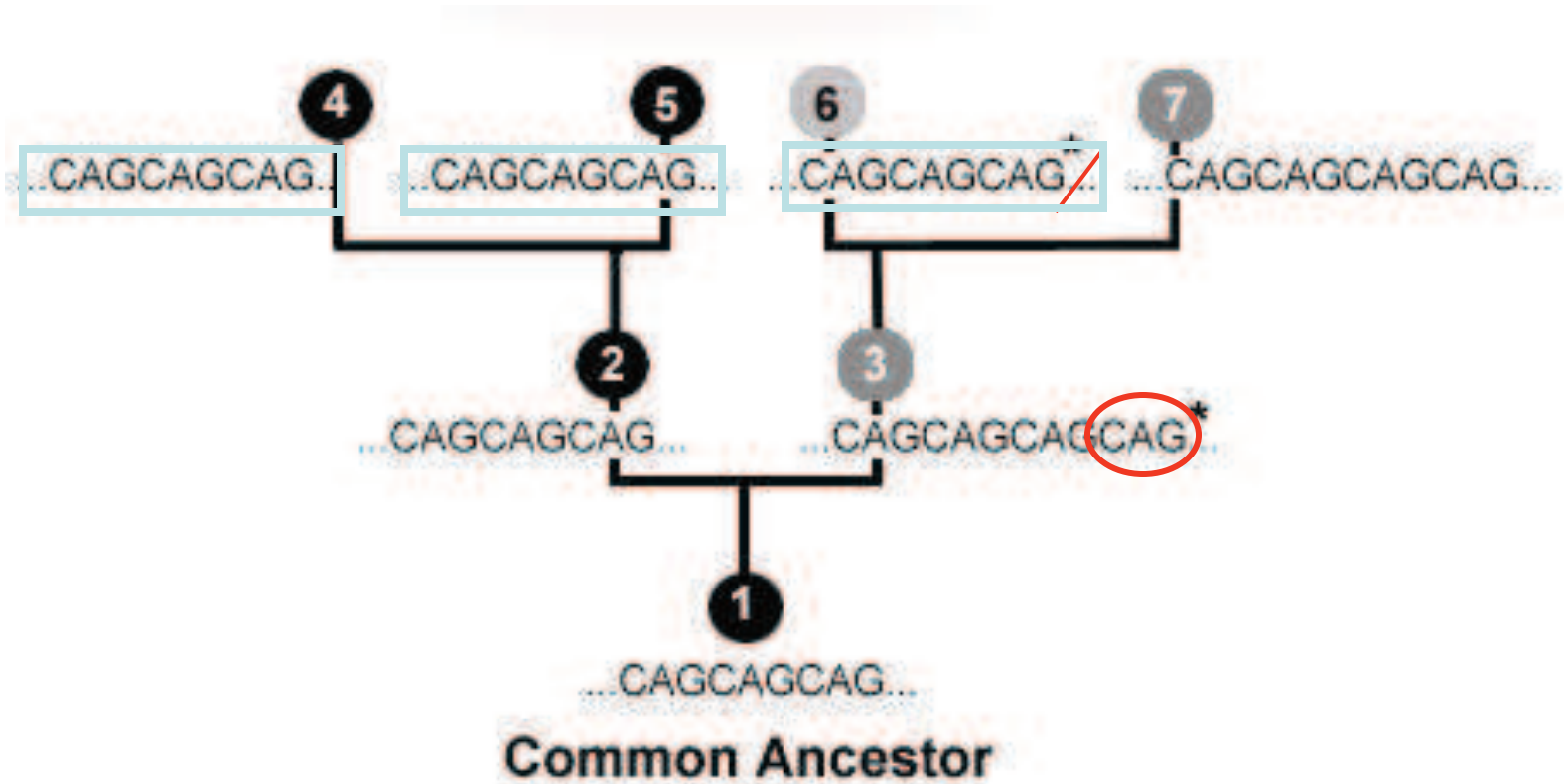
Crossing-over ineguale



Stepwise Mutation Model (SMM)

- ❖ Mutazione: acquisto/perdita di una unità ripetuta
- ❖ Memoria degli stati allelici precedenti
- ❖ Dimensione degli alleli *importante* per l'analisi statistica
- ❖ Problemi di omoplasia

Omoplasia



STR - Applicazioni

♪ Marker diagnostici di patologie ➡ Tumori
Sindrome X fragile
Distrofia miotonica

♪ Gene o linkage Mapping

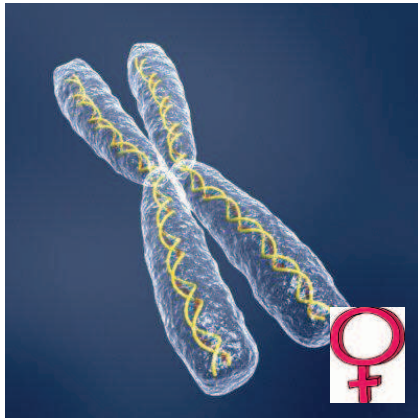
♪ Medicina forense ➡



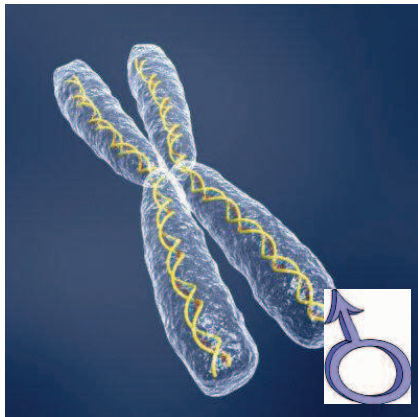
DNA nucleare ripetitivo

STR (Short Tandem Repeats)

Microsatelliti



.....GAATCAAGTC(CA)₂(CATG)₂(CA)₂CCTAGTCCTC...



...GAATCAAGTC(CA)₂(CA)₂(CATG)₂(CA)₂CCTAGTCCTC...

Servizi Diagnostici

DNA match

Paternità

Parentela

Popolazione di origine

(forme affini appartenenti allo stesso *taxon*)

ANALISI BIOSTATISTICA

Steps in Generating a Population Database

Decide on Number of Samples and Ethnic/Racial Grouping

Usually >100 samples per group

Gather Samples

Often anonymous samples from a blood bank (self-declared ethnicities)

Analyze Samples at Desired Genetic Loci

Summarize DNA types

Determine Allele Frequencies for Each Locus

The number of times each allele is observed is counted and divided by the total number of alleles measured

Perform Statistical Tests on Data

Hardy-Weinberg equilibrium for allele independence

Linkage equilibrium for locus independence

Ethnic/Racial Group 1

Ethnic/Racial Group 2

Examination of genetic distance between populations

Use Database(s) to Estimate an Observed DNA Profile Frequency

PopStats calculation

From Butler, J.M. (2005) Forensic DNA Typing, 2nd Edition, Figure 20.1, Elsevier Science/P Academic Press

DNA Statistics

For heterozygous loci

$$P = 2pq$$

P = probability; p and q are frequencies of allele in a given population

Example: For the locus D3S1358 and individual is 16,17 with frequencies of 0.2533 and 0.2152 respectively

$$P = 2(0.2533)(0.2152) = 0.1090 \text{ or } 1 \text{ in } 9.17$$

For independent loci, the genotype frequencies can be combined through multiplication...

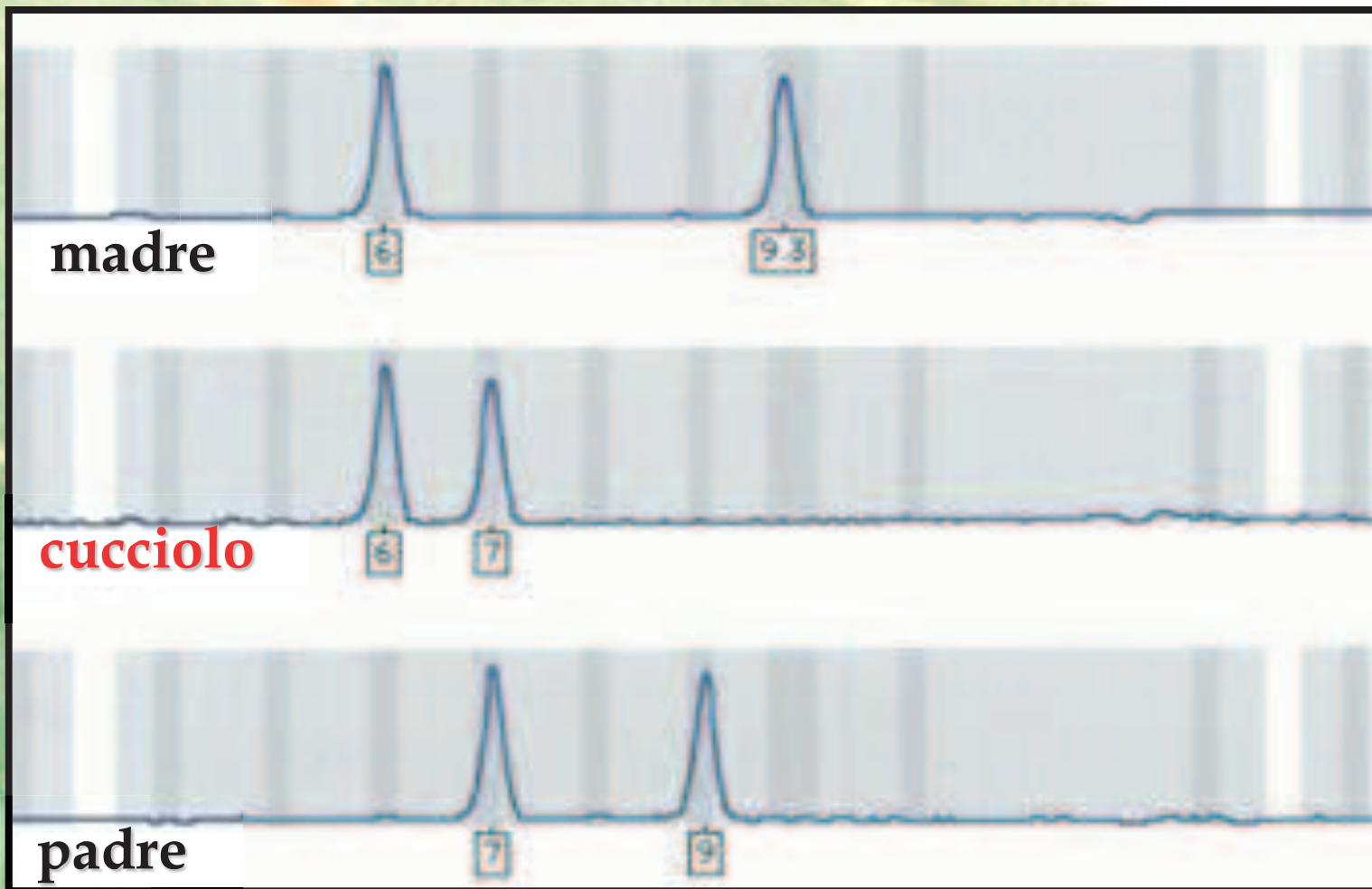
$$\text{Profile Probability} = (P_1)(P_2) \dots (P_n)$$

= 1 in a very large number...

**I risultati dei test del DNA si
esprimono in termini di
*Probabilità***

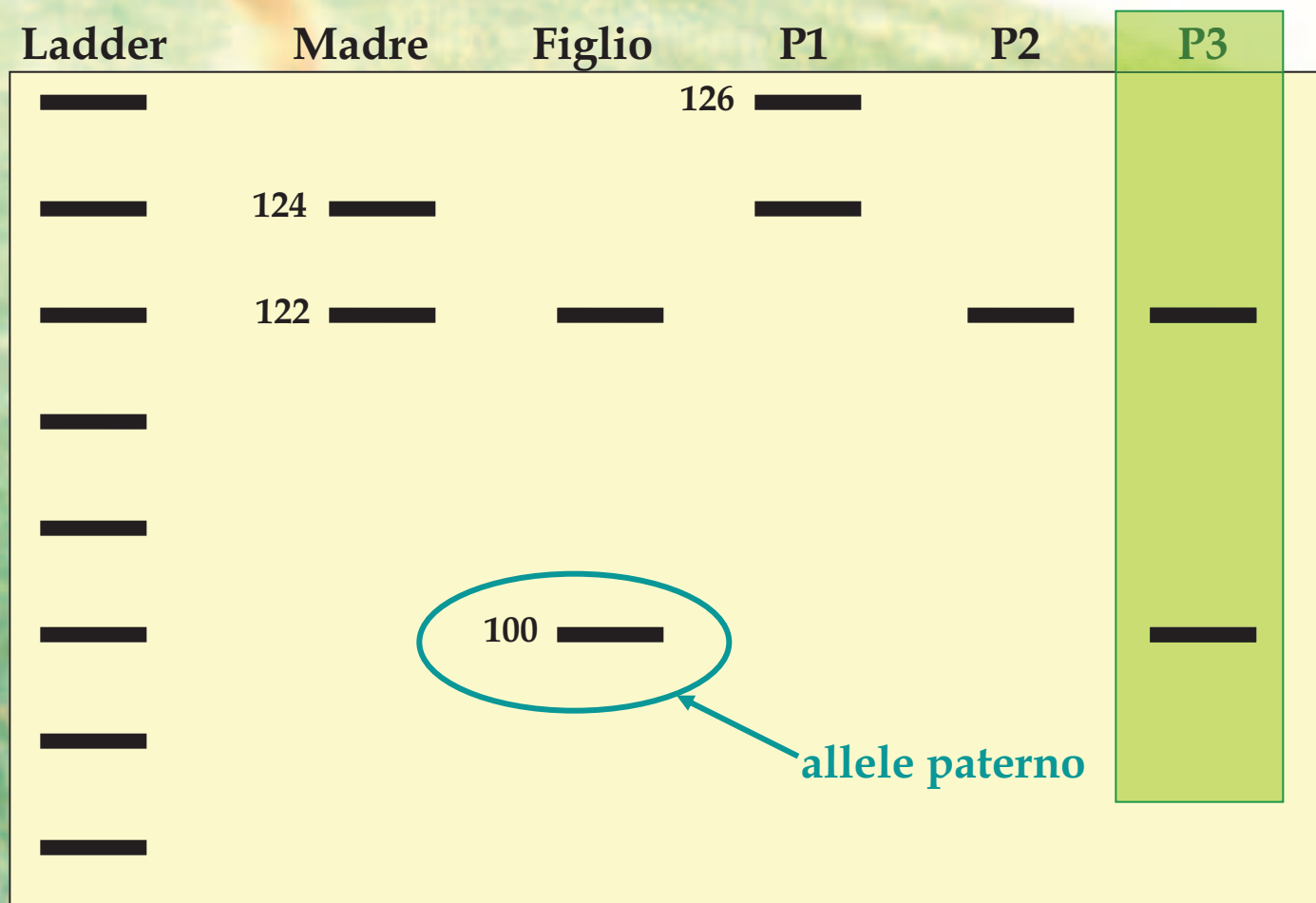
Test di paternità





i think i want a paternity test

Marker CPH4



i think i want a paternity test



Test di paternità

<i>CANIS</i>	21 Marker
<i>OVIS</i>	16 Marker
<i>SUS</i>	15 Marker
<i>CAPREOLUS</i>	21 Marker
.....	

i think i want a paternity test

Test di paternità

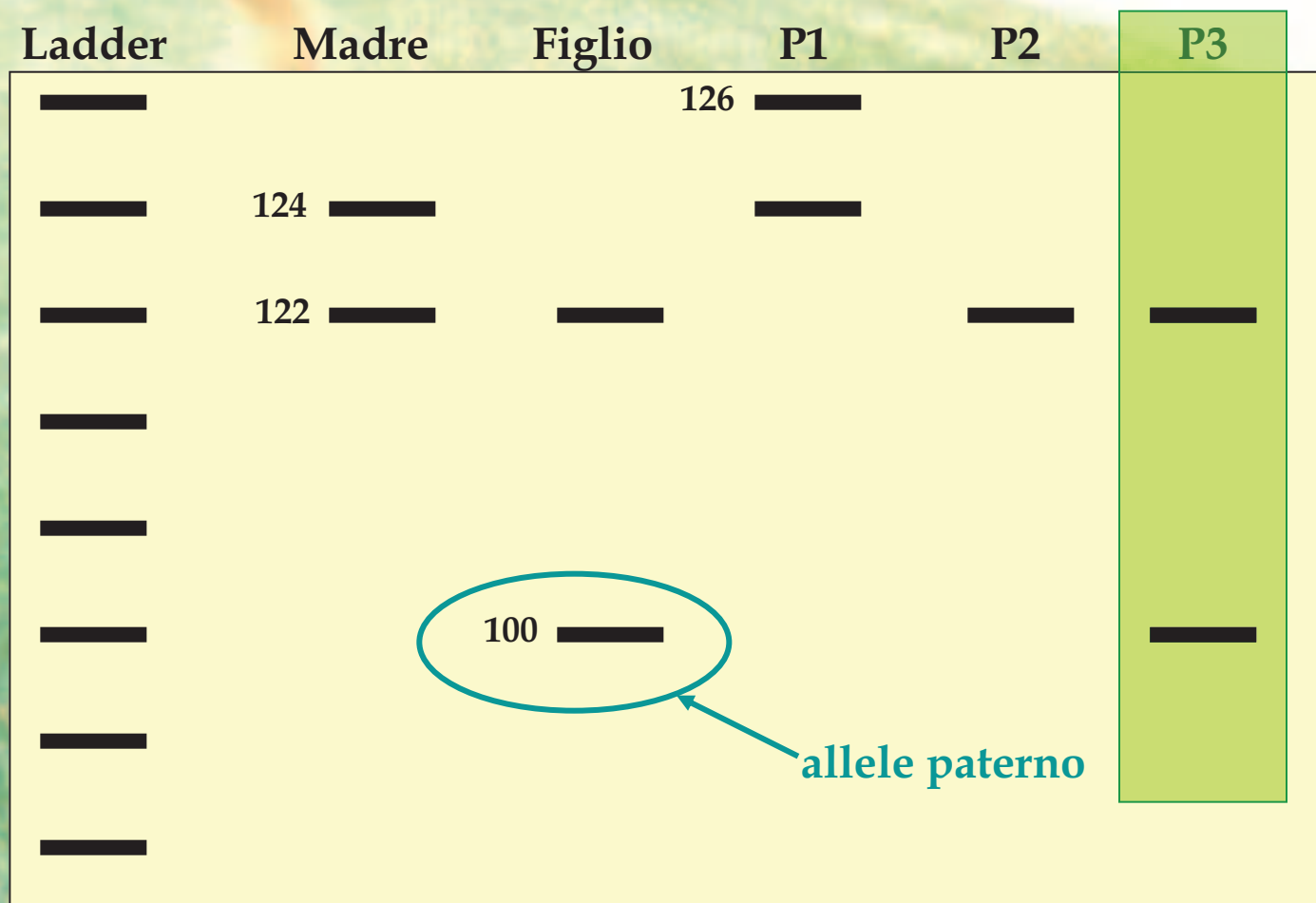
A) Esclusione

	figlio		padre		
Ta1	120	122	118	124	esclusione
Ta2	80	88	82	86	esclusione
Ta3	180	210	182	212	esclusione

B) Non esclusione (Attribuzione)

C) Inconclusione

Marker CPH4



i think i want a paternity test

Test di paternità

A) Esclusione

	figlio		padre		
Ta1	120	122	118	124	esclusione
Ta2	80	88	82	86	esclusione
Ta3	180	210	182	212	esclusione

B) Non esclusione (Attribuzione)

	figlio		padre		PI
Ta1	120	122	118	122	12.2
Ta2	80	88	80	80	4.0
Ta3	180	210	182	210	3.6

Calcolo Statistico

% probabilistica di Attribuzione

C) Inconclusione

Test di paternità

**La paternità viene espressa in termini di
PROBABILITA'**

Teorema di Bayes

$$\text{Rapporto di Verosimiglianza (LR)} = \frac{H_1 \text{ (ipotesi da testare)}}{H_0 \text{ (ipotesi nulla)}} = \frac{\text{Il soggetto X è il padre biologico}}{\text{il padre biologico è un altro soggetto diverso da X}}$$

LR > 1 l'ipotesi H_1 è più probabile

LR < 1 l'ipotesi H_0 è più probabile

LR = 0 stessa probabilità per entrambe le ipotesi

Test di paternità

**La paternità viene espressa in termini di
PROBABILITA'**

Teorema di Bayes

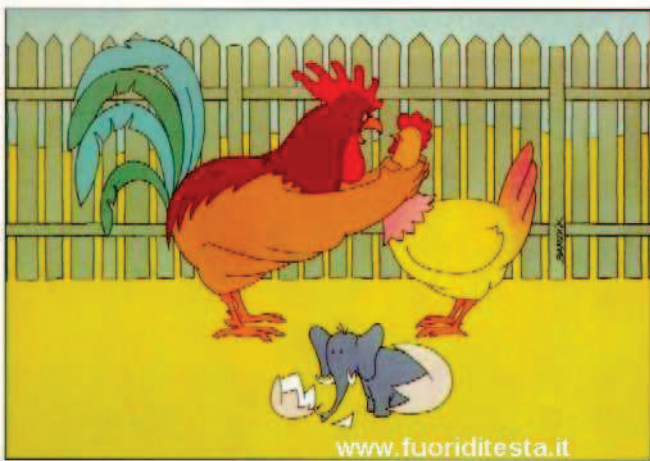
$$\text{Rapporto di Verosimiglianza (LR)} = \frac{H_1 \text{ (ipotesi da testare)}}{H_0 \text{ (ipotesi nulla)}} = \frac{\text{Il soggetto X è il padre biologico}}{\text{il padre biologico è un altro soggetto diverso da X}}$$

Formula di Essen-Moeller

$$\frac{1}{1 + [p (G/H_0) / p (G/H_1)]}$$



**Trasforma il valore numerico di LR
in una percentuale**



Test di paternità

Formula di Essen-Moeller

$$\frac{1}{1 + [p (G/H_0) / p (G/H_1)]}$$

Probabilità di Paternità = 99.72%
= paternità accertata

Locus	Allele paterno	Frequenza di popolazione	LR
Ta1	122	0.308	1.62
Ta2	88	0.041	12.2
Ta3	210	0.125	4.0
Ta4	114	0.139	3.6
Ta5	99	0.212	2.28
Ta6	133	0.176	5.68
Ta7	123	0.358	1.4
Ta8	84	0.274	1.82
Ta9	145	0.578	2.9
Ta10	110	0.345	4.62

Test di paternità

A) Esclusione

	figlio		padre		
Ta1	120	122	118	124	esclusione
Ta2	80	88	82	86	esclusione
Ta3	180	210	182	212	esclusione

B) Non esclusione (Attribuzione)

	figlio		padre		PI
Ta1	120	122	118	122	12.2
Ta2	80	88	80	80	4.0
Ta3	180	210	182	210	3.6

Calcolo Statistico

Percentuale di Attribuzione

C) Inconclusione

	figlio		padre1		padre2
Ta1	120	122	120	120	118 122
Ta2	80	88	80	90	88 92
Ta3	180	210	180	212	182 210

Test di paternità

	cucciolo10	cucciolo11	Madre3	Madre4
CHP4	120 122	118 122	118 122	120 122
CPH5	80 88	88 92	80 92	80 88
CPH8	180 210	182 210	180 210	182 210

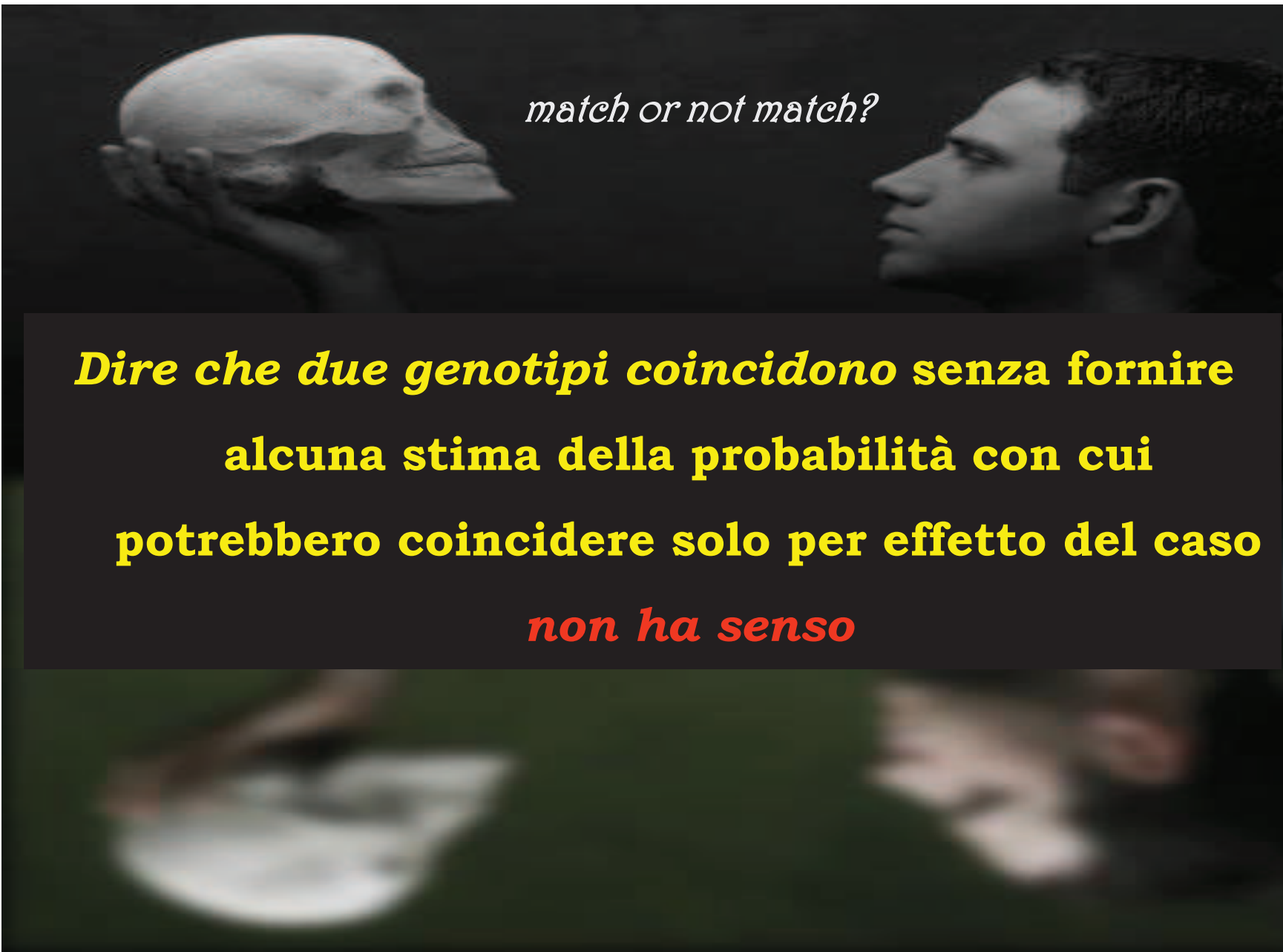
Offspring ID	Loci typed	Candidate mother ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Pair Delta	Pair confidence
Cucciolo_10	18	Madre_3	17	17	0	1,21E+01	0,00E+00	NS
Cucciolo_10	18	Madre_4	18	18	0	1,76E+01	5,50E+00	* P = 0.9981
Cucciolo_11	18	Madre_3	17	17	1	2,79E+00	0,00E+00	NS
Cucciolo_11	18	Madre_4	18	18	0	1,73E+01	1,45E+01	* P = 0.9989

La maternità dei cuccioli 10 e 11 è attribuita alla femmina 4 con una probabilità superiore al 99.8%

DNA typing - Analisi degli STR

Marker	Genotipo	Genotipo
Ta1	122-114	122-114
Ta2	88-90	88-90
Ta3	210-210	210-210
Ta4	114-120	114-120
Ta5	91-99	91-99
Ta6	133-133	133-133
Ta7	123-129	123-129
Ta8	78-84	78-84
Ta9	145-149	145-149
Ta10	110-110	110-110





match or not match?

***Dire che due genotipi coincidono senza fornire
alcuna stima della probabilità con cui
potrebbero coincidere solo per effetto del caso
non ha senso***

La significatività del "match"

Random Match Propability (RMP) (Prodotto tra eventi indipendenti)

La probabilità che il DNA di un individuo preso a caso dalla popolazione abbia lo stesso profilo genetico del campione in esame

	Locus	Allele 1	Frequenza di popolazione	Allele 2	Frequenza di popolazione	RMP	RMP combinata*
2pq	Ta1	122	0.246	114	0.754	0.370	
2pq	Ta2	88	0.540	90	0.460	0.497	0.164
p ²	Ta3	210	0.640			0.410	0.067
	Ta4

* = Regola del Prodotto

La significatività del "match"

Random Match Propability (RMP) (Prodotto tra eventi indipendenti)

La probabilità che il DNA di un individuo preso a caso dalla popolazione abbia lo stesso profilo genetico del campione in esame

**La Random Match Probability per questo
profilo, nella popolazione di lupi in Italia, è
 1.4×10^{-4}**

$$\text{LR} = 1 / \text{RMP} = \sim 1 \text{ in } 7000$$

La significatività del "match"

Random Match Propability (RMP)
(Prodotto tra eventi indipendenti)

Random Match Probability = ~1 in 7000

Interpretazione

E' 7000 volte più probabile che il profilo genetico ottenuto dal ciuffo di peli sequestrato nell'auto del sospettato sia lo stesso del lupo bracconato, piuttosto che sia quello di un altro lupo preso a caso dalla popolazione