

RELAZIONE TECNICA

Indagini Biologico-Molecolari per Accertamento di Paternità

PROSPETTO RIASSUNTIVO DELL'ANALISI

ANALISI

INDAGINE DI PATERNITA'

PERSONE SOTTOPOSTE AL TEST	Campione Biologico		
	Prelievo Ematico	Padre	XXXXXXXXXX
	Prelievo Ematico	Figlio	XXXXXXXXXX
	Prelievo Ematico	Madre	XXXXXXXXXX

QUESITO	Accertare la Paternità tra i seguenti soggetti: XXXXXXXXXX e XXXXXXXXXX.
---------	--

MARCATORI GENETICI INVESTIGATI

MICROSATELLITI (STR)

Marcatore	Padre	Figlio	Madre
D8S1179	11/12	11/15	8/15
D21S11	30/31.2	31.2/32.2	32.2/33.2
D7S820	10/10	10/11	11/11
CSF1PO	12/12	8/12	8/11
D3S1358	14/19	17/19	17/18
TH01	6/7	6/7	6/6
D13S317	11/11	11/11	10/11
D16S539	10/11	11/13	12/13
D2S1338	17/18	18/21	16/21
D19S433	14/15	15/15	14/15
VWA	18/18	18/18	17/18
TPOX	8/9	8/8	8/8
D18S51	17/18	12/17	12/14
D5S818	10/13	10/11	11/11
FGA	21/26	21/21	21/24

GENOMA s.r.l.


Sede legale e Studi Medici : 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

Web: www.laboratorigenoma.it E-mail: info@laboratorigenoma.it

La nomenclatura allelica si basa sul numero di unità ripetute presenti (es. allele 14 = 14 unità ripetute)

CONCLUSIONI

Dal calcolo statistico emerge una ATTRIBUZIONE della paternità di XXXXXXXXXX (Presunto Padre), nei confronti di XXXXXXXXXX (figlia), con una probabilità di paternità maggiore del 99,999%.

Informazioni sul Test di Paternità

COS'È IL TEST DI PATERNITÀ

L'analisi del DNA per l'esecuzione del test di paternità si basa sul rilevamento di normali variazioni che sono presenti a livello di molte regioni del materiale genetico di ogni individuo (polimorfismo). Per ogni individuo, la determinazione contemporanea di queste variazioni permette di derivare un profilo genetico. Ad eccezione dei gemelli monozigoti che risultano perfettamente uguali, il profilo genetico di ogni individuo è praticamente unico, come le impronte digitali. Questa caratteristica è alla base della metodologia utilizzata per determinare se due persone sono correlate geneticamente. Il profilo genetico di un figlio/a sarà costituito da metà profilo genetico materno e metà profilo genetico paterno. Quindi, il padre presunto per essere considerato padre biologico dovrà possedere metà del profilo genetico presente nel figlio/a. La paternità viene **ESCLUSA** nel caso in cui le caratteristiche genetiche del padre putativo discordino con quelle del figlio oggetto di indagine. La paternità viene, invece, **ATTRIBUITA** qualora le caratteristiche genetiche del padre e del figlio concordino.

In quest'ultimo caso, viene effettuata un'analisi statistica dei risultati ed infine viene fornita una percentuale di attribuzione che sarà tanto più prossima al 100% quanto maggiore sarà il numero di regioni polimorfiche del DNA analizzate, e quanto meno frequenti sono le caratteristiche genetiche riscontrate.

Queste regioni polimorfiche del DNA investigate sono ereditate in maniera tra loro indipendente, e per la loro straordinaria variabilità interindividuale determinano la formazione di un numero molto elevato di combinazioni genotipiche. La distribuzione di tale variabilità biologica nella popolazione fa sì che solo pochissimi individui presi a caso possiedano caratteristiche genetiche identiche, e tale identità, se presente, è limitata solamente ad alcuni sistemi polimorfici investigati. Ciò rende possibile sia l'Esclusione di Paternità, sia un giudizio dapprima di Compatibilità, e successivamente, dopo valutazione statistica dei risultati, di Probabilità di Paternità.

Come si effettua il test di paternità

La prima fase del test di paternità consiste nell'**estrazione del DNA** dai campioni biologici prelevati per l'esame. Nel DNA risiede l'informazione genetica che presiede alla sintesi delle proteine che organizzano le cellule. Il tratto di DNA che contiene un'informazione genetica viene definito **gene**, e la sua localizzazione sui cromosomi viene definita **locus** (plurale loci). Forme alternative dello stesso gene vengono definite alleli. Un gene che mostra più alleli viene definito

GENOMA s.r.l.

Numero Verde Servizio Clienti
800.501.651

Sede legale e Studi Medici: 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

Web: www.laboratorigenoma.it E-mail: info@laboratorigenoma.it

polimorfico. Per ogni locus, un individuo eredita un allele dalla madre e un allele dal padre; se gli alleli ereditati sono uguali, l'individuo è omozigote, se sono diversi, l'individuo è eterozigote. La derivazione del profilo genetico di un individuo implica la determinazione degli alleli presenti in determinati loci altamente polimorfici.

La determinazione del profilo genetico di un individuo comporta la genotipizzazione di **15** regioni del DNA (loci) altamente polimorfiche in lunghezza, variabili da individuo ad individuo, conosciute come regioni **Microsatelliti** o **STR** (*Short Tandem Repeat*).

L'analisi dei microsatelliti viene condotta mediante una reazione enzimatica di amplificazione del DNA, conosciuta come **Polymerase Chain Reaction (PCR)**, che consente di amplificare in vitro una specifica regione del DNA copiandola in varie fasi successive, fino ad ottenerne milioni di copie. In pratica, considerando la molecola del DNA come un grosso libro, e ciascuna delle regioni Microsatelliti (STR) investigate come una pagina di questo libro, con la metodica di PCR si "fotocopia" milioni di volte questa pagina, fino ad ottenerne una quantità idonea per l'esecuzione dell'esame.

Dopo la reazione di amplificazione enzimatica il profilo genetico viene determinato automaticamente mediante l'impiego di un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente.

Risultati del test di paternità

I risultati del test di paternità vengono valutati attraverso il confronto tra gli assetti dei singoli polimorfismi nel trio padre presunto, figlio/a, madre. Normalmente, il classico test di paternità consiste inizialmente nella valutazione dell'insieme delle caratteristiche che costituiscono il profilo genetico del figlio e della madre. Tutte le caratteristiche genetiche del figlio che non sono presenti nella madre devono essere state obbligatoriamente ereditate dal padre biologico. Se il padre presunto possiede nel suo profilo genetico queste caratteristiche risulta essere il padre biologico (**attribuzione di paternità**). Se al contrario, il padre presunto non possiede queste caratteristiche genetiche, egli viene escluso come padre biologico (**esclusione di paternità**).

In pratica, se il profilo genetico del figlio e del padre presunto differiscono per due o più caratteristiche genetiche l'**ESCLUSIONE è certa** (0% di probabilità di essere il padre biologico). Al contrario, se il profilo genetico del figlio e del padre presunto concordano per ogni caratteristica genetica analizzata, si ottiene un'**ATTRIBUZIONE** della paternità. In quest'ultimo caso, viene effettuata un'**analisi statistica** dei risultati ed infine viene fornita una **percentuale di attribuzione** che sarà tanto più prossima al 100% quanto maggiore sarà il numero di regioni del DNA analizzate. L'esame di **15** regioni STR generalmente consente di raggiungere una percentuale di attribuzione (**probabilità di paternità**) superiore al **99,99%**. Questo valore probabilistico indica che il padre presunto è praticamente il padre biologico.

La probabilità finale di paternità non potrà mai raggiungere il valore del 100% matematico. Nell'accertamento di paternità il valore del 100% matematico non è necessario: è infatti accettato dalla giurisprudenza italiana che la paternità è da considerarsi come "praticamente certa" quando la probabilità di paternità supera il valore del 99,72%.

Mutazioni

Il fenomeno delle mutazioni ricorre con una frequenza relativamente elevata nei microsatelliti, in media ogni 1000-10.000 meiosi. L'occorrenza di una mutazione (o molto raramente di due) impone l'analisi di un numero elevato di marcatori genetici polimorfici. Inoltre, un risultato di esclusione della paternità biologica, proprio a causa della possibilità di ricorrenza di tali mutazioni, dovrebbe derivare dall'individuazione di almeno 2/3 incompatibilità genetiche.

CALCOLO BIOSTATISTICO

Premessa

Al fine di stabilire l'Esclusione o l'Attribuzione della paternità in esame, i polimorfismi del DNA del campione biologico del presunto padre vengono comparati con quelli del figlio. La prima fase dell'analisi consiste nel verificare che il presunto padre possenga o meno, in ciascuna regione

GENOMA s.r.l.**800.501.651**

Sede legale e Studi Medici: 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

Web: www.laboratoriogenoma.it E-mail: info@laboratoriogenoma.it



polimorfica del DNA esaminata, almeno un carattere genetico compatibile con il figlio. In caso di compatibilità, si passa alla successiva analisi statistica per calcolare la probabilità di paternità.

Analisi Statistica.

Dopo la constatazione di compatibilità, si è passati al calcolo della **probabilità di paternità (P)** nei confronti del presunto padre.

La probabilità di paternità è un valore numerico che esprime la probabilità del padre putativo di essere il padre biologico di un figlio oggetto di accertamento di paternità. A tal fine, è stata calcolata la probabilità della ipotesi (H1) che il soggetto PADRE sia il padre biologico del campione FIGLIO in esame $p(G/H1)$ rispetto alla probabilità dell'ipotesi (Ho) che il padre presunto non sia il padre biologico, e che quindi detta compatibilità sia solo casuale $p(G/Ho)$.

Il rapporto tra i due termini sopra detti, $p(G/H1) / p(G/Ho)$, rappresenta il **rapporto di verosimiglianza** o **Likelihood Ratio (LR)**, il cui valore sarà tanto più elevato quanto più probabile è l'ipotesi H1, cioè che il soggetto PADRE sia davvero il padre biologico del campione FIGLIO. La verifica dell'ipotesi H1 è stata effettuata mediante l'applicazione del Teorema di Bayes, come modificato da **Essen-Moeller**, che attualmente rappresenta la formula più in uso per il calcolo di un rapporto di parentela di un individuo.

La formula di Essen- Moeller ha la caratteristica di esprimere in percentuale la probabilità di paternità (P) che risulta dall'analisi dei polimorfismi considerati, ed è espressa nel modo seguente:

$$P = \frac{1}{1 + [p(G/Ho) / p(G/H1)]} = \frac{1}{1 + 1/r}$$

$p(G/H1) = X$ rappresenta la probabilità complessiva che il presunto padre abbia fornito l'allele non materno al figlio oggetto di indagine di paternità. Tale probabilità si ottiene confrontando i genotipi del presunto padre e del figlio per la serie di sistemi polimorfici analizzati, ed assume un valore uguale ad 1 nel caso in cui il padre presenta l'allele paterno (cioè l'allele che è stato riscontrato nel figlio) in stato di omozigosità, mentre è uguale a 0.5 nel caso detto allele è presentato in stato di eterozigosità. Il prodotto di queste probabilità fornisce la probabilità totale che il figlio abbia potuto ricevere gli alleli in questione dalla persona oggetto di indagine di paternità.

$p(G/Ho) = Y$ rappresenta la probabilità di compatibilità casuale tra il fenotipo del presunto padre biologico ed il figlio. Tale probabilità Y va calcolata considerando la frequenza del fenotipo riscontrato nel presunto padre nella popolazione italiana.

Il rapporto tra queste due probabilità condizionali rappresenta la cosiddetta **PATERNITY RATIO (r)**

$$r = p(G/H1) / p(G/Ho) = X/Y$$

Applicando la formula di Essen- Moeller (basata sui principi della probabilità Bayesiana) al presente caso, si ottiene una **Probabilità di paternità:**

$$P (\%) > 99,999$$

Tale valore percentuale ha un altissimo significato statistico se rapportato al fatto che per valori di $P > 99.72$ la parentela è praticamente provata (tabella 1).

La formula di Essen- Moeller applicata è incorporata in un protocollo di analisi computerizzata, il cui algoritmo utilizza le frequenze geniche relative alla popolazione italiana.

Tabella 1. Valori di P (o di r) e "predicati verbali" (fonte: Walker RH ed., Inclusion probabilities in

GENOMA s.r.l.



Sede legale e Studi Medici: 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

Web: www.laboratorigenoma.it E-mail: info@laboratorigenoma.it

parentage testing. AABB, Arlington, pag.241, 556, 589, 1983)

P	Predicato Verbale	r
99,99% -----		9999
	Paternità praticamente provata	
99,90% -----		999
	Paternità altamente probabile	
99,73% -----		369
99,00% -----		99
	Paternità molto probabile	
95,00% -----		19
	Paternità probabile	
90,00% -----		9
	Indicazione positiva	
80,00% -----		4
	Indifferente	
50,00% -----		1

AFFIDABILITÀ DEL TEST E CONTROLLI DI QUALITÀ

L'indagine di paternità mediante analisi del DNA è un test completamente affidabile, utilizzabile anche nelle delicate indagini giudiziarie. Per raggiungere la massima attendibilità dei risultati, il Laboratorio segue standards di qualità previsti nelle linee-guida e nelle direttive che a vari livelli vengono emanate dalle comunità scientifiche internazionali e nazionali.

I sistemi genetici utilizzati sono stati selezionati in maniera tale da essere sufficientemente robusti, informativi, trasmissibili secondo le regole della segregazione mendeliana (ossia di padre/madre in figlio) ed essere accompagnati da un adeguato corredo di dati sulle frequenze nella popolazione.

L'accertamento di paternità condotto dal Ns. Laboratorio è un'analisi completamente **automatizzata**, eseguita mediante un **sequenziatore automatico** a tecnologia fluorescente multicolore, che rappresenta quanto di meglio offre al momento la moderna tecnologia:

Le prove di laboratorio sono state condotte in conformità rispetto alle direttive della International Society of Forensic Genetics (ISFG). In particolare:

- sono stati esaminati marcatori polimorfici ben caratterizzati sul piano molecolare e biologico;
- l'identificazione dei caratteri che compaiono in una segregazione è stata effettuata in comparazione con un ladder allelico sequenziato, contenente le principali varianti caucasiche;
- adeguate tavole di frequenze geniche sono disponibili per la popolazione italiana relativamente a ciascuno dei marcatori analizzati.

DESCRIZIONE TECNICA DELL'ANALISI

Estrazione del DNA

L'analisi del DNA utilizza varie tecniche che vengono applicate su questa molecola, successivamente alla sua estrazione dal nucleo cellulare.

La prima fase (estrazione), che ha lo scopo di isolare il DNA genomico, viene eseguita mediante l'impiego di protocolli di estrazione riconosciuti ed approvati in ambito scientifico (metodica "Chelex" e metodica "classica")

GENOMA s.r.l.

Numero Verde Service Client
800.501.651

Sede legale e Studi Medici : 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

Web: www.laboratorigenoma.it E-mail: info@laboratorigenoma.it

fenolo-cloroformio).

Amplificazione del DNA mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)

Le regioni del DNA investigate sono rappresentate da sequenze ripetute altamente polimorfiche in lunghezza e variabili da individuo ad individuo conosciute come regioni **Microsatelliti** o **STR (Short Tandem Repeat)**.

L'analisi dei microsatelliti viene condotta mediante una reazione enzimatica di amplificazione del DNA, conosciuta come **Polymerase Chain Reaction (PCR)**, che consente di amplificare in vitro una specifica regione del DNA copiandola in varie fasi successive, fino ad ottenerne milioni di copie. La PCR impiega come iniziatori della reazione una coppia di oligonucleotidi a sequenza nota (primers), marcati all'estremità 5' con coloranti fluorescenti, che delimitano ciascuna regione polimorfica del DNA da investigare ed al termine del processo di amplificazione vengono incorporati nel prodotto di PCR.

La tecnica della PCR consiste in una reazione di polimerizzazione a catena realizzata mediante ripetizioni cicliche di tre operazioni che si svolgono in diverse condizioni di temperatura. Nella prima fase, a temperatura elevata, la doppia catena del DNA si dissocia in singoli filamenti.

Nella seconda fase, svolta a temperatura sensibilmente più bassa, fondamentale per il riconoscimento delle sequenze "bersaglio", avviene l'ibridizzazione con inneschi o "primers" (sequenze di DNA conosciute e precedentemente sintetizzate e purificate). Un primer di ciascuna coppia presenta un gruppo fluorescente all'estremità 5', che ne permette la rivelazione mediante un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente. La terza fase del ciclo consiste nell'estensione dei "primers" ad opera della DNA Polimerasi (Taq- polimerasi). L'enzima sintetizza una catena complementare a quella originale che ha una lunghezza compresa tra i due inneschi.

Nel secondo e successivi cicli i "primers" si ibrideranno in "long product" in maniera simmetrica al ciclo precedente e la loro estensione terminerà in corrispondenza dell'altra estremità del bersaglio in maniera esponenziale secondo la potenza del 2 (2 elevato ad n).

Così con circa venti cicli si possono ottenere circa un milione di copie delle sequenze interessate.

Determinazione dei profili genetici ed analisi dei risultati

Il prodotto di PCR così ottenuto, costituito da uno (in caso di omozigosi) o due (in caso di eterozigosi) frammenti di DNA corrispondenti alla regione polimorfica analizzata, viene caratterizzato a seguito di corsa elettroforetica mediante l'impiego di un **sequenziatore automatico** a tecnologia fluorescente (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer). La successiva genotipizzazione segue una procedura completamente automatizzata, condotta mediante l'impiego del software Genotyper (Applied Biosystems). I frammenti di PCR sono analizzati e comparati con ladders allelici sequenziati, contenente le principali varianti caucasiche, specifici per ciascun sistema investigato. L'analisi statistica dei risultati segue una procedura computerizzata utilizzando un algoritmo basato sulla formula di Essen- Moeller.

Marcatori genetici investigati

Per la determinazione dei profili genetici è stato utilizzato il **kit AmpFISTR® Identifiler™** prodotto dalla Applied Biosystems, mediante il quale sono state amplificate le seguenti regioni STR:

HumTH01 (HOLGERSSON et al., Electrophoresis 1994, 15, 890-895); **D19S433** (Cooperative Human Linkage Center, accession nr. 135, GeneBank accession nr. G08036); **HumvWA** (Kimpton C.P. et al., 1992, Hum. Mol. Genet. Vol. 1 pag. 287); **D21S11** (SHARMA & LITT, 1992 Hum Mol Genet 1:67, GILL et al. 1997; For Sci Int 86:25). **HumFGA** (MILLS, K.A. et al. 1992, Human Molecular Genetics 1:779), **D18S51** (URQUHART et al. BioTechniques Vol. 18, n. 1 1995), **D16S539** (Cooperative Human Linkage Center, accession nr. 715, GeneBank accession nr. G07925), **D8S1179** (OLROYD et al. 1995; Electrophoresis 16:349), **D5S818**, **D7S820**, **D13S317**, **D3S1358**, **CSF1PO** (HAMMOND et al. 1994; Am J Hum Genet 55: 175), **TPOX** (ANKER et al. 1992; Am J Hum Genet 55: 175), **D2S1338** (Cooperative Human Linkage Center, accession nr. 41445, GeneBank accession nr. G08202);

GENOMA s.r.l.

Numero Verde Service Client
800.501.651

Sede legale e Studi Medici: 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

Web: www.laboratorioigenoma.it E-mail: info@laboratorioigenoma.it

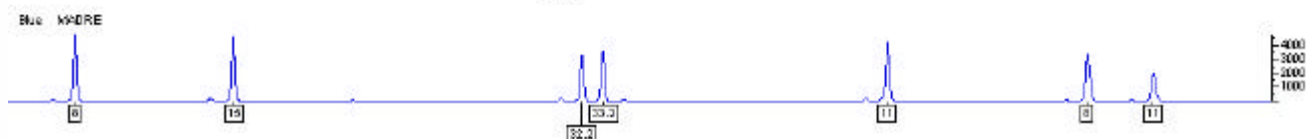
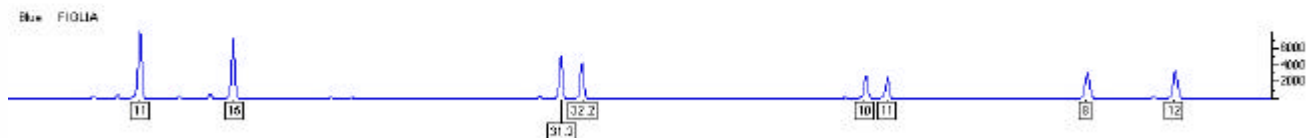
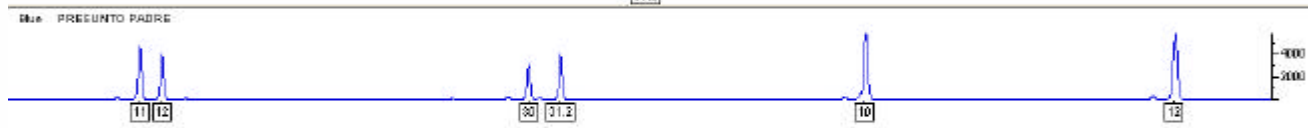
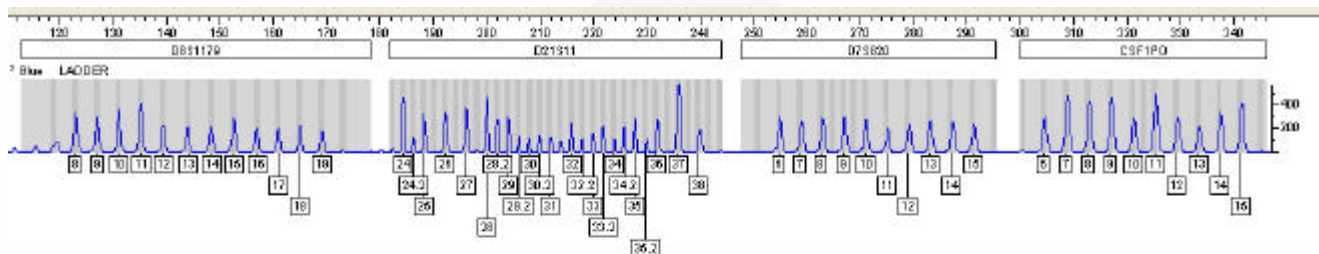
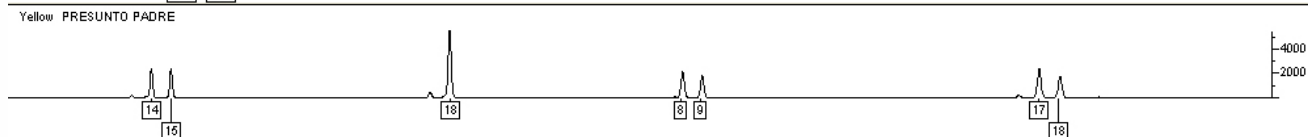
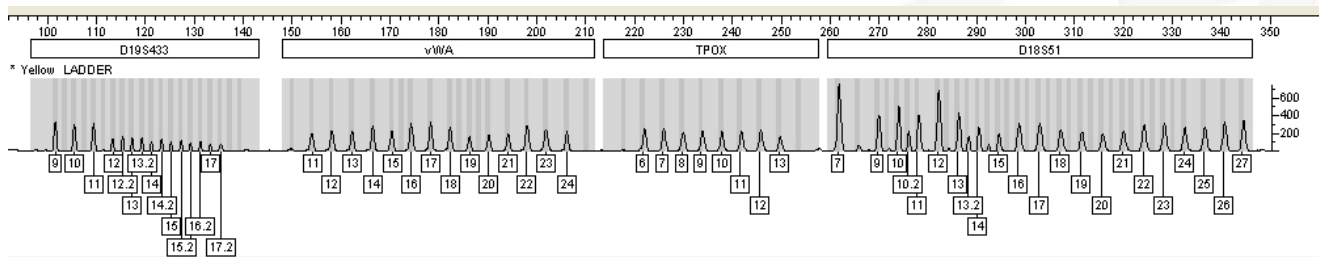


Locus	Localizzazione cromosomica	Alleli	(P _E)
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13,14, 15, 16, 17, 18, 19	0.680
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27,28, 28.2, 29, 29.2,30, 30.2, 31, 31.2,32, 32.2, 33, 33.2,34, 34.2, 35, 35.2,36, 37, 38	0.708
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15	0.582
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15	0.496
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16,17, 18, 19	0.630
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3,10, 11, 13.3	0.566
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13,14, 15	0.487
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12,13,14, 15	0.566
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19,20, 21, 22, 23, 24,25, 26, 27, 28	0.725
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2,13, 13.2, 14, 14.2,15, 15.2, 16, 16.2,17, 17.2	0.531
vWA	12p12-pter	11,12, 13, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24	0.625
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13	0.329
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12,13, 13.2, 14, 14.2,15, 16, 17, 18, 19,20, 21, 22, 23, 24,25, 26, 27	0.731
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15, 16	0.440
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26,26.2, 27, 28, 29, 30,30.2, 31.2, 32.2,33.2, 42.2, 43.2,44.2, 45.2, 46.2,47.2, 48.2, 50.2,51.2	0.766
Amelogenin X/Y	Xp22.1-22.3/ Yp11.2	X, Y	
		Combined (P_E)	0.9999992

(P_E) = Probabilità di esclusione.

Roma, 21 febbraio 2006

Il direttore
Dr. Francesco Fiorentino


GENOMA s.r.l.

 Numero Verde Service Client
800.501.651

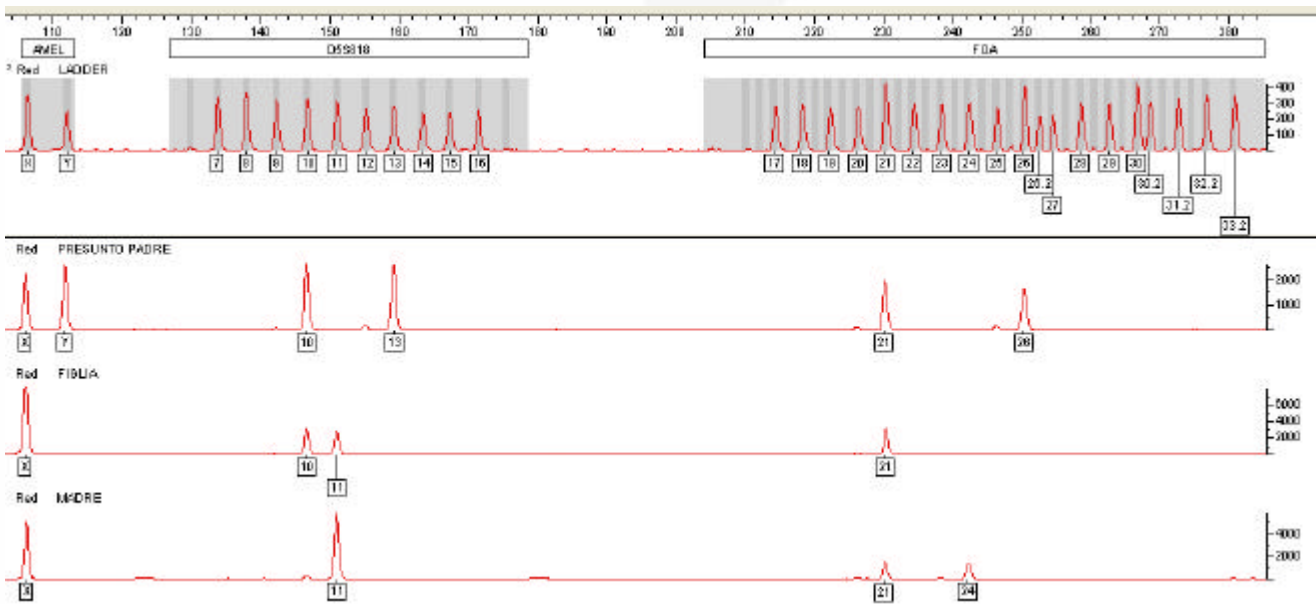
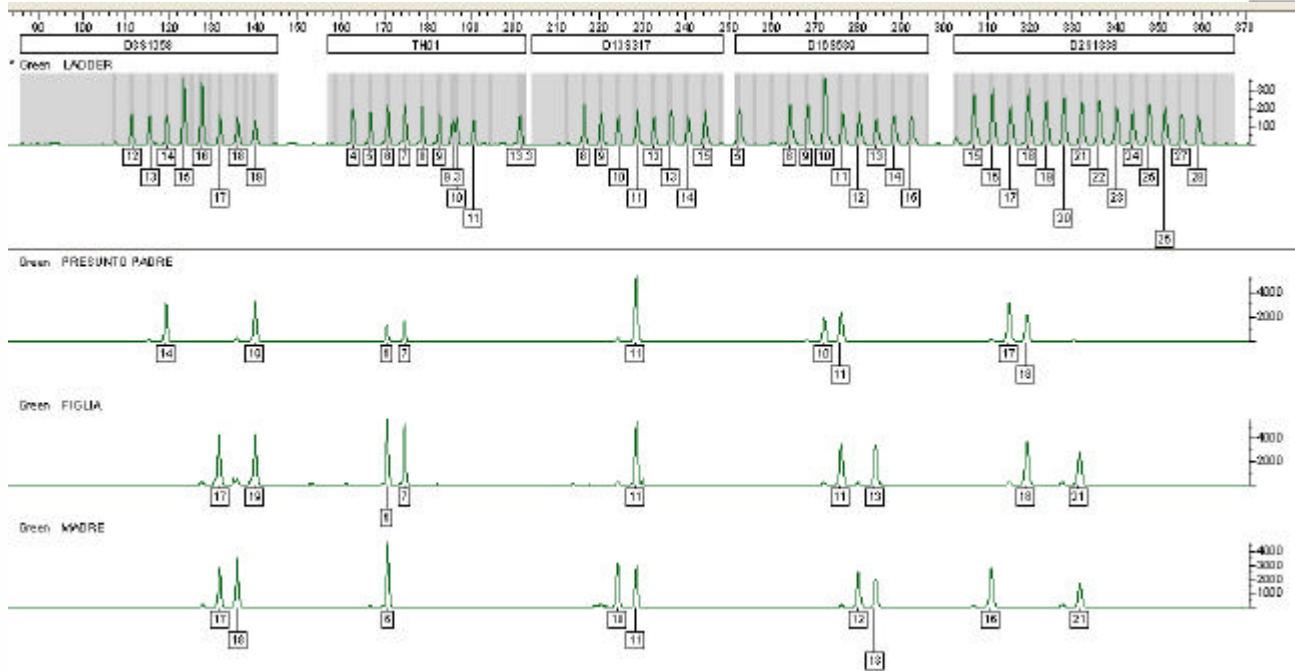
Sede legale e Studi Medici : 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

 Web: www.laboratoriogenoma.it E-mail: info@laboratoriogenoma.it



GENOMA s.r.l.

Numero Verde Servizio Clienti
800.501.651

Sede legale e Studi Medici : 00198 Roma - via Po,102

Laboratori: 00158 Roma - Via F. Zambonini, 26

Tel. + 390685304150 +390685358425 Fax +390685344693

C.F. e P.I. 07363481008

Web: www.laboratoriogenoma.it E-mail: info@laboratoriogenoma.it