

Società italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni

**Linee Guida  
Metodologico-Accertative  
Criteriologico-Valutative**

**INDAGINI  
GENETICO-FORENSI  
DI  
PATERNITÀ E  
IDENTIFICAZIONE  
PERSONALE**

**2**

**A cura di**

**ADRIANO TAGLIABRACCI  
RANIERI DOMENICI  
VINCENZO PASCALI  
MAURO PESARESI**

**PICCIN**

si soggetti.  
ni della consu-  
e dell'Autorità  
pp) e riguarda  
ivamente alle  
97), anche gli  
forense. I reati  
icidio, seguiti  
llegittima della  
problematiche di  
cadavere, nel  
uzione trauma-

primo fra tutti  
itto e la magi-  
i ed ammissibi-

Giudiziaria o  
e da parte del-  
e coperte dalla  
eità delle inda-  
cui alla Legge

e attentamente  
chieste su mate-  
roprietari, non  
pure eventuali

elle indagini, i  
uenze che pos-  
rio informare il  
e informazioni  
su paternità),  
ggetti coinvolti  
filo DNA potrà  
ta commissio-  
di ricerca, ope-  
ingere informa-  
in ragionevole  
aso non possa  
ovrebbe essere

chiaro e comprensibile e dovrebbe essere di compendio a materiale informativo scritto che illustri adeguatamente l'analisi che si effettuerà, in linea con i requisiti minimi per l'accreditamento dei laboratori.

Le indagini genetiche sul vivente restano comunque vincolate al consenso del probando. Fatta eccezione per il recente provvedimento antiterrorismo limitato agli extracomunitari, anche per quanto attiene le indagini commissionate dall'Autorità Giudiziaria con gli strumenti della consulenza o della perizia non è stato ancora emanato alcun provvedimento specifico per quanto riguarda le modalità dell'indagine, come sollecitato dalla Sentenza Corte Costituzionale n. 238 del 1996, in cui si "*dichiara l'illegittimità costituzionale dell'art. 224, comma 2, del codice di procedura penale, nella parte in cui consente che il giudice, nell'ambito delle operazioni peritali, disponga misure che comunque incidano sulla libertà personale dell'indagato o dell'imputato o di terzi, al di fuori di quelle specificamente previste nei "casi" e nei "modi" dalla legge*". Questa Sentenza vieta di fatto il prelievo coattivo ed i Pubblici Ministeri/Giudici nel conferimento dell'indagine chiedono sempre al consulente/perito di procedere al prelievo solo se vi è consenso dell'indagato. Nel documento finale del Gruppo di lavoro Biosicurezza del 18 aprile 2005, predisposto per la creazione dell'Archivio centrale dei profili del DNA, al legislatore sono state proposte modificazioni all'art. 224 bis del codice di procedura penale che consentirebbero l'esecuzione coattiva del prelievo e dell'accertamento nella fase della perizia. È stato inoltre previsto che nell'Archivio dei profili del DNA potranno essere inseriti anche, e soltanto, i profili del DNA del reperto biologico. Quando verrà adottato il relativo provvedimento legislativo, l'informazione dovrà essere estesa anche a questi peculiari aspetti dell'indagine.

Le indagini su materiale prelevato da cadavere o su tracce non sollevano problemi in quanto vengono richieste dall'Autorità Giudiziaria nell'ambito della consulenza e della perizia e riguardano materiale considerato *res nullius* o *res derelicta*. Il prelievo di materiale biologico da cadavere richiesto da familiari in vista di futuri accertamenti genetici di paternità può trovare accoglimento in sede di riscontro diagnostico ed anche in sede di autopsia giudiziaria o di esame esterno, previa autorizzazione del PM. Alcuni penalisti ritengono che un prelievo a tal fine possa essere eseguito anche senza dover chiedere autorizzazione al PM, poiché non compromette il buon esito delle indagini giudiziarie.

### 3. PRELIEVO

Il prelievo deve essere effettuato e conservato in modo tale da evitare rischi di contaminazione e di degradazione. Saliva, formazioni pilifere o sangue sono il materiale prelevato da vivente. Sangue o frammenti di organo sono prelevati da cadavere e del prelievo deve essere dato conto nel verbale di autopsia. I reperti acquisiti in corso di sopralluogo devono essere documentati, classificati e conservati propriamente<sup>16</sup>.

### 4. DIAGNOSI GENERICA E SPECIFICA

La diagnosi generica e la diagnosi specifica vengono esperite sulle tracce repertate in corso di sopralluogo ed utilizzano metodiche appropriate. La diagnosi generica

di sangue su traccia viene routinariamente eseguita con metodi orientativi, come i test catalitici; se necessario, è confermata mediante test immunocromatografici specifici per l'emoglobina umana e di solito per quella di alcuni primati.

La diagnosi di specie, tanto su tracce di sangue, quanto su altre tracce, viene abitualmente eseguita mediante tecniche immunologiche che si avvalgono di anticorpi specie-specifici. Può anche essere ottenuta mediante sonde oligonucleotidiche specie-specifiche utilizzate per la quantizzazione del DNA estratto. Omettere questa fase se il materiale a disposizione non è sufficiente per le successive indagini di identificazione e il caso lo consenta. Di comune impiego nei laboratori di genetica forense sono anche i test per la fosfatasi acida, per l'antigene prostatico specifico (PSA) e/o la ricerca morfologica degli spermatozoi per la diagnosi su traccia di sperma o il test dell'amilasi per la diagnosi presuntiva di saliva.

## 5. ESTRAZIONE E QUANTIZZAZIONE DNA

Il DNA deve essere estratto e purificato secondo metodi standardizzati riportati in letteratura e validati in laboratorio. L'estrazione del DNA dal/i reperto/i e dal/i soggetto/i per la comparazione devono avvenire in tempi successivi, per evitare qualsiasi rischio di inquinamento reciproco. Devono essere disponibili metodi idonei di conservazione del DNA per la protezione dell'integrità del materiale. Può essere usato DNA da qualunque cellula. Gli acidi nucleici devono essere preparati in modo da non andare incontro ad artefatti o ad inibizione della reazione PCR. Utilizzare adeguati controlli negativi e quantizzare, se il materiale è sufficiente e non pregiudica le ulteriori analisi, il DNA estratto. Le metodiche estrattive maggiormente condivise sono le stesse riportate per indagini di paternità: in fenolo-cloroformio<sup>9</sup>, con resine inerti<sup>10</sup>, con resine magnetiche<sup>11</sup>. Questa elencazione non pregiudica il ricorso ad altre metodiche validate ed a quelle indicate, volta per volta, per l'estrazione di tracce particolari.

Per la quantizzazione del DNA estratto sono a disposizione tecniche elettroforetiche su gel d'agarosio all'1%, tecniche spettrofotometriche e d'ibridizzazione Southern-blotting, con sonde radioisotopiche e non (preferibili) e l'utilizzo della real time PCR. La quantizzazione del DNA viene effettuata per conoscere la quantità di DNA estratto dal campione biologico e selezionare il marcatore del DNA che consenta i migliori risultati (Fig. 3). Il gel d'agarosio fornisce risultati su qualità e quantità totale di DNA estratto, senza differenziare la specie di origine. Le altre tecniche, vale a dire la spettrofotometria e l'ibridizzazione in southern-blotting, permettono di riconoscere DNA umano da quello dei procarioti o di altri eucarioti.

La real time PCR permette di quantizzare il DNA estratto sfruttando un sistema di rilevamento a fibre ottiche del segnale emesso dai cromofori (primer fluorescenti o, in alcuni casi, singole molecole fluorescenti) inseriti nella miscela di reazione. La real time PCR consente anche di rilevare la quantità di DNA che sta amplificando e gli eventuali errori di amplificazione che si generano dopo ogni ciclo di reazione, permettendo di monitorare in tempo reale, quindi dopo ogni ciclo, l'andamento della reazione.

## 6. ANALISI DEI MARCATORI GENETICI

I sistemi DNA utilizzati devono essere stati adeguatamente sperimentati e devono

## 7. INTERPRETAZIONE DEI DATI DI LABORATORIO

Nelle indagini di identificazione personale l'analisi elettroforetica delle tracce può produrre uno o due bande/picchi al massimo, per ogni locus esaminato, di area simmetrica, che corrisponde alla situazione più favorevole e che non pone difficoltà di interpretazione. In altri casi l'elettroferogramma può presentare una situazione più complessa, che richiede accurata valutazione dei risultati che sottende e delle ipotetiche cause che l'hanno generata:

- A. nessun picco/banda a tutti i loci;
- B. presenza di più di due picchi/bande ad uno, ad alcuni od a tutti i loci indagati (drop in);
- C. asimmetria dei picchi/bande (peak imbalance);
- D. mancanza di picchi/bande in parte dei loci esaminati (drop out).

A. L'assenza di picchi/bande dell'elettroferogramma può dipendere da diverse cause: errore nella procedura analitica od alterazione dei reagenti, assenza di materiale biologico, efficienza del termociclatore, materiale biologico non umano (qualora non sia stata eseguita la diagnosi specifica), presenza di inibitori dell'amplificazione, materiale biologico degradato, materiale biologico scarso, al di sotto della massa critica per l'amplificazione. L'individuazione di queste cause si avvale anche delle caratteristiche note della traccia biologica a disposizione. L'azione degli inibitori (ad esempio acidi umici del terreno, residui di porfirine o dei loro prodotti di degradazione)<sup>19</sup> può essere attenuata mediante purificazione del DNA estratto. La rottura dello scheletro zuccheri-fosfati porta alla formazione di corti frammenti di poche centinaia di basi. Nel contempo si hanno modificazioni chimiche delle basi e perdita di basi (siti abasici), che possono condurre a misincorporazioni da parte della polimerasi durante la PCR. Si producono altresì legami crociati intramolecolari tra scheletri zuccherofosfati che bloccano la polimerasi e troncano la sintesi delle molecole. Questi fenomeni sono particolarmente accentuati per il DNA antico (aDNA), ove molto elevato è il rischio di contaminazione da DNA moderno. Per cercare di ottenere risultati da scarsa quantità di DNA templato, si può ricorrere a metodiche di *Low Copy Number*<sup>20,21</sup>, di cui di seguito viene data una breve descrizione.

*Low copy number.* I kits di coamplificazione acquisibili sul mercato sono stati validati e dispiegano la massima efficienza per quantità di DNA pari ad 1 nanogrammo a 28-30 cicli di amplificazione e se ne sconsiglia l'uso con quantità inferiori a 250 picogrammi. Lavori sistematici su quantità di DNA inferiore a 100 picogrammi, che è il limite che contrassegna le low copy number, hanno dimostrato che aumentando il numero dei cicli di amplificazione si riesce ad ottenere un profilo genetico completo con soli 25 picogrammi di DNA, con l'inconveniente di ottenere un notevole incremento degli artefatti, quali stutters, spurious alleles, locus ed allelic dropout, ed asimmetria delle aree dei picchi dei ferogrammi, che rendono ardua l'interpretazione del risultato<sup>22</sup>.

Per evitare, o cercare di contenere questi fenomeni indesiderati, nella fase dell'analisi delle LCN occorre seguire una serie di precauzioni oltre a quelle di base, che mutuano quelle suggerite dalla ISFG per l'analisi del DNA mitocondriale:

- amplificare oltre alla traccia anche il substrato in diversi punti, per svelare la eventuale presenza di tracce miste;

le tracce può di area sim- difficoltà di tuazione più delle ipoteti-

dagati (drop

da diverse a di materia- no (qualora plificazione, a massa cri- delle carat- ri (ad esem- radazione)<sup>19</sup> dello schele- naia di basi. i (siti abasi- i durante la i zuccher- esti fenome- elevato è il tati da scar- vumber<sup>20,21</sup>,

io stati vali- ogrammo a 250 pico- mi, che è il nentando il o completo vole incre- ut, ed asim- tazione del

fase dell'a- li base, che are la even-



Fig. 4. Artefatti aspecifici: stutter.

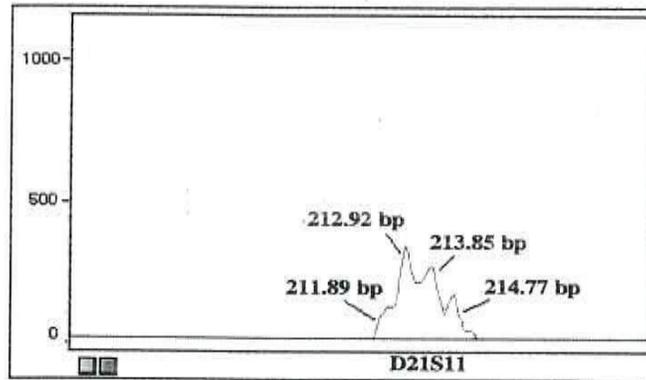
- effettuare amplificazioni ripetute, quando possibile, poiché si è visto che uno stesso allele spurio ha una probabilità non superiore allo 0.3% di essere registrato in due differenti campioni;
- duplicare le analisi piuttosto che concentrare i campioni, dato che questa operazione di solito non permette di portare il DNA sopra la soglia stocastica di amplificazione;
- adottare come valore soglia per l'interpretazione dei picchi valori di RFU solidi, che possono variare da laboratorio a laboratorio, comunque non inferiori a 50 RFU.

B. La presenza di extrapicchi ad uno o più loci può essere dovuta ad artefatti, contaminazione del reperto od a traccia mista (due o più contributori).

a) Gli artefatti possono essere rappresentati da: stutters, artefatti non-specifici, anomalie cromosomiche, "N" bande, picchi pull-up<sup>23,24,25</sup>.

Le stutters sono extrabande che precedono di una intera unità ripetitiva l'allele di riferimento e sono dovute ad un errore (slippage) della Taq polimerasi durante la replicazione dell'allele (Fig. 4).

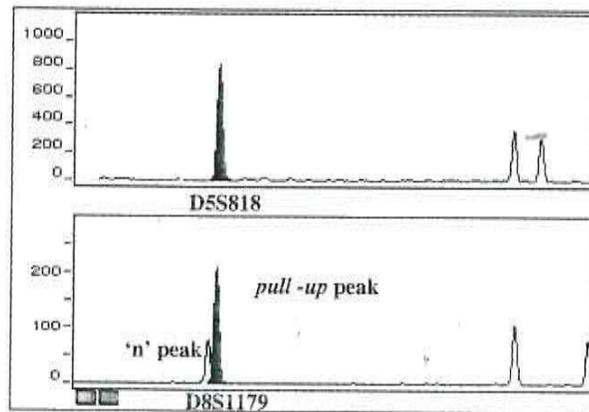
Con riferimento agli STR impiegati in sede forense, è problema che riguarda elettivamente la coamplificazione di unità tetrameriche e si presenta con elevata frequenza, specie per alcuni loci ed alleli all'interno di un locus, in relazione alla sequenza dell'unità ripetitiva. Solitamente le stutters hanno area del picco non superiore al 15% di quella dell'allele di riferimento, ma in condizioni particolari (DNA degradato, amplificazione di low copy number) essa può essere superiore al 15% e simulare un vero e proprio allele. Gli artefatti aspecifici sono extrapicchi dovuti ad un priming aspecifico in una multiplex. Quanto maggiore è il numero di loci, tanto maggiore è la probabilità di trovare artefatti non specifici, poiché la miscela è ricca di primers. Questo fenomeno, che si osserva per altro anche se i loci da amplificare sono pochi ma il DNA è degradato, è dovuto alla amplificazione di brevi sequenze complementari occasionate dalla degradazione nel template. Solitamente l'area del picco è piccola (meno del 5%) ma in alcuni casi può arrivare fino al 30% o, raramente, alla stessa altezza dell'allele più vicino. Possono essere individuate perché solitamente la forma del picco è aberrante e spesso non cadono entro il range allelico del ladder di riferimento. Talvolta assumono un aspetto ladderiforme, con picchi separati l'un l'altro da un solo nucleotide (Fig. 5).



**Fig. 5.** Artefatti aspecifici: aspetto ladderiforme dell'allele.

Le "N" bande sono bande addizionali dovute all'aggiunta da parte della Taq polimerasi di un solo nucleotide alla parte terminale 3' di parte delle molecole sintetizzate. Se l'area del picco di queste "N" bande è elevata, possono simulare degli alleli che differiscono per una sola base, condizione che può portare a false identificazione di interalleli (esempio, alleli 9.3 e 10 del locus TH01). Altro artefatto è il "Pull up" costituito da picchi addizionali dovuti a fluorescenza accessoria in caso di overamplificazione, che satura la matrice e che il programma del sequenziatore non riesce a compensare (Fig. 6). Possono simulare alleli, ma si riconoscono per la loro forma, perché off-ladder od effettuando una amplificazione singola dei loci interessati.

*Anomalie cromosomiche*, quali traslocazioni, mutazioni somatiche o trisomie, possono dare luogo a picchi accessori, che tuttavia sono limitati ad un singolo locus e sono presenti anche nel campione di raffronto del soggetto coinvolto. Oltre alle accennate caratteristiche proprie delle singole evenienze, gli artefatti generalmente coinvol-



**Fig. 6.** Artefatti aspecifici: N-peak e pull-up peak