La riforma Cartabia:
cosa cambia per il genetista forense

Il punto di vista del medico legale

V.L.Pascali

Spediz. abb. post. - art. 1, comma 1
Legge 27-02-2004, n. 46 - Filiale di Roma

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA Roma - Mercoledì, 19 ottobre 2022 SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA, 70 - 00186 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - VIA SALARIA, 691 - 00138 ROMA - CENTRALINO 06-85081 - LIBRERIA DELLO STATO PIAZZA G. VERDI, 1 - 00198 ROMA

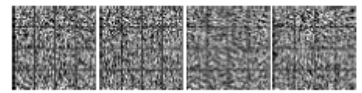
N. 5

MINISTERO DELLA GIUSTIZIA

Relazione illustrativa al decreto legislativo 10 ottobre 2022, n. 149: «Attuazione della legge 26 novembre 2021, n. 206, recante delega al Governo per l'efficienza del processo civile e per la revisione della disciplina degli strumenti di risoluzione alternativa delle controversie e misure urgenti di razionalizzazione dei procedimenti in materia di diritti delle persone e delle famiglie nonché in materia di esecuzione forzata».

Relazione illustrativa al decreto legislativo 10 ottobre 2022, n. 150: «Attuazione della legge 27 settembre 2021, n. 134, recante delega al Governo per l'efficienza del processo penale, nonché in materia di giustizia riparativa e disposizioni per la celere definizione dei procedimenti giudiziari».

Relazione illustrativa al decreto legislativo 10 ottobre 2022, n. 151: «Norme sull'ufficio per il processo in attuazione della legge 26 novembre 2021, n. 206, e della legge 27 settembre 2021, n. 134».



SERIE GENERALE

Spediz. abb. post. - art. 1, comma 1
Legge 27-02-2004, n. 46 - Filiale di Roma

Anno 164° - Numero 187

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA — Roma - Venerdì, 11 agosto 2023 — SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA, 70 - 00186 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - VIA SALARIA, 691 - 00138 ROMA - CENTRALINO 06-85081 - LIBRERIA DELLO STATO PIAZZA G. VERDI, 1 - 00198 ROMA

La **Gazzetta Ufficiale, Parte Prima**, *oltre alla* **Serie Generale**, *pubblica cinque Serie speciali, ciascuna contraddistinta da autonoma numerazione:*
- **1ª Serie speciale:** *Corte costituzionale (pubblicata il mercoledì)*
- **2ª Serie speciale:** *Unione europea (pubblicata il lunedì e il giovedì)*
- **3ª Serie speciale:** *Regioni (pubblicata il sabato)*
- **4ª Serie speciale:** *Concorsi ed esami (pubblicata il martedì e il venerdì)*
- **5ª Serie speciale:** *Contratti pubblici (pubblicata il lunedì, il mercoledì e il venerdì)*

La **Gazzetta Ufficiale, Parte Seconda**, *"Foglio delle inserzioni", è pubblicata il martedì, il giovedì e il sabato*

AVVISO ALLE AMMINISTRAZIONI

Al fine di ottimizzare la procedura di pubblicazione degli atti in *Gazzetta Ufficiale*, le Amministrazioni sono pregate di inviare, contemporaneamente e parallelamente alla trasmissione su carta, come da norma, anche copia telematica dei medesimi (in formato word) al seguente indirizzo di posta elettronica certificata: gazzettaufficiale@giustiziacert.it, curando che, nella nota cartacea di trasmissione, siano chiaramente riportati gli estremi dell'invio telematico (mittente, oggetto e data).

Nel caso non si disponga ancora di PEC, e fino all'adozione della stessa, sarà possibile trasmettere gli atti a: gazzettaufficiale@giustizia.it

SOMMARIO

LEGGI ED ALTRI ATTI NORMATIVI

DECRETO LEGISLATIVO 24 luglio 2023, n. **107**.

Adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2021/784 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2021, relativo al contrasto della diffusione di contenuti terroristici *on-line*. (23G00114) ..... *Pag.* 1

DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA 22 giugno 2023, n. **108**.

Regolamento di modifica al decreto del Presidente della Repubblica 11 novembre 2005, n. 225, recante «Unificazione strutturale della Giunta centrale per gli studi storici e degli Istituti storici». (23G00116) ..... *Pag.* 9

Ministero della giustizia

DECRETO 4 agosto 2023, n. **109**.

Regolamento concernente l'individuazione di ulteriori categorie dell'albo dei consulenti tecnici di ufficio e dei settori di specializzazione di ciascuna categoria, l'individuazione dei requisiti per l'iscrizione all'albo, nonché la formazione, la tenuta e l'aggiornamento dell'elenco nazionale, ai sensi dell'articolo 13, quarto comma, delle disposizioni per l'attuazione del codice di procedura civile e disposizioni transitorie, aggiunto, unitamente all'articolo 24-*bis*, rispettivamente dall'articolo 4, comma 2, lettere *a)* e *g)*, del decreto legislativo 10 ottobre 2022, n. 149, e richiamato dagli articoli 15 e 16 delle stesse disposizioni per l'attuazione, come novellati, dallo stesso articolo 4, comma 2, lettera *b)* nn. 1 e 3, lettera *c)*, nn. 1 e 2. (23G00121) ..... *Pag.* 14

MARIO

Ministero della giustizia

DECRETO 4 agosto 2023, n. **109**.

Regolamento concernente l'individuazione di ulteriori categorie dell'albo dei consulenti tecnici di ufficio e dei settori di specializzazione di ciascuna categoria, l'individuazione dei requisiti per l'iscrizione all'albo, nonché la formazione, la tenuta e l'aggiornamento dell'elenco nazionale, ai sensi dell'articolo 13, quarto comma, delle disposizioni per l'attuazione del codice di procedura civile e disposizioni transitorie, aggiunto, unitamente all'articolo 24-*bis*, rispettivamente dall'articolo 4, comma 2, lettere *a)* e *g)*, del decreto legislativo 10 ottobre 2022, n. 149, e richiamato dagli articoli 15 e 16 delle stesse disposizioni per l'attuazione, come novellati, dallo stesso articolo 4, comma 2, lettera *b)* nn. 1 e 3, lettera *c)*, nn. 1 e 2. (23G00121) ..... *Pag.* 14

Formalità e rito civile e penale
Contraddittorio in perizia
Albi di consulenti

Giuramento telematico

Art. 193 Codice di procedura civile

All'udienza di comparizione il giudice istruttore ricorda al consulente l'importanza delle funzioni che è chiamato ad adempiere, e ne riceve il giuramento di bene e fedelmente adempiere le funzioni affidategli al solo scopo di fare conoscere al giudice la verità.

In luogo della fissazione dell'udienza di comparizione per il giuramento del consulente tecnico d'ufficio il giudice può assegnare un termine per il deposito di una **dichiarazione sottoscritta** dal consulente con firma digitale, *recante il* **giuramento** previsto dal primo comma. Con il medesimo provvedimento il giudice fissa i termini previsti dall'articolo 195, terzo comma.

Citazione di periti e CT in processo penale

Art. 142 disp. att. c.p.p. Citazione di testimoni, periti, interpreti, consulenti tecnici e imputati di un procedimento connesso

1. Omissis
2. Omissis
3. L'atto di citazione contiene:

a) l'indicazione della parte richiedente e dell'imputato nonché del decreto che ha autorizzato la citazione;

b) le generalità e il domicilio della persona da citare;

c) il giorno, l'ora e il luogo della comparizione e il giudice davanti al quale la persona citata deve presentarsi;

d) l'indicazione degli obblighi e delle facoltà previsti dagli articoli 198, 210 e 226 del codice;

d- l'avvertimento che la mancata comparizione senza giustificato motivo del querelante all'udienza in cui è citato a comparire come testimone integra remissione tacita di querela, nei casi in cui essa è consentita;

e) l'avvertimento che, fuori del caso previsto dalla lettera d-), in caso di mancata comparizione non dovuta a legittimo impedimento, la persona citata potrà, a norma dell'articolo 133 del codice, essere accompagnata a mezzo della polizia giudiziaria e condannata al pagamento di una somma da □ 51 a □ 516 a favore della cassa delle ammende e alla rifusione delle spese alle quali la mancata comparizione ha dato causa.

4. Quando la citazione è disposta di ufficio il decreto di citazione contiene i requisiti previsti dal comma 3 lettere b), c), d), d-), e) nonché l'indicazione dell'imputato.

Esame a distanza

Art. 496 c.p.p. - Ordine nelle modalità di assunzione delle prove
(Omissis)
2 Salvo che una particolare disposizione di legge preveda diversamente, il giudice può disporre, con il consenso delle parti, che l'esame dei testimoni, dei periti, dei consulenti tecnici, delle persone indicate nell'articolo 210 e delle parti private si svolga a distanza.

(imputato detenuto all'estero, che non possa essere trasferito in Italia)

5.La partecipazione all'udienza attraverso il collegamento audiovisivo del testimone o del perito si svolge secondo le modalità e i presupposti previsti dagli accordi internazionali. Per quanto non espressamente disciplinato, si applica, in quanto compatibile, la disposizione dell'articolo 133 del codice.

Norme utili ad assicurare il contraddittorio

art. 501 Codice di procedura penale

1. Per l'esame dei periti e dei consulenti tecnici si osservano le disposizioni sull'esame dei testimoni, in quanto applicabili.

1-bis. Almeno sette giorni prima dell'udienza fissata per il suo esame, il perito autorizzato ai sensi dell'articolo 227, comma 5, deposita in cancelleria la propria relazione scritta. Nello stesso termine la parte che ha nominato un consulente tecnico deposita in cancelleria l'eventuale relazione scritta del consulente.

il termine di sette giorni "ha natura ordinatoria, non essendo correlate alla sua inosservanza – sia in forma di omesso, che di tardivo deposito – conseguenze sanzionatorie" (Ufficio del Massimario della Corte Suprema di Cassazione, Rel. n. 2/2023 del 5/01/2023, p. 126) avendo il legislatore ritenuto di dovere provvedere in tal senso, ritenendosi che il tardivo od omesso deposito della relazione tecnica "non possa pregiudicare la validità dell'esame orale del perito o del consulente tecnico"

la facoltà di periti e consulenti di consultare documenti, note scritte e pubblicazioni (con la connessa possibilità di acquisirli), si estende alle relazioni depositate ai sensi dei nuovi commi 1-*bis* e 1-*ter*, in tal modo coordinando la fase, meramente informativa, del deposito, con quella acquisitiva e fermo, per il resto, quanto previsto dall art. 511 c.p.p.

Che cos’è contraddittorio per l’art. 501 cpp

(ciascuno sappia in anticipo quel che l’altro dirà)

Che cos’è contraddittorio scientifico

(confronto di tesi tra contraddittori di pari grado, in cui siano le tesi che contino, non il rango di chi le sostiene)

Norme di riordino /aggiornamento degli albi di perito e consulente

Identikit del consulente/perito d’ufficio ’Cartabia’

a) Appartenente ad una categoria professionale (specifica o affine)
b) Iscritto ad un albo di tribunale
c) In regola con i requisiti di ‘esperto’
d) Moralità specchiata

Elenco nazionale dei consulenti tecnici

Dopo il Titolo II, Capo I, delle disposizioni per l'attuazione del codice di procedura civile e disposizioni transitorie è inserito il seguente:

«Art. 24-bis disp. att. c.p.c. Elenco nazionale dei consulenti tecnici

Presso il Ministero della Giustizia è istituito un elenco nazionale dei consulenti tecnici, suddiviso per categorie e contenente l'indicazione dei settori di specializzazione di ciascuna categoria, nel quale, tramite i sistemi informatici di cui all'articolo 23, secondo comma, confluiscono le annotazioni dei provvedimenti di nomina.

L'elenco è tenuto con modalità informatiche ed è accessibile al pubblico attraverso il portale dei servizi telematici del Ministero della giustizia.

La formazione, la tenuta e l'aggiornamento dell'elenco di cui all'articolo 24-bis delle disposizioni per l'attuazione del codice di procedura civile, di cui al regio decreto 18 dicembre 1941, n. 1368, introdotto dal presente decreto, sono disciplinate con provvedimento del direttore generale dei sistemi informativi automatizzati del Ministero della giustizia.

Ma: ancoraggio all’Albo Distrettuale

Le modifiche all'articolo 22 disp. att. c.p.c. sono volte a recepire i criteri di cui ai commi 16, lettera d), e 17, lettera i) , dell'articolo unico, in materia di mobilità dei consulenti tecnici e di conferimento dell'incarico al consulente tecnico da parte del giudice delle sezioni specializzate con competenza distr ettuale.

Al primo comma, si è quindi introdotto un ultimo periodo che prevede che i giudici presso le sezioni specializzate dei tribunali con competenza distrettuale possano conferire l' incarico ai consulenti iscritti negli albi dei tribunali del distretto. Viene così ampliato il novero degli albi dei consulenti a cui tali giudici conferiscono, di regola, l' incarico, per rispecchiare la competenza distrettuale di specifiche sezioni specializzate.

Il secondo comma è stato modificato per alleggerire - ma non eliminare del tutto - gli incombenti processuali che il giudice deve rispettare nel caso in cui decida di conferire l' incarico a un consulente iscritto in albo di altro tribunale o a persona non iscritta in alcun albo. Invero, si è voluta mantenere una preferenza per l' affidamento dell'incarico ai consulenti iscritti nell'albo del tribunale a cui appartiene il giudice, anche per ragioni di spesa ed efficienza dell'amministrazione della giustizia, pur attuando il principio di una maggiore mobilità dei consulenti tecnici. Nello specifico, quindi, nel caso di conferimento di un incarico a un consulente iscritto in albo di altro tribunale o a persona non iscritta in alcun albo, il giudice non è più tenuto a sentire il presidente, ma deve soltanto comunicare a quest'ultimo il provvedimento motivato di conferimento dell' incarico.

Analoghe modifiche sono introdotte al terzo comma per il conferimento dell' incarico in grado di appello

DECRETO 4 agosto 2023, n. 109

Regolamento concernente l'individuazione di **ulteriori categorie** **dell'albo dei consulenti tecnici di ufficio** e dei settori di specializzazione di ciascuna categoria, l'individuazione dei **requisiti** per l'iscrizione all'albo, nonchè la **formazione, la tenuta e l'aggiornamento dell'elenco nazionale**, ai sensi dell'articolo 13, quarto comma, delle disposizioni per l'attuazione del codice di procedura civile e disposizioni transitorie, aggiunto, unitamente all'articolo 24-bis, rispettivamente dall'articolo 4, comma 2, lettere a) e g), del decreto legislativo 10 ottobre 2022, n. 149, e richiamato dagli articoli 15 e 16 delle stesse disposizioni per l'attuazione, come novellati, dallo stesso articolo 4, comma 2, lettera b) nn. 1 e 3, lettera c), nn. 1 e 2. (23G00121) (GU Serie Generale n.187 del 11-08-2023)

Decreto n. 109/2023:
disposizioni in materia dell’albo e dell’elenco nazionale individuano:

- le categorie professionali e i relativi settori di specializzazione,
- i contenuti dell’albo e della domanda di iscrizione,
- sospensione e cancellazione volontaria,
- i requisiti necessari ai fini dell’iscrizione,
- i contenuti dell’elenco,
- le modalità informatiche di tenuta di albo ed elenco.

Contenuto dell’albo

Nell’albo sono comprese le categorie indicate **nell’allegato A** del decreto 109/2023, coi relativi settori di specializzazione. Ai settori di specializzazione della categoria medico-chirurgica si applica la tabella di equipollenza di cui all’allegato B.

Per ogni consulente, nell’albo sono indicati:

- la categoria e il relativo settore di specializzazione;
- il titolo di studio conseguito;
- l’ordine o il collegio professionale cui è iscritto o, per le professioni non organizzate in ordini o collegi, la categoria del ruolo dei periti e degli esperti tenuto dalla camera di commercio, industria, artigianato e agricoltura in cui è eventualmente inserito;
- la data in cui il consulente ha iniziato a svolgere la professione, con riguardo alla specifica categoria e settore di specializzazione di appartenenza;
- il possesso di adeguate e comprovate competenze nell’ambito della conciliazione, acquisite anche mediante specifici percorsi formativi;
- il conseguimento di adeguata formazione sul processo e sull’attività del consulente tecnico;
- il numero di incarichi conferiti e di quelli revocati.

Biologo, biochimico, biotecnologo, genetista, medico?
Albo?
Anzianità professionale o nell’ attività genetico-forense?
adeguata formazione sul rito processuale e consulenziale
incarichi conferiti, incarichi revocati
Attività scientifica e congressuale
Pubblicazioni di settore

Requisiti per l'iscrizione all'albo dei consulenti tecnici

- iscrizione nei rispettivi ordini o collegi professionali, o ruoli, o associazioni professionali; (quali?)
- sono in regola cogli obblighi di formazione professionale continua, ove previsti;
- sono di condotta morale specchiata;
- sono dotati di speciale competenza tecnica nelle materie oggetto della categoria di interesse;
- hanno residenza anagrafica o domicilio professionale nel circondario del tribunale.

Il professionista deve essere iscritto nel rispettivo ordine o collegio professionale, mentre per le professioni non organizzate in ordini o collegi, il professionista deve essere iscritto nel ruolo dei periti e degli esperti tenuto dalla CCIAA o a una delle associazioni professionali inserite nell'elenco ex art. 2, c. 7, l. n. 4/2013, che rilasciano l'attestato

Speciale competenza tecnica

sussiste quando l'attività professionale è stata esercitata per almeno 5 anni in modo effettivo e continuativo.

In mancanza quando almeno due delle seguenti circostanze:

- possesso di adeguati titoli di **specializzazione o approfondimento post-universitari**, purché l'aspirante sia iscritto da almeno 5 anni nei rispettivi ordini, collegi o associazioni professionali;
- possesso di adeguato curriculum scientifico, comprendente, a titolo esemplificativo, attività di **docenza, attività di ricerca, iscrizione a società scientifiche, pubblicazioni su riviste scientifiche**;
- conseguimento della certificazione UNI relativa all'attività professionale svolta, rilasciata da un organismo di certificazione accreditato.

Nella domanda di iscrizione all'albo l'aspirante indica :

- la categoria e il settore di specializzazione per i quali chiede l'iscrizione;
- le generalità e l'indirizzo pec;
- la formazione scolastica, universitaria e post-universitaria e i titoli di studio conseguiti;
- gli eventuali specifici percorsi formativi volti ad acquisire adeguate competenze nell'ambito della conciliazione, e sul processo e sull'attività del CT;
- il curriculum scientifico;
- l'ordine, il collegio, l'associazione o la categoria del ruolo dei periti e degli esperti tenuto dalla CCIAA in cui è iscritto;
- la dichiarazione di non aver riportato condanne passate in giudicato, oppure l'indicazione delle condanne eventualmente riportate;
- la dichiarazione di non essere a conoscenza di procedimenti penali pendenti a suo carico, o l'indicazione dei procedimenti pendenti dei quali abbia conoscenza;
- la dichiarazione di non aver riportato negli ultimi 5 anni sanzioni disciplinari più gravi di quella minima prevista dall'ordinamento professionale di appartenenza;
- la dichiarazione di essere in regola cogli obblighi di formazione professionale continua, indicando i crediti conseguiti, e gli obblighi contributivi e previdenziali;
- l'attività professionale svolta, con riguardo a quella degli ultimi 5 anni;
- la dichiarazione che i titoli e i documenti attestanti la formazione e l'attività professionale svolta prodotti in copia sono conformi all'originale;
- l'impegno a comunicare ogni variazione del proprio indirizzo pec e ogni altra circostanza rilevante sopravvenuta.

Le domande di iscrizione possono essere presentate tra il 1° marzo e il 30 aprile e tra il 1° settembre e il 31 ottobre di ciascun anno. Il comitato si riunisce almeno due volte l'anno, e provvede entro 180 giorni dal ricevimento della domanda di iscrizione.

6. Sospensione e cancellazione volontaria

Nell'allegato A del decreto 109/2023

BIOLOGIA AMBIENTALE	UTILIZZO DI BIOMARKERS ATTI ALLA DETERMINAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE EMMISSIONI ED EVENTUALI CONTAMINAZIONI DI ARIA, ACQUA, SUOLO
BIOLOGIA AMBIENTALE	VALIDITA' DELL'IDONEITA' MICROBIOLOGICA DEL PRODOTTO COSMETICO ED AMBITI ANALOGHI
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE E DELLA SICUREZZA ALIMENTARE	ANALISI BIOSTATISTICHE
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE E DELLA SICUREZZA ALIMENTARE	ANALISI PER IL CONTROLLO DI MERCI DI ORIGINE BIOLOGICA
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE E DELLA SICUREZZA ALIMENTARE	BIOTECNOLOGIE RIFERITE AL SETTORE INDUSTRIALE
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE E DELLA SICUREZZA ALIMENTARE	DETERMINAZIONE DELLE ESIGENZE ALIMENTARI DELLA PERSONA E SICUREZZA DELLA NUTRIZIONE ANCHE IN RAPPORTO AD EVENTUALI PATOLOGIE DIAGNOSTICHE IN ALTRA SEDE SANITARIA
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE E DELLA SICUREZZA ALIMENTARE	ESAMI MOLECOLARI AI FINI DELLA RICERCA DIAGNOSTICA O SCIENTIFICA
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE E DELLA SICUREZZA ALIMENTARE	VALIDITA' DELL'IDONEITA' MICROBIOLOGICA DEL PRODOTTO COSMETICO ED AMBITI ANALOGHI
BIOLOGIA FORENSE	ANTROPOLOGIA
BIOLOGIA FORENSE	ANTROPOLOGIA MOLECOLARE
BIOLOGIA FORENSE	BIOINFORMATICA
BIOLOGIA FORENSE	BIOSTATISTICA
BIOLOGIA FORENSE	BLOOD PATTERN DNA ANALYSIS
BIOLOGIA FORENSE	BOTANICA
BIOLOGIA FORENSE	ENTOMOLOGIA
BIOLOGIA FORENSE	GENETICA
BIOLOGIA FORENSE	MICOLOGIA
BIOLOGIA FORENSE	MICROBIOLOGIA
BIOLOGIA FORENSE	PALINOLOGIA
BIOLOGIA FORENSE	TOSSICOLOGIA
BIOLOGIA FORENSE	ZOOLOGIA
BIOLOGIA SANITARIA	ANALISI BIOLOGICHE CON PROCEDURE STRUMENTALI RELATIVE A SIERI, SANGUE, URINE, ESCREMENTI, ESSUDATI E COMUNQUE ANALISI METABOLICHE EGENETICHE DI BIOCHIMICA CLINICA

29°CONVEGNO NAZIONALE DEI GENETISTI FORENSI ITALIANI

Università degli Studi di Messina

LA GENETICA FORENSE AL SERVIZIO DELLA PERSONA FRAGILE

L'ESPERIENZA DEI LABORATORI ITALIANI

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE
Laboratorio di Medicina Legale

prof.ssa Sarah GINO
sarah.gino@uniupo.it

ASPETTI GENERALI

GENETICA FORENSE E PERSONA FRAGILE

LA PERSONA FRAGILE

Il concetto di fragilità/vulnerabilità è, di per sé, molto ampio. Può applicarsi ai bambini, agli anziani e, più in generale, alle persone prive/private della loro autonomia, ai migranti, alle vittime di tratta di esseri umani, ma anche ad alcune categorie di lavoratori.

Le persone vulnerabili godono dei diritti e delle libertà garantite dalla convenzione europea dei diritti umani (1950) allo stesso modo di qualsiasi altro individuo.

L'articolo 14 della convenzione afferma che il godimento di questi diritti deve essere assicurato “senza nessuna discriminazione”.

LA PERSONA FRAGILE

Nel corso degli anni sono state redatte diverse convenzioni atte a tutelare i diritti dei più fragili per garantire, a chi si trova in condizioni disagiate o a chi è maggiormente vulnerabile, il godimento dei diritti umani.

- Convenzione sui diritti dell'infanzia e dell'adolescenza (1989 - ratificata dall'Italia 1991)
- Convenzione relativa allo statuto dei rifugiati (1951 – ratificata dall'Italia 1954)
- Convenzione internazionale sulla protezione dei diritti del lavoratori migranti e delle loro famiglie (1990 – entrata in vigore 2003)
- Convenzione delle Nazioni Unite sui diritti delle persone con disabilità (2006 – entrata in vigore 2008)
- Convenzione sulla prevenzione e la lotta alla violenza contro le donne e la violenza domestica (c.d. Convenzione di Istanbul 2011 – entrata in vigore 2014)

GENETICA FORENSE e FRAGILITÀ

Ricostruzione di rapporti di parentela in ambito civile e penale

- diritto di un figlio di vedere costituito il proprio rapporto di filiazione portando la prova biologica sulla paternità o maternità in giudizio (Sentenza 50/2006 Corte di Cassazione)

- MSNA o mal accompagnati

J Forensic Sci, January 2006, Vol. 51, No. 1
doi:10.1111/j.1556-4029.2005.00013.x
Available online at: www.blackwell-synergy.com

CASE REPORT

Carlo Robino,[1] Ph.D.; Maria Rosa Barilaro,[1] B.Sc.; Sarah Gino,[1] Ph.D.; Roberto Chiarle,[2] M.D.; Giorgio Palestro,[2] M.D.; and Carlo Torre,[1] M.D.

Incestuous Paternity Detected by STR-typing of Chorionic Villi Isolated from Archival Formalin-fixed Paraffin-embedded Abortion Material Using Laser Microdissection

Genetisti Forensi Italiani

RACCOMANDAZIONI PER GLI ACCERTAMENTI PARENTALI

2018

Identificazione di cadaveri sconosciuti

- disastri di massa/conflitti
- fosse comuni
- migranti morti in mare o lungo le vie di migrazione
- restituzione dei corpi delle persone scomparse ai familiari

Forensic Science International 340 (2022) 111421

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

Dead migrants in the Mediterranean: genetic analysis of bone samples exposed to seawater

Emilie Bertolini[a,b], Pierangela Grignani[b], Barbara Bertoglio[a,b], Giorgio Marrubini[c], Debora Mazzarelli[a], Stanilla Lucheschi[a], Alessandro Bosetti[d], Paolo Fattorini[e], Cristina Cattaneo[a], Carlo Previderé[b,*]

Forensic Science International: Genetics 44 (2020) 102156

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Disaster victim identification by kinship analysis: the Lampedusa October 3rd, 2013 shipwreck

Barbara Bertoglio[a,b], Pierangela Grignani[a], Paola Di Simone[c], Nicolò Polizzi[c], Danilo De Angelis[b], Cristina Cattaneo[b], Agata Iadicicco[d], Paolo Fattorini[e], Silvano Presciuttini[f], Carlo Previderè[a,*]

GENETICA FORENSE e FRAGILITÀ

Vittime di reato

- identificazione del reo
- identificazione della vittima

Genetisti Forensi Italiani 2013

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA
Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I)
Presidente Prof. Francesco De Stefano

LINEE GUIDA PER LA REPERTAZIONE DI TRACCE BIOLOGICHE PER LE ANALISI DI GENETICA FORENSE NEL PERCORSO ASSISTENZIALE DELLE VITTIME DI VIOLENZA SESSUALE E/O MALTRATTAMENTO
a cura del gruppo di lavoro coordinato dalla Prof.ssa Susi Pelotti*

Allegato C

30-1-2018 GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA *Serie generale* - n. 24

DECRETI PRESIDENZIALI

DECRETO DEL PRESIDENTE DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI 24 novembre 2017.

Linee guida nazionali per le Aziende sanitarie e le Aziende ospedaliere in tema di soccorso e assistenza socio-sanitaria alle donne vittime di violenza.

Vista la direttiva 2012/29/UE del Parlamento europeo e del Consiglio d'Europa del 25 ottobre 2012 che istituisce norme minime in materia di diritti, assistenza e protezione delle vittime di reato, sottolineando che le vittime di reato dovrebbero essere riconosciute e trattate in maniera rispettosa, sensibile e professionale, senza discrimina-

Ge.F.I.

2018

Genetisti Forensi Italiani

RACCOMANDAZIONI Ge.F.I. NELLE INDAGINI DI IDENTIFICAZIONE PERSONALE

Le presenti raccomandazioni sono il risultato del lavoro condotto da esperti, iscritti al *Ge.F.I.*, dei laboratori di genetica forense delle Università Italiane, del Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche (*Ra.C.I.S.*), della Polizia Scientifica e di quelli facenti parte della Società Italiana di Genetica Umana (*SIGU*).

Revisione 2023

RACCOMANDAZIONI IN TEMA DI REPERTAMENTO DI TRACCE BIOLOGICHE PER LE ANALISI DI GENETICA FORENSE NEL PERCORSO CLINICO-ASSISTENZIALE IN CASO DI VIOLENZA SESSUALE E/O MALTRATTAMENTO

Aggiornamento 2023 a cura del gruppo di lavoro GeFI

GENETICA FORENSE e FRAGILITÀ

VIOLENZA SESSUALE

Int J Legal Med (2017) 131:1449–1453
DOI 10.1007/s00414-017-1602-x

ORIGINAL ARTICLE

58 cases of sexual violence bearing forensic interest: congruence between the victim's report and the data from laboratory analyses

Sarah Gino[1] · Antonella Canavese[2] · Beatrice Pattarino[2] · Carlo Robino[1] · Monica Omedei[3] · Erica Albanese[1] · Paola Castagna[2]

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 7 (2019) 164–166

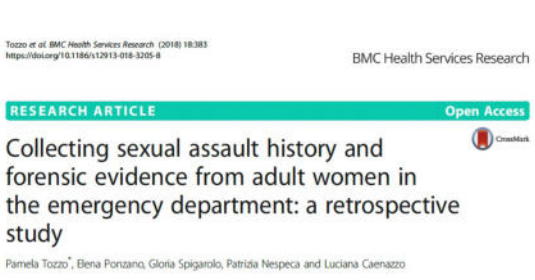
Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigss

How many DNA analyses are performed on adult sexual assault victims in Milan (Italy): A ten-year review

Andrea Piccinini[a,b,*], Paolo Bailo[a], Giulia Vignali[a], Giussy Barbara[b], Giuseppe Gennari[d], Domenico Di Candia[a], Valentina Albertini[b], Alessandra Kustermann[b]



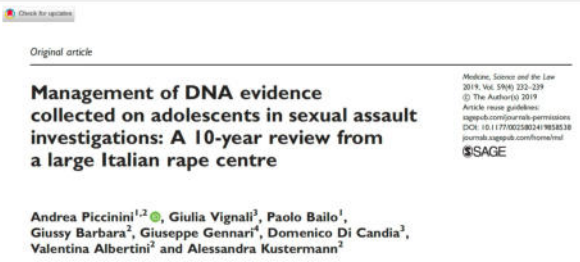
Tozzo et al. BMC Health Services Research (2018) 18:383
https://doi.org/10.1186/s12913-018-3205-8

BMC Health Services Research

RESEARCH ARTICLE Open Access

Collecting sexual assault history and forensic evidence from adult women in the emergency department: a retrospective study

Pamela Tozzo*, Elena Ponzano, Gloria Spigarolo, Patrizia Nespeca and Luciana Caenazzo



Original article

Management of DNA evidence collected on adolescents in sexual assault investigations: A 10-year review from a large Italian rape centre

Medicine, Science and the Law
2019, Vol. 59(4) 232–239
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0025802419858538
journals.sagepub.com/home/msl
SAGE

Andrea Piccinini[1,2], Giulia Vignali[3], Paolo Bailo[1], Giussy Barbara[2], Giuseppe Gennari[4], Domenico Di Candia[3], Valentina Albertini[2] and Alessandra Kustermann[2]

Forensic Science International 314 (2020) 110387

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

ELSEVIER

Evaluation of critical aspects in clinical and forensic management of sexual violence: A multicentre Ge.F.I. project

Sarah Gino[a,*], Marco Bo[b], Rossana Ricciardelli[a,1], Milena Alù[c], Ilaria Boschi[d], Eugenia Carnevali[e], Matteo Fabbri[f], Paolo Fattorini[g], Andrea Piccinini[h], Carlo Previderè[i], Andrea Verzeletti[j], Pamela Tozzo[k], Luciana Caenazzo[k]

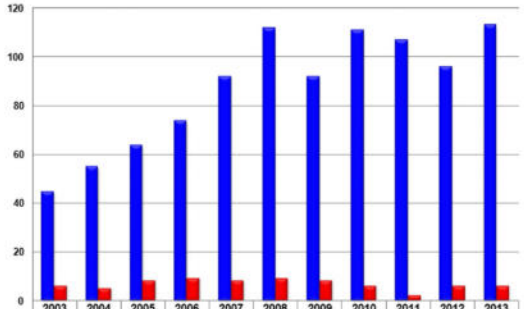
TORINO 2003-2013

Int J Legal Med (2017) 131:1449–1453
DOI 10.1007/s00414-017-1602-x

ORIGINAL ARTICLE

58 cases of sexual violence bearing forensic interest: congruence between the victim's report and the data from laboratory analyses

Sarah Gino[1] · Antonella Canavese[2] · Beatrice Pattarino[2] · Carlo Robino[1] · Monica Omedei[3] · Erica Albanese[1] · Paola Castagna[2]



	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Number of visits/year	45	55	64	74	92	112	92	111	107	96	113
Number of forensic genetic analyses/year	6	5	8	9	8	9	8	6	2	6	6

Number of visits per year at the SVS related to the number of forensic genetic analyses performed per year

960 CASI
73 casi (7.6%) richiesti da AG
ATT! Dal 13.3% del 2003 al 5.3% del 2013

citologico negativo o non eseguito?
(8/31 Male DNA)

racconto confuso?
(15/26 Male DNA)

Table 1 Results of the laboratory analyses when women recalled the sexual violence

	Women did not recalled incident (27/53)	Positive sperm identification	Negative sperm identification	Fluid identification not performed	Male DNA at quantitation
Positive cytologic examination	7/27	3/7	0/7	4/7	7/7
Negative cytologic examination	14/27	0/14	9/14	5/14	2/14
Cytologic examination not performed	6/27	4/6	2/6	0/6	4/6

Table 2 Results of the laboratory analyses when women did not recall the sexual violence

	Women did not recalled incident (26/53)	Positive sperm identification	Negative sperm identification	Fluid identification not performed	Male DNA at quantitation
Positive cytologic examination	14/26	7/14	0/14	7/14	13/14
Negative cytologic examination	10/26	0/10	8/10	2/10	2/10
Cytologic examination not performed	1/26	0/1	1/1	0/1	0/1

Sono stati reperiti gli esiti delle indagini di laboratorio per 58 dei 73 casi.
5 casi hanno previsto indagini di genetica forense su materiale abortivo (2) e su oggetti (3).

Sede	Massimo intervallo dalla violenza[1]	Modalità di prelievo
Oggetti (fazzoletti, condom, speculum etc..)	Illimitatamente, se recanti tracce evidenti o verosimili	Porre in contenitori sterili di dimensioni adeguate (ad es. falcon monouso, barattoli, etc.) e conservare in congelatore a -20°C. In caso di condom si precisa di chiuderne l'estremità (ad es. mediante nodo) per evitare la fuoriuscita di eventuale liquido seminale (NB dopo questa operazione è obbligatorio cambiare i guanti).
IVG, aborto spontaneo, parto	//	Procedere al repertamento di materiale abortivo/placenta/funicolo fetale (IVG, aborto spontaneo) e sangue neonatale (parto). Materiale abortivo/placenta/funicolo devono essere riposti singolarmente in contenitori sterili di dimensioni adeguate, evitando sangue in eccesso, senza liquido conservante (ad es. formalina o soluzione fisiologica) e congelati a -20°C. Prelevare in caso di parto alcune gocce di sangue neonatale da apporre su carta bibula (es. Guthrie card), da far essiccare e conservare a temperatura ambiente.

Tabella tratta e adattata da revisione Allegato C DPCM 24 novembre 2017

PADOVA 2010-2014

Tozzo et al. BMC Health Services Research (2018) 18:383
https://doi.org/10.1186/s12913-018-3205-8

BMC Health Services Research

RESEARCH ARTICLE Open Access

Collecting sexual assault history and forensic evidence from adult women in the emergency department: a retrospective study

Pamela Tozzo*, Elena Ponzano, Gloria Spigarolo, Patrizia Nespeca and Luciana Caenazzo

122 CASI
processati dal laboratorio di genetica forense dell'Università di Padova
71 casi richiesti da AG
51 casi processati dopo i termini

concordanza tra racconto e dati di laboratorio?

Solo in 67 dei 103 casi in cui il dato anamnestico relativo alla penetrazione con eiaculazione era positivo sono stati rinvenuti gli spermatozoi ed è stato possibile tipizzare un aplotipo Y utile per il confronto (in 6 casi diverso da quello del soggetto attenzionato).
In 5 dei 9 casi in cui il dato anamnestico relativo alla penetrazione con eiaculazione è risultato negativo, è stato tipizzato ugualmente un aplotipo Y .
In 3 dei 10 casi in cui il racconto era confuso per assunzione di alcol e sostanze stupefacenti è stato tipizzato un aplotipo Y.

Importanza della raccolta del racconto

Importanza della definizione del tempo trascorso tra l'evento e la raccolta del materiale biologico

RACCOMANDAZIONI IN TEMA DI REPERTAMENTO DI TRACCE BIOLOGICHE PER LE ANALISI DI GENETICA FORENSE NEL PERCORSO CLINICO-ASSISTENZIALE IN CASO DI VIOLENZA SESSUALE E/O MALTRATTAMENTO

Aggiornamento 2023 a cura del gruppo di lavoro GeFI

Inserita una tabella con indicazioni dei prelievi da effettuare in base al tempo trascorso

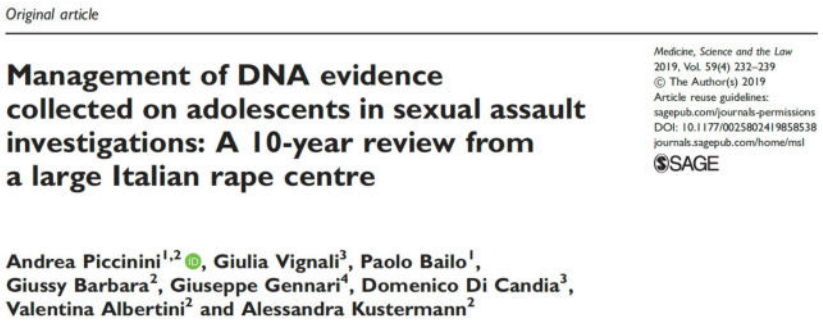
Sede	Massimo intervallo dalla violenza[1]
Cavità orale	48 h (2 gg)
Cute (inclusa cute periorale, cute inter-femorale, scroto)	- 48 h (2 gg), ma fino a 168 h (7gg) in aree non lavate
Genitali esterni	- 168 h (7 gg) se riferita eiaculazione sui genitali esterni o rapporto vaginale - 72 h (3 gg) se riferito rapporto anale - 48 h (2 gg) se riferito rapporto digitale o contatto cutaneo
Cavità vaginale	- 168 h (7 gg) se riferita eiaculazione sui genitali esterni o rapporto vaginale - 72h (3 gg) se riferito rapporto anale - 48h (2 gg) se riferito rapporto digitale o contatto cutaneo
Cervice	- 168 h (7 gg) se riferita eiaculazione sui genitali esterni o rapporto vaginale - 72h (3 gg) se riferito rapporto anale

Sede	Massimo intervallo dalla violenza[1]
Regione perianale	- 168 h (7 gg) se riferita eiaculazione sui genitali esterni o rapporto vaginale - 72 h (3 gg) se riferito rapporto anale - 48 h (2 gg) se riferito rapporto digitale o contatto cutaneo
Retto	- 72 h (3 gg) se riferito rapporto anale - 48 h (2gg) se riferito rapporto digitale
Pene	72 h (3gg) anche se riferito rapporto protetto
Formazioni pilifere	Sulla base del racconto
Fluidi corporei sulle formazioni pilifere	- Illimitatamente se visibili fluidi corporei - fino a 72 h (3gg) se riferito contatto cutaneo
Spazi subungueali	48 h (2gg)

Sede	Massimo intervallo dalla violenza[1]
Indumenti (se indossati al momento del fatto e sulla base del racconto)	Illimitatamente
Oggetti (fazzoletti, condom, speculum etc..)	Illimitatamente se recanti tracce evidenti o verosimili
IVG, aborto spontaneo, parto	//

Tabelle tratte e adattate da revisione Allegato C DPCM 24 novembre 2017

MILANO 2006-2015



Original article

Management of DNA evidence collected on adolescents in sexual assault investigations: A 10-year review from a large Italian rape centre

Medicine, Science and the Law
2019, Vol. 59(4) 232–239
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0025802419858538
journals.sagepub.com/home/msl
SAGE

Andrea Piccinini[1,2], Giulia Vignali[3], Paolo Bailo[1], Giussy Barbara[2], Giuseppe Gennari[4], Domenico Di Candia[3], Valentina Albertini[2] and Alessandra Kustermann[2]

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 7 (2019) 164–166
Contents lists available at ScienceDirect
Forensic Science International: Genetics Supplement Series
journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigss

How many DNA analyses are performed on adult sexual assault victims in Milan (Italy): A ten-year review

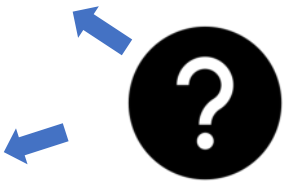
Andrea Piccinini[a,b,*], Paolo Bailo[a], Giulia Vignali[c], Giussy Barbara[b], Giuseppe Gennari[d], Domenico Di Candia[c], Valentina Albertini[b], Alessandra Kustermann[b]

3521 donne visitate presso SVSeD

- *622 minori (< 13)* → *Raccolta materiale biologico in 13 casi*
- *599 adolescenti (13-19 anni)* → *Raccolta materiale biologico in 473 casi* → *In 9 casi (1.9%) richieste analisi da A.G.*
- *2300 adulte (>19 anni)* → *Raccolta materiale biologico in 1211 casi* → *In 86 casi (7.1%) richieste analisi da A.G.*

Le pratiche investigative dei magistrati in uso da tempo si basano principalmente su perquisizioni e sequestri, testimonianze orali, intercettazioni telefoniche

I costi elevati delle analisi



PROGETTO MULTICENTRICO Ge.F.I.

Forensic Science International 314 (2020) 110387

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

Evaluation of critical aspects in clinical and forensic management of sexual violence: A multicentre Ge.F.I. project

Sarah Gino[a,*], Marco Bo[b], Rossana Ricciardelli[a,1], Milena Alù[c], Ilaria Boschi[d], Eugenia Carnevali[e], Matteo Fabbri[f], Paolo Fattorini[g], Andrea Piccinini[h], Carlo Previderè[i], Andrea Verzeletti[j], Pamela Tozzo[k], Luciana Caenazzo[k]

10 laboratori afferenti al Ge.F.I. (8 nord, 2 centro)
Solo due centri dedicati alla gestione della violenza sessuale

141 ?

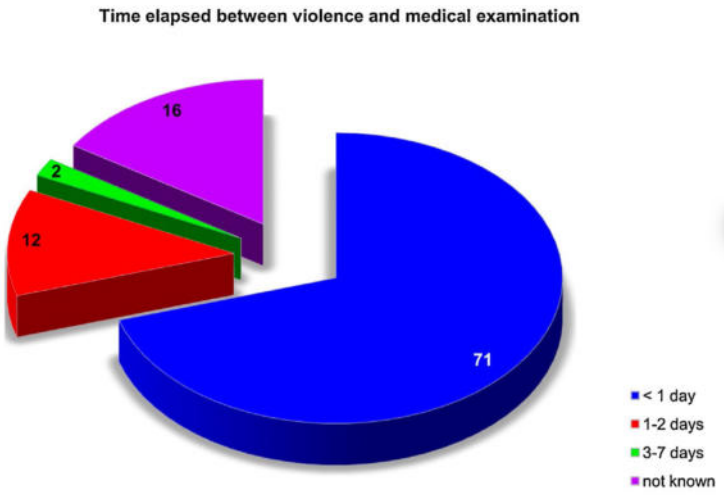
Caratteristiche del centro cui si è rivolta la persona abusata e del protocollo in uso

Caratteristiche del materiale biologico repertato e analisi genetico-forensi condotte

Caratteristiche demografiche della persona abusata, dell'evento, rapporto vittima-aggressore, tempo trascorso tra evento e presa in carico, attività svolte dalla vittima tra l'evento e la visita, tipologia delle lesioni riportate

2006-2017 - tutti casi attenzionati da A.G.

Sezioni del questionario	Risposte
Caratteristiche del centro	44.1% prese in carico presso un centro dedicato o un centro con PDTA per violenza sessuale
Caratteristiche demografiche della persona abusata, dell'evento, rapporto vittima-aggressore, tempo trascorso tra evento e presa in carico, attività svolte dalla vittima tra l'evento e la visita, tipologia delle lesioni riportate	▪ età 18-81 ▪ 57.8% italiane ▪ 69.6% visitate entro 24 ore dall'evento ▪ 68.6% in grado di collaborare al momento della visita ▪ 89.2% in grado di ricostruire l'accaduto almeno parzialmente ▪ 52.1% dei casi aggressore sconosciuto ▪ 13.7% dei casi violenza di gruppo ▪ 18.6% delle donne si è lavata prima di essere visitata
Caratteristiche del materiale biologico repertato e analisi genetico-forensi condotte	▪ nell' 80.4% dei casi repertati tamponi vaginali ▪ nel 39.2% dei casi repertato anche altro materiale biologico (es. materiale subungueale): questo soprattutto ad opera delle strutture dedicate o con PDTA ▪ nel 93.1% dei casi la consulenza genetico-forense assegnata entro 6 mesi dall'evento ▪ nel 26.5% dei casi ricerca spermatozoi (citologico) ▪ nel 61.8% dei casi test presuntivo per liquido seminale ▪ nel 49% dei casi lisi differenziale ▪ nel 47.1% dei casi (18.6% con Real-time) quantificazione ▪ nell'80.4% dei casi analizzati STR autosomici + STR cromosoma Y, nell'11.7% solo STR autosomici e nei restanti casi solo Y-STR



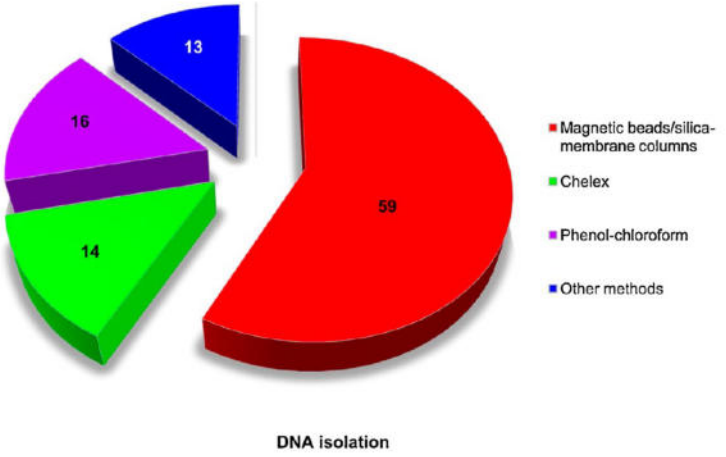
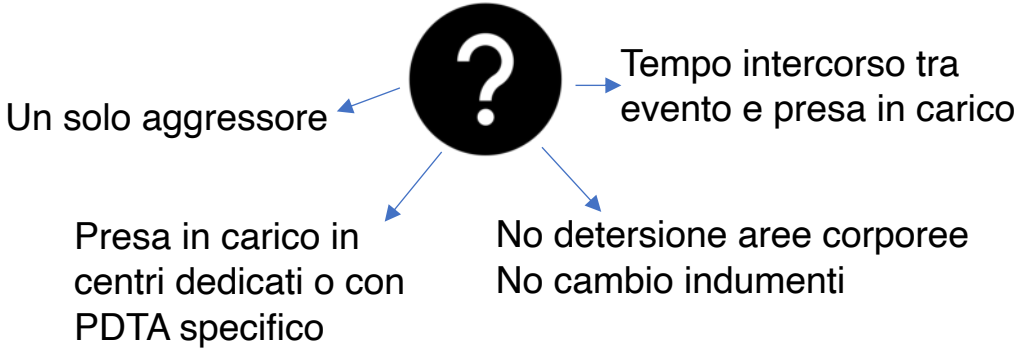


Table 2
Biological sample or other evidence collected at the time of the medical examination.

Biological sample/Other evidence	Number of women
Vaginal swab	82
Rectal swab	39
Oral swab	41
Other biological sample (i.e. sub-ungual scraping)	40
Underwear	50
Other clothes	49

Concordanza tra racconto e risultati di laboratorio



TAKE HOME MESSAGE

La violenza in tutte le sue forme rappresenta una violazione dei diritti umani.

Tutti i professionisti sanitari devono essere formati sulla violenza di genere, devono essere in grado di affrontare tale fenomeno qualunque sia l'età e il genere della persona assistita

I professionisti sanitari devono considerare il momento della raccolta dell'anamnesi cruciale sia per il percorso clinico assistenziale che per il percorso forense

La formazione deve essere estesa agli operatori della legge per:
- riconoscere il grande sforzo della persona assistita a sottoporsi all'esame e alla raccolta delle prove, spesso poco tempo dopo aver subito violenza;
- non rendere vano l'impegno degli operatori sanitari nella gestione clinico assistenziale e forense della persona assistita violata (in media una visita dura 3-4 ore).

AUTORITÀ GIUDIZIARIA E VIOLENZA SESSUALE

ANNO	SVS	ALTRI P.O.	SOTTO SEQUESTRO	RITIRATI	SOTTO SEQUESTRO E RITIRATI	SOTTO SEQUESTRO E DISTRUTTI
2017	66	22	1	2	-	-
2018	72	33	-	3	4	-
2019	70	34	2	3	-	1
2020	52	33	1	3	2	1
2021	61	29	-	2	1	-
2022	63	47	1	5	4	-
TOT	384	198	5	18	11	2

CASI DI VIOLENZA SESSUALE I CUI REPERTI SONO STATI DATI IN CUSTODIA AL CENTRO SVS DI TORINO DAL 2017 AL 2022

582

% di casi i cui reperti sono stati posti sotto sequestro dall'A.G.: 2.75%

% di casi i cui reperti sono stati ritirati per indagini di genetica forense: 4.98%

GENETICA FORENSE E FRAGILITÀ

Case-report

Ragazza di 17 anni con grave disabilità fisica e psichica.
A novembre 2020 viene portata dalla mamma all'ambulatorio che si occupa di donne disabili presso il P.O. Sant'Anna di Torino, perché da qualche tempo non ha il ciclo mestruale. All'ecografia si evidenzia gravidanza alla 21° settimana, ma vista la patologia della ragazza la ginecologa prospetta che il concepimento possa essere avvenuto prima (prime settimane di giugno).
Nel periodo estivo la ragazza non ha frequentato il centro diurno e quindi i sospetti si concentrano sul nucleo familiare e sulle persone che in quel periodo frequentavano la casa per svolgere dei lavori di ristrutturazione.

GENETICA FORENSE E FRAGILITÀ

Prelievi sul feto (muscolo quadricipite, cordone ombelicale, sangue)

Prelievo sulla madre

Prelievo su familiari di sesso maschile della minore: padre, fratello (15 anni), zio, cugino (maggiorenne), nonno paterno.

Risultati:

- confronto feto e padre della minore: per 13 dei 21 loci autosomici e per uno dei due loci Y STR studiati i due non condividono alcun allele;
- confronto feto e zio della minore: per 9 dei 21 loci autosomici studiati i due non condividono alcun allele;
- confronto feto e cugino della minore: per 9 dei 21 loci autosomici studiati i due non condividono alcun allele;
- confronto feto e fratello della minore: per 15 dei 21 loci autosomici e per uno dei due loci Y STR studiati i due non condividono alcun allele.

GENETICA FORENSE E FRAGILITÀ

Risultati:
- confronto feto e nonno della minore

LOCI	MINORE	FETO	NONNO DELLA MINORE	PI
Amel	XX	XY	XY	-
Y indel	-	2	2	-
DYS391	-	11	11	-
D3S1358	16,17	16,17	16,17	2.291
vWA	15,17	17,19	19,20	4.878
D16S539	12,14	11,14	9,11	1.596
CSF1PO	11,12	12	10,12	1.522
TPOX	9,11	8,11	8,11	0.938
D8S1179	10,13	13,16	13,16	15.804
D21S11	26,29	29	29,30	2.550
D18S51	14,15	14,19	12,19	13.107
D2S441	10,11	11	11	2.992
D19S433	13,14	14,16.2	14,16.2	30.542
TH01	7,9.3	9.3	9,9.3	1.493
FGA	20,22	22,24	24,26	3.555
D22S1045	11,14	14,15	15	3.116
D5S818	11	10,11	10,11	9.172
D13S317	11,12	12	12,13	1.621
D7S820	10	10	9,10	1.835
SE33	16,28.2	16,27.2	20,28.2	5.207×10^{-3}
D10S1248	13,14	13	12,13	1.714
D1S1656	15,16	15,15.3	15.3,16	8.342
D12S391	17,18	15,17	15,18	14.330
D2S1338	16,23	23	23,24	4.940
PI complessivo				2.9×10^{9}
PP complessivo				0.9999999997

Si è proceduto, inoltre, al calcolo del PI complessivo seguendo quanto riportato nelle "Raccomandazioni per gli accertamenti parentali", redatte dalla Società dei Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I.), secondo cui "... Nel caso di un singolo evento mutazionale che implichi l'acquisizione o la perdita di una singola unità di ripetizione in un locus STR, una stima conservativa consente di attribuire a quel sistema un valore di PI pari a 0,001 e procedere al calcolo biostatistico degli altri sistemi, e del PI cumulativo, nel modo usuale ...". Il PI complessivo così calcolato è risultato essere pari a circa 5.6x108.

GENETICA FORENSE E FRAGILITÀ

Risultati:
- il padre della minore e il nonno paterno della stessa per 8 dei 21 loci autosomici e per uno dei due loci Y STR studiati non condividono alcun allele

LOCI	PADRE DELLA MINORE	NONNO PATERNO DELLA MINORE
Amel	XY	XY
Y indel	2	2
DYS391	10	11
D3S1358	16,17	16,17
vWA	15	19,20
D16S539	10,12	9,11
CSF1PO	11,12	10,12
TPOX	9	8,11
D8S1179	10,11	13,16
D21S11	27,29	29,30
D18S51	14	12,19
D2S441	10,11	11
D19S433	14	14,16.2
TH01	7	9,9.3
FGA	22	24,26
D22S1045	11,16	15
D5S818	11,13	10,11
D13S317	11,13	12,13
D7S820	10	9,10
SE33	16,20	20,28.2
D10S1248	13,16	12,13
D1S1656	15,16	15.3,16
D12S391	15,18	15,18
D2S1338	17,23	23,24

INCIDENTAL FINDINGS

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE
Laboratorio di Medicina Legale

prof.ssa Sarah GINO
sarah.gino@uniupo.it

XXIX° Congresso Nazionale dei Genetisti Forensi Italiani
Messina 9-11 Novembre 2023

L'esperienza della prima linea: la Polizia Penitenziaria

Commissario Capo Tecnico Biologo Ilenia Pietrangeli
Commissario Capo Tecnico Biologo Elisabetta De Vittori

Laboratorio centrale per la Banca Dati Nazionale del DNA «Grazia De Carli», Roma
Ilenia.pietrangeli@giustizia.it

AGENDA

1

La Polizia Penitenziaria

- Chi Siamo
- Compiti istituzionali
- Reparti e Specialità

2

Il Laboratorio Centrale

- Trattato di Prum
- Istituzione Banca Dati e Laboratorio Centrale
- Prelievo biologico
- Workflow del Laboratorio Centrale

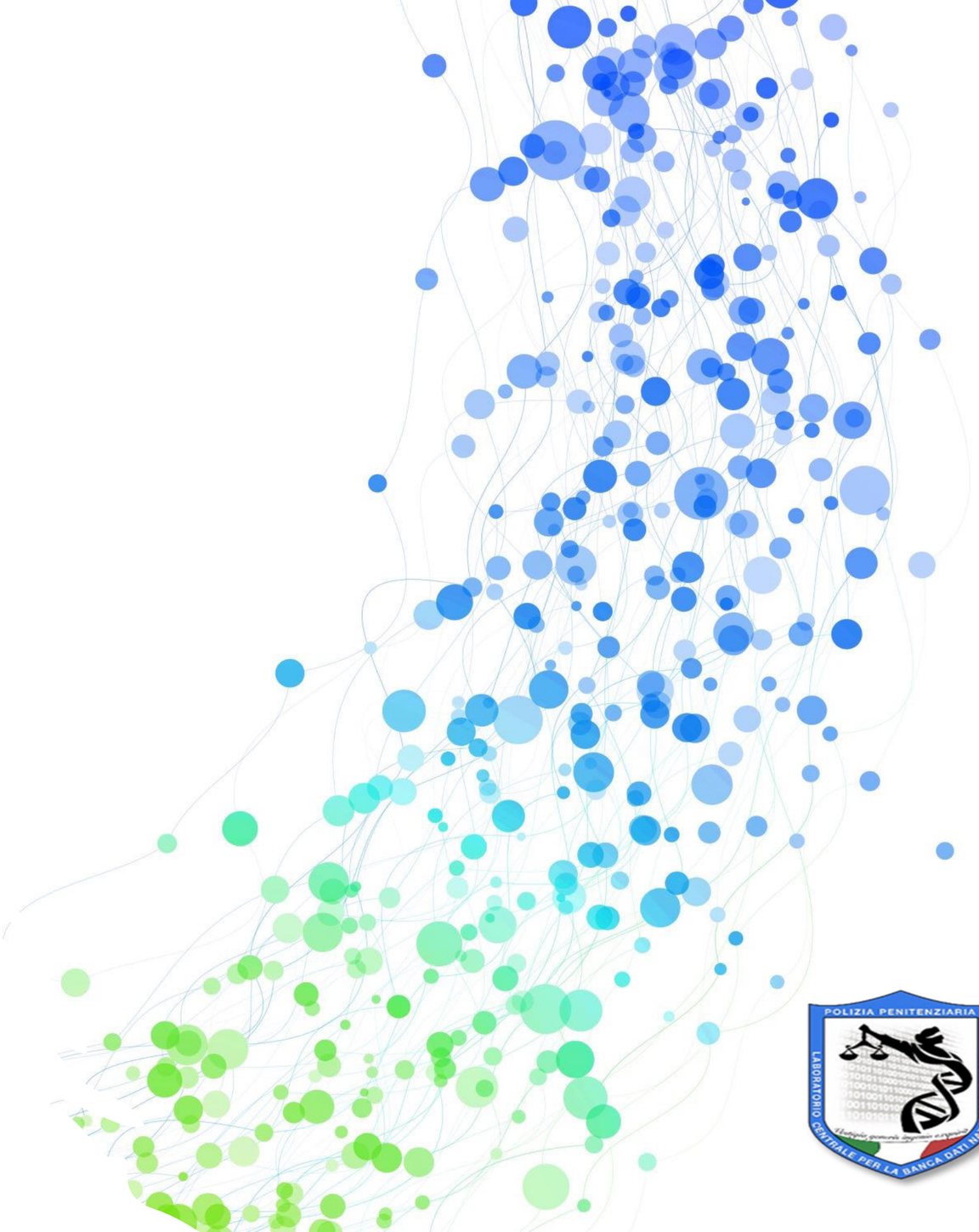
3

Risultati e prospettive future

- Risultati
- Piano di recupero del Backlog
- Nuove prospettive

1

LA POLIZIA PENITENZIARIA



CORPO DI POLIZIA PENITENZIARIA

Istituito con la Legge 395/1990 (che ha disciolto il corpo degli agenti di custodia) è posto alle dipendenze del Ministero della Giustizia , Dipartimento dell'Amministrazione penitenziaria.

”DESPONDERE SPEM MUNUS NOSTRUM”

CORPO DI POLIZIA PENITENZIARIA

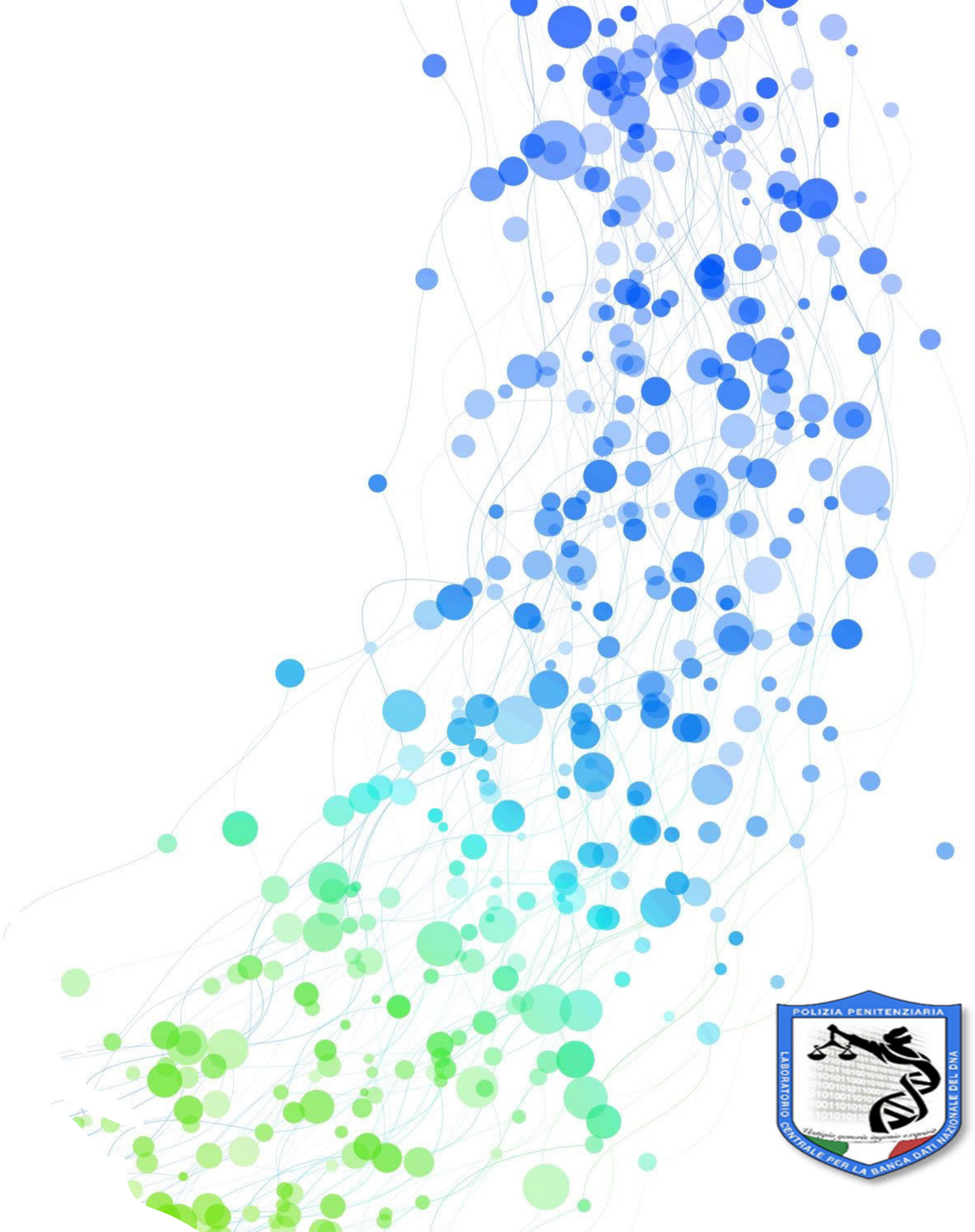
Compiti istituzionali

1. Assicurare l'esecuzione dei provvedimenti restrittivi della libertà personale;
2. garantisce l'ordine e tutela la sicurezza all'interno degli istituti penitenziari e delle strutture del Ministero della giustizia;
3. Partecipa, anche nell'ambito di gruppi di lavoro, alle attività di osservazione e di trattamento rieducativo dei detenuti e degli internati;
4. Espleta il servizio di traduzione dei detenuti ed internati ed il servizio di piantonamento dei detenuti ed internati ricoverati in luoghi esterni di cura,
5. Contribuisce a verificare il rispetto delle prescrizioni previste dai provvedimenti della magistratura di sorveglianza.
6. Collabora con la magistratura di sorveglianza operando presso ogni Tribunale e Ufficio di sorveglianza;
7. Assiste il pubblico ministero presso i Tribunali competenti
8. Svolge compiti di Pubblica Sicurezza e Soccorso Pubblico
9. Svolge compiti di Polizia Giudiziaria (artt. 55, 57 c.p.p.)

Reparti e Specialità

2

IL LABORATORIO CENTRALE



TRATTATO DI PRUM

Il trattato di Prüm è un accordo firmato a Prüm tra: Austria, Belgio, Francia, Germania, Lussemburgo, Spagna e Paesi Bassi il 27 maggio 2005.
Lo scopo principale del trattato era quello di migliorare lo scambio di informazioni tra gli Stati contraenti, in particolare dando accesso reciproco alle banche dati nazionali contenenti: profili DNA, impronte digitali e dati di immatricolazione dei veicoli.

Normativa nazionale

L. 85/2009

«Adesione della Repubblica italiana al Trattato concluso il 27 maggio 2005 tra il Regno del Belgio, la Repubblica federale di Germania, il Regno di Spagna, la Repubblica francese, il Granducato di Lussemburgo, il Regno dei Paesi Bassi e la Repubblica d'Austria, relativo all'approfondimento della cooperazione transfrontalera, in particolare allo scopo di contrastare il terrorismo, la criminalità transfrontaliera e la migrazione illegale (Trattato di Prüm). ***Istituzione della banca dati nazionale del DNA e del Laboratorio centrale per la banca dati nazionale del DNA****. Delega al Governo per l'istituzione dei ruoli tecnici del Corpo di polizia penitenziaria.* ***Modifiche al codice di procedura penale in materia di accertamenti tecnici idonei ad incidere sulla libertà personale****.»*

DPR 87/2016

«**Regolamento recante disposizioni di attuazione della legge 30 giugno 2009, n. 85**, concernente l'istituzione della banca dati nazionale del DNA e del laboratorio centrale per la banca dati nazionale del DNA, ai sensi dell'articolo 16 della legge n. 85 del 2009.»

DECRETO 8 novembre 2016 - MIN. INTERNO

Procedure per il trattamento dei dati, da parte della banca dati del DNA e del laboratorio centrale per la banca dati nazionale del DNA, e per la trasmissione del profilo del DNA da parte dei laboratori di istituzioni di elevata specializzazione, in attuazione degli articoli 3, 4 e 6 del decreto del Presidente della Repubblica 7 aprile 2016, n. 87.

DECRETO 12 MAGGIO 2017 – MIN. INTERNO

Previsioni normative

Istituzione della Banca dati nazionale del DNA e del Laboratorio centrale per la banca dati nazionale del DNA

Art. 5. *(Istituzione della banca dati nazionale del DNA e del laboratorio centrale per la banca dati nazionale del DNA)*

1. Al fine di facilitare l'identificazione degli autori dei delitti, presso il Ministero dell'interno, Dipartimento della pubblica sicurezza, è istituita la banca dati nazionale del DNA.

2. Presso il Ministero della giustizia, Dipartimento dell'amministrazione penitenziaria, è istituito il laboratorio centrale per la banca dati nazionale del DNA.

L. 85/2009 (art. 5)

Art. 3
Organizzazione e funzionamento della banca dati
e misure di sicurezza

1. La banca dati e' collocata presso il Ministero dell'interno, Dipartimento della pubblica sicurezza, Servizio per il sistema informativo interforze della Direzione centrale della Polizia criminale.

DPR 87/2016 (art. 3)

Art. 4

Organizzazione e funzionamento del laboratorio centrale e misure di sicurezza

1. Il laboratorio centrale e' collocato presso il Ministero della giustizia, Dipartimento dell'amministrazione penitenziaria - Direzione generale dei detenuti e del trattamento.

DPR 87/2016 (art. 4)

Previsioni normative

Il Laboratorio Centrale per la BDNDNA

Ministero della Giustizia

↓

Dipartimento dell'Amministrazione Penitenziaria

↓

Direzione Generale dei Detenuti e del Trattamento (DGDT)

↓

Ufficio VI - Laboratorio Centrale per la BDN DNA
I Dirigente Daniela Caputo

Mandato istituzionale

I PUNTI DI NORMA

Il Mandato Istituzionale: art.8 Legge 85/2009

Il Laboratorio Centrale provvede alla **tipizzazione del profilo** del DNA dei soggetti di cui all'articolo 9 commi 1 e 2 e alla **conservazione dei campioni** biologici dai quali vengono tipizzati i profili del DNA.

I Soggetti: art.9 Legge 85/2009

Ai fini dell'inserimento del profilo del DNA nella Banca Dati Nazionale, sono sottoposti al prelievo istituzionale di campioni biologici, i soggetti sottoposti **a misure di privazione della libertà** personale per delitti non colposi per i quali è consentito l'arresto facoltativo in flagranza.

Il Prelievo Biologico

I SOGGETTI

L. 85/2009 (art. 9)

Art. 9. *(Prelievo di campione biologico e tipizzazione del profilo del DNA)*

1. Ai fini dell'inserimento del profilo del DNA nella banca dati nazionale del DNA, sono sottoposti a prelievo di campioni biologici:
   a) i soggetti ai quali sia applicata la misura della custodia cautelare in carcere o quella degli arresti domiciliari;
   b) i soggetti arrestati in flagranza di reato o sottoposti a fermo di indiziato di delitto;
   c) i soggetti detenuti o internati a seguito di sentenza irrevocabile, per un delitto non colposo;
   d) i soggetti nei confronti dei quali sia applicata una misura alternativa alla detenzione a seguito di sentenza irrevocabile, per un delitto non colposo;
   e) i soggetti ai quali sia applicata, in via provvisoria o definitiva, una misura di sicurezza detentiva.

2. Il prelievo di cui al comma 1 può essere effettuato esclusivamente se si procede nei confronti dei soggetti di cui al comma 1 per delitti, non colposi, per i quali è consentito l'arresto facoltativo in flagranza. Il prelievo non può essere effettuato se si procede per i seguenti reati:
   a) reati di cui al libro II, titolo III, capo I, tranne quelli di cui agli articoli 368, 371-bis, 371-ter, 372, 374 aggravato ai sensi dell'articolo 375, 378 e 379, e capo II, tranne quello di cui all'articolo 390, del codice penale;
   b) reati di cui al libro II, titolo VII, capo I, tranne quelli di cui all'articolo 453, e capo II, del codice penale;
   c) reati di cui al libro II, titolo VIII, capo I, tranne quelli di cui all'articolo 499, e capo II, tranne quello di cui all'articolo 513-bis, del codice penale;
   d) reati di cui al libro II, titolo XI, capo I, del codice penale;
   e) reati di cui al *regio decreto 16 marzo 1942, n. 267*;
   f) reati previsti dal *codice civile*;
   g) reati in materia tributaria;
   h) reati previsti dal testo unico delle disposizioni in materia di intermediazione finanziaria, di cui al *decreto legislativo 24 febbraio 1998, n. 58*.

3. Nel caso di arresto in flagranza di reato o di fermo di indiziato di delitto, il prelievo è effettuato dopo la convalida da parte del giudice.

Ai fini dell'inserimento del profilo del DNA nella banca dati nazionale del DNA:

1. sono sottoposti a prelievo salivare soggetti **condannati** con provvedimento irrevocabile ma anche **imputati** o **indagati** PURCHÉ sottoposti ad una misura di privazione della libertà personale:
   a. **misure cautelari personali coercitive** (custodia cautelare in carcere, arresti domiciliari) – co 1 lettera a
   b. **misure precautelari** (arresto e fermo di indiziato di delitto) – co 1 lettera b
   c. **misure di sicurezza detentive a seguito di sentenza irrevocabile** – co 1 lettera c
   d. **misure di sicurezza alternative alla detenzione a seguito di sentenza irrevocabile** – co 1 lettera d
   e. **misure di sicurezza detentive provvisorie o definitive** (nei confronti di soggetti comunque ritenuti socialmente pericolosi) – co 1 lettera e
2. Solo nei casi di ben definite tipologie di reati (co. 2) che rientrano nella categoria dei **delitti, non colposi, per i quali è consentito l'arresto facoltativo in flagranza**

Il Prelievo Biologico

I SOGGETTI

POPOLAZIONE CARCERARIA

30/06/2016	**54.072**
31/12/2016	54.653
30/06/2017	56.919
31/12/2017	57.608
30/06/2018	58.759
31/12/2018	59.655
30/06/2019	60.522
31/12/2019	60.769
30/06/2020	53.579
31/12/2020	53.364
30/06/2021	53.637
31/12/2021	54.134
30/06/2022	54.841
31/12/2022	56.196
30/06/2023	57.525

ANNI	Entrati dalla libertà nel corso dell'anno	Usciti in libertà nel corso dell'anno (*)
2000	81.397	73.583
2001	78.649	70.693
2002	81.185	73.503
2003	81.790	76.100
2004	82.275	73.032
2005	89.887	78.426
2006	90.714	112.583
2007	90.441	73.759
2008	92.800	76.136
2009	88.066	73.273
2010	84.641	71.324
2011	76.982	66.904
2012	63.020	54.309
2013	59.390	52.727
2014	50.217	51.902
2015	45.823	39.819
2016	47.342	36.330
2017	48.144	36.332
2018	47.257	36.684
2019	46.201	35.946
2020	35.280	31.555
2021	36.539	28.950
2022	38.125	27.866

Fonte: DAP - Ufficio del Capo del Dipartimento - Segretena generale - Sezione statistica

120.000

Il Prelievo Biologico

I SOGGETTI

Numero di carcerazioni precedenti	Detenuti presenti al 31/12/22			% su totale presenti	
	italiani	stranieri (*)	Totale	italiani	stranieri
nessuna	12.303	9.635	21.938	31,9	54,5
fino a 4	18854	7220	26.074	49,0	40,8
da 5 a 9	5736	737	6.473	14,9	4,2
10 e oltre	1620	91	1.711	4,2	0,5
totale detenuti con precedenti	*26210*	*8048*	*34258*	*68,1*	*45,5*
Totale detenuti	**38.513**	**17.683**	**56.196**	**100,0**	**100,0**

Numero di carcerazioni precedenti con condanna definitiva	Condannati presenti al 31/12/22			% su totale condannati	
	italiani	stranieri (*)	Totale	italiani	stranieri
nessuna	14.987	9.116	24.103	53,4	74,6
fino a 4	11630	3002	14.632	41,5	24,6
da 5 a 9	1310	98	1.408	4,7	0,8
10 e oltre	121	5	126	0,4	0,0
totale detenuti con precedenti	*13061*	*3105*	*16166*	*46,6*	*25,4*
Totale detenuti	**28.048**	**12.221**	**40.269**	**100,0**	**100,0**

Fonte: DAP - Ufficio del Capo del Dipartimento - Segreteria Generale - Sezione Statistica

(*) per gli stranieri il numero di carcerazioni precedenti potrebbe essere sottostimato a causa delle maggiori difficoltà nell'identificazione di questi soggetti rispetto agli italiani.
Inoltre trattandosi per lo più di extracomunitari senza permesso di soggiorno è probabile che dopo la scarcerazione vengano espulsi o che si trasferiscano in un altro Paese.

Principali tipologie di reato	Dettaglio reati	Detenuti presenti al 31/12/2022						% detenuti per reato su totale complessivo detenuti (*)		
		Detenuti italiani	Detenuti stranieri	Totale detenuti per reato	di cui condannati	% condannati su totale detenuti per reato	% stranieri su totale detenuti per reato	Detenuti italiani	Detenuti stranieri	Totale detenuti
ASSOCIAZIONE DI STAMPO MAFIOSO		8.791	277	9.068	5.186	57,2	3,1	22,8	1,6	16,1
TU STUPEFACENTI		13.527	5.811	19.338	14.292	73,9	30,0	35,1	32,9	34,4
LEGGE ARMI		8.497	663	9.160	7.193	78,5	7,2	22,1	3,7	16,3
ORDINE PUBBLICO	ALTRI REATI	94	17	111	96	86,5	15,3	0,2	0,1	0,2
	ASSOCIAZIONE PER DELINQUERE	2.059	464	2.523	2.021	80,1	18,4	5,3	2,6	4,5
CONTRO IL PATRIMONIO	FURTO	8.584	4.469	13.053	11.306	86,6	34,2	22,3	25,3	23,2
	RAPINA	12.013	5.111	17.124	13.056	76,2	29,8	31,2	28,9	30,5
	ESTORSIONE	7.719	804	8.523	6.023	70,7	9,4	20,0	4,5	15,2
	SEQUESTRO DI PERSONA	276	137	413	316	76,5	33,2	0,7	0,8	0,7
	DANNI A COSE, ANIMALI, TERRENI, ECC.	2.479	1.021	3.500	3.064	87,5	29,2	6,4	5,8	6,2
	TRUFFA	1.924	108	2.032	1.865	91,8	5,3	5,0	0,6	3,6
	APPROPRIAZIONE INDEBITA	361	21	382	368	96,3	5,5	0,9	0,1	0,7
	RICETTAZIONE	8.650	1.983	10.633	9.204	86,6	18,6	22,5	11,2	18,9
	INSOLVENZA FRAUDOLENTA	955	51	1.006	817	81,2	5,1	2,5	0,3	1,8
PROSTITUZIONE		162	358	520	447	86,0	68,8	0,4	2,0	0,9
CONTRO LA PUBBLICA AMMINISTRAZIONE	VIOLENZA, RESISTENZA, OLTRAGGIO, ECC.	5.199	3.415	8.614	7.215	83,8	39,6	13,5	19,3	15,3
	PECULATO, MALVERSAZIONE, ECC.	376	37	413	327	79,2	9,0	1,0	0,2	0,7
	OMISSIONE D'ATTI D'UFFICIO, ECC.	448	42	490	399	81,4	8,6	1,2	0,2	0,9
INCOLUMITA' PUBBLICA	STRAGE	155	6	161	154	95,7	3,7	0,4	0,0	0,3
	ALTRI REATI	1.329	206	1.535	1.264	82,3	13,4	3,5	1,2	2,7
FEDE PUBBLICA	FALSITA' IN MONETE	305	74	379	346	91,3	19,5	0,8	0,4	0,7
	FALSITA' IN SIGILLI	293	85	378	370	97,9	22,5	0,8	0,5	0,7
	FALSITA' IN ATTI E PERSONE	2.723	1.303	4.026	3.741	92,9	32,4	7,1	7,4	7,2
MORALITA' PUBBLICA	ATTI OSCENI	38	38	76	68	89,5	50,0	0,1	0,2	0,1
	PUBBLICAZIONI E SPETTACOLI OSCENI	3	5	8	7	87,5	62,5	0,0	0,0	0,0
CONTRO LA FAMIGLIA	VIOLAZIONE OBBLIGHI ASSISTENZA FAMILIARE	281	69	350	338	96,6	19,7	0,7	0,4	0,6
	MALTRATTAMENTI IN FAMIGLIA	3.494	1.277	4.771	3.214	67,4	26,8	9,1	7,2	8,5
	BIGAMIA, INCESTO, ECC.	58	31	89	81	91,0	34,8	0,2	0,2	0,2
	INTERRUZIONE DELLA GRAVIDANZA	10	10	20	20	100,0	50,0	0,0	0,1	0,0
CONTRO LA PERSONA	OMICIDIO VOLONTARIO	6.705	1.880	8.585	6.829	79,5	21,9	17,4	10,6	15,3
	INFANTICIDIO	5	1	6	5	83,3	16,7	0,0	0,0	0,0
	OMICIDIO PRETERINTENZIONALE	122	84	206	182	88,3	40,8	0,3	0,5	0,4
	OMICIDIO COLPOSO	127	65	192	177	92,2	33,9	0,3	0,4	0,3
	PERCOSSE	193	72	265	237	89,4	27,2	0,5	0,4	0,5
	LESIONI PERSONALI VOLONTARIE	7.182	4.344	11.526	9.650	83,7	37,7	18,6	24,6	20,5
	LESIONI PERSONALI COLPOSE	135	106	241	196	81,3	44,0	0,4	0,6	0,4
	ALTRI REATI	249	219	468	411	87,8	46,8	0,6	1,2	0,8
	VIOLENZA PRIVATA MINACCIA	5.749	1.964	7.713	6.156	79,8	25,5	14,9	11,1	13,7
	VIOLENZE SESSUALI	2.100	1.531	3.631	2.946	81,1	42,2	5,5	8,7	6,5
	ATTI SESSUALI CON MINORENNE	443	139	582	516	88,7	23,9	1,2	0,8	1,0
	CORRUZIONE DI MINORENNE	77	24	101	82	81,2	23,8	0,2	0,1	0,2
	PROSTITUZIONE MINORILE	97	91	188	161	85,6	48,4	0,3	0,5	0,3
	PORNOGRAFIA MINORILE	169	22	191	134	70,2	11,5	0,4	0,1	0,3
	DETENZIONE MATERIALE PORNOGRAFICO	153	13	166	128	77,1	7,8	0,4	0,1	0,3
	TURISMO FINALIZZATO ALLO SFRUTTAMENTO DEI MINORI	1	1	2	1	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0
	INGIURIE E DIFFAMAZIONI	249	43	292	255	87,3	15,4	0,6	0,2	0,5
CONTRO LA PERSONALITA' DELLO STATO		99	41	140	105	75,0	29,3	0,3	0,2	0,2
CONTRO L'AMM. DELLA GIUSTIZIA		5.480	1.205	6.685	6.086	91,0	18,0	14,2	6,8	11,9
ECONOMIA PUBBLICA	FRODE NELL'ESERCIZIO DEL COMMERCIO	9	1	10	10	100,0	10,0	0,0	0,0	0,0
	VENDITA SOSTANZE ALIMENTARI NON GENUINE	3	-	3	3	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ARBITRARIA INVASIONE AZIENDE	301	11	312	197	63,1	3,5	0,8	0,1	0,6
	BANCAROTTA	568	11	579	551	95,2	1,9	1,5	0,1	1,0
	EMISSIONE DI ASSEGNI A VUOTO	8	1	9	9	100,0	11,1	0,0	0,0	0,0
CONTRAVVENZIONI		3.238	684	3.922	3.456	88,1	17,4	8,4	3,9	7,0
TU IMMIGRAZIONE		134	1.428	1.562	1.024	65,6	91,4	0,3	8,1	2,8
CONTRO IL SENTIMENTO RELIGIOSO		913	100	1.013	918	90,6	9,9	2,4	0,6	1,8
ALTRI REATI		2.037	164	2.201	1.986	90,2	7,5	5,3	0,9	3,9

(*) si ottiene rapportando il numero dei detenuti per reato con il totale complessivo dei detenuti

Fonte: DAP - Ufficio del Capo del Dipartimento - Segreteria Generale - Sezione Statistica

Il Prelievo Biologico

I SOGGETTI

DPR 87/2016 (art. 5)

Al prelievo ai soggetti indicati all'art. 9 della L. 85/2009 procede, utilizzando software **AFIS** (*Automated Fingerprint Identification System*) in dotazione alle FFPP:

- ✓ il personale della **forza di polizia delegata** all'esecuzione del provvedimento restrittivo, specificamente formato e addestrato nei casi indicati all'art. 5 co 3:

> a) applicazione di ordinanza che dispone gli arresti domiciliari, la permanenza in casa o il collocamento in comunita';
> b) arresto in flagranza o fermo, con esclusione dei casi in cui, dopo il giudizio di convalida, sia disposta l'associazione ad un istituto penitenziario;
> c) applicazione di una misura alternativa alla detenzione, se il soggetto non e' in stato di custodia;
> d) applicazione di una misura di sicurezza detentiva, anche nella forma del collocamento in comunita'.

- ✓ il personale di **Polizia Penitenziaria**, specificamente formato e addestrato, negli altri casi (sostanzialmente ogni qualvolta il soggetto è associato ad un istituto penitenziario)

Il Prelievo biologico

LE FASI

AZIONI

Identificazione dei soggetti su AFIS

I soggetti di cui all'articolo 9 della Legge sono sottoposti al prelievo di due campioni di mucosa orale, previa identificazione tramite accesso telematico all'AFIS. Il primo prelievo è effettuato soltanto se il soggetto non è stato già sottoposto ad analoga operazione.

Codice Univoco Identificativo (CUI) e Codice Prelievo

Codici alfa-numerici generati in automatico dal sistema AFIS e legati univocamente alla persona di cui all'articolo 9 della Legge.

Due prelievi per ciascun soggetto

Il prelievo viene effettuato in doppio su ciascun soggetto. I campioni biologici, conservati a temperatura ambiente.

La catena di custodia

I campioni biologici prelevati vengono inviati al Laboratorio Centrale in plichi chiusi con sigillo antieffrazione (mediante tracciamento su portale IXP-SSII)

Cancellazione e distruzione

PROFILI GENETICI, CAMPIONI BIOLOGICI, CANCELLAZIONE DATI

Profili genetici

art.25 DPR 87/2016

La Banca Dati è utile soprattutto nei fenomeni di recidiva, perciò è importante che i dati siano conservati per un numero congruo di anni.

Per ragioni di garanzia, è stabilito che i profili del DNA ottenuti da soggetti di cui all'art. 9 della Legge siano conservati nella Banca Dati nazionale del DNA per **30 anni** e **40 anni in caso di condanna per recidiva.**

Campioni biologici

art.24 DPR 87/2016

La parte di campione biologico non utilizzata e il secondo campione di riserva sono conservati per un periodo di **8 anni**.

Decorso il termine, i campioni biologici devono essere distrutti da parte del personale in servizio presso il Laboratorio centrale e redatto verbale.

Cancellazione dei dati

artt.29-32 DPR 87/2016

Nel caso di **assoluzione con sentenza definitiva** perché il fatto non sussiste o perché l'imputato non lo ha commesso e quando le operazioni di prelievo sono state compiute in **violazione delle disposizioni** previste dall'articolo 9 della Legge.

Alimentazione della Banca Dati

ISO 17025
ACCREDITED
LABORATORY

EVIDENCE INDEX

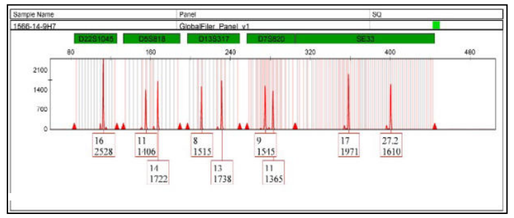
MATCH

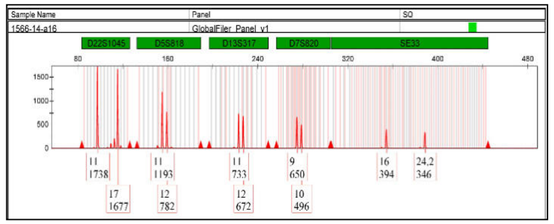
OFFENDER INDEX

MISSING PERSON AND
RELATIVE INDEX

Il confronto tra profili genetici in Banca Dati

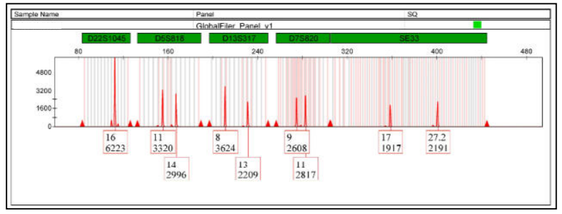
CONCORDANZA, QUASI CONCORDANZA, DISCORDANZA





CONCORDANZA

DISCORDANZA



Art.10 DPR 87/2016

Il confronto può portare a tre esiti:

- **CONCORDANZA** – ≥ 10 loci con concordanza di tutti i valori allelici (esito positivo del confronto)
- **QUASI CONCORDANZA** – solo un allele è discordante e ≥ 7 loci sono pienamente concordanti (una quasi concordanza è ammessa solo in caso di concordanza totale di almeno 7 loci dei due profili del DNA raffrontati) (esito positivo del confronto)
- **DISCORDANZA** – gli altri casi (esito negativo del confronto)

L'Attività tecnica

METODOLOGIE DI ANALSI DEI CAMPIONI BIOLOGICI

Art.11 Legge 85/2009

L'analisi di tipizzazione del DNA è condotta:

- solo su regioni del DNA dalle quali **non siano desumibili informazioni** sulle caratteristiche del soggetto analizzato, quali ad esempio le patologie;
- solo in laboratori certificati a norma **ISO/IEC 17025**;
- solo sulla base dei parametri analitici riconosciuti a livello internazionale e indicati dall'**ENFSI**, in modo da assicurarne l'uniformità

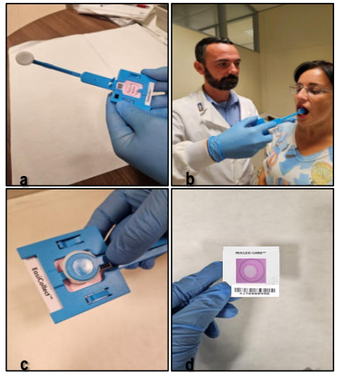
Artt. 4,6,10 Regolamento

- Tutte le operazioni di laboratorio devono essere gestite da un sistema **LIMS** (Laboratory Information Management System): un sistema informativo idoneo a gestire i dati e il flusso di lavoro di un laboratorio (artt. 4 e 6)
- Possono essere archiviati in Banca Dati solo i profili del DNA ottenuti con metodi accreditati a norma **ISO/IEC 17025**, e successive modificazioni (art. 10)

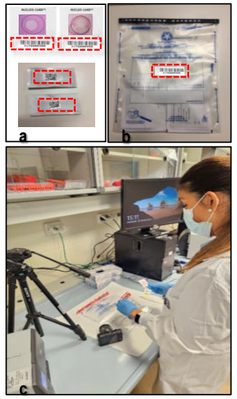
L'Attività tecnica

IL WORKFLOW

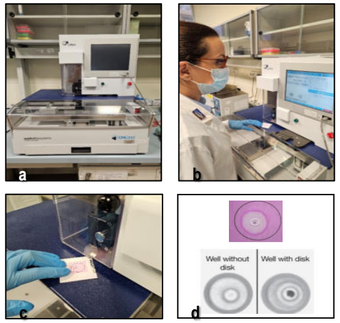
SAMPLE COLLECTION



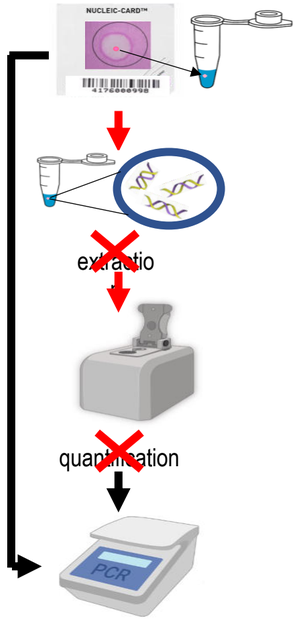
INSPECTION



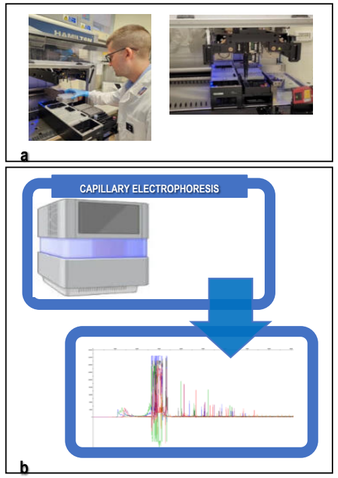
PUNCHING



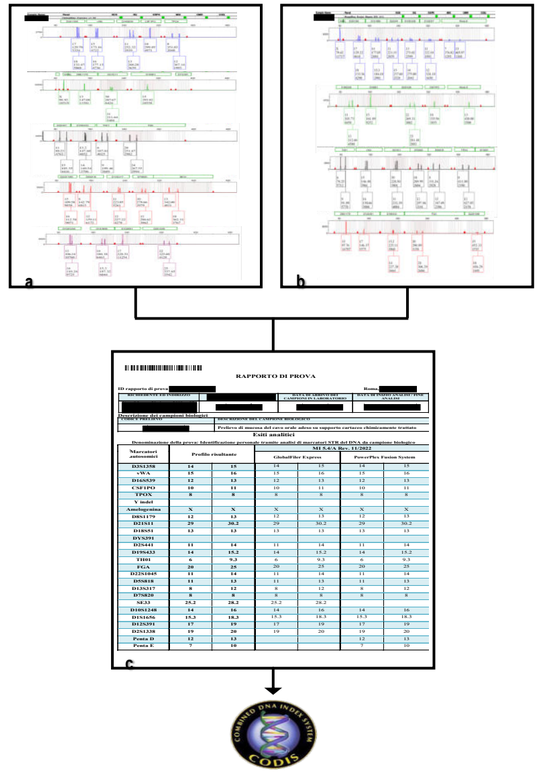
DIRECT AMPLIFICATION



DETECTION



DOUBLE CHECKED ANALYSYS



L’Attività tecnica

ACCETTAZIONE, CONSTATAZIONE E ISPEZIONE

Accettazione

Il personale in servizio presso il Laboratorio Centrale debitamente formato e autorizzato, effettua una prima verifica tattile e visiva di conformità dei plichi e successivamente prende in custodia i campioni accettati tramite software IXP.

Registra tutte le operazioni sul sistema informatico di registrazione dei dati LIMS, i cui file di log vengono conservati per il tempo stabilito dalla Legge.

I campioni accettati vengono posizionati nella Biobanca e ogni spostamento è tracciato mediante un sistema di gestione informatico.

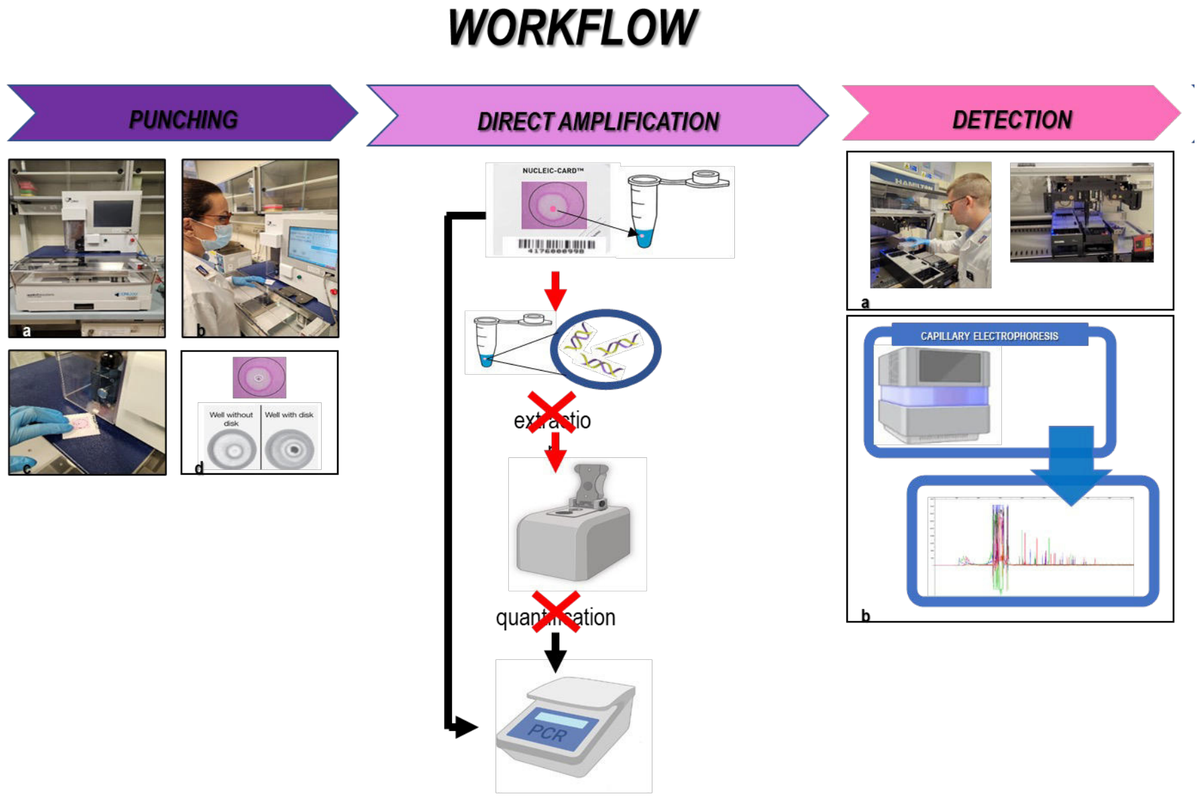
Ispezione e Constatazione

Apertura e verifica del plico sigillato:

- un campione verrà conservato in Biobanca in una nuova busta di sicurezza a disposizione dell’Autorità Giudiziaria;
- l'altro campione viene sottoposto a tipizzazione del DNA.

L'Attività tecnica

TIPIZZAZIONE

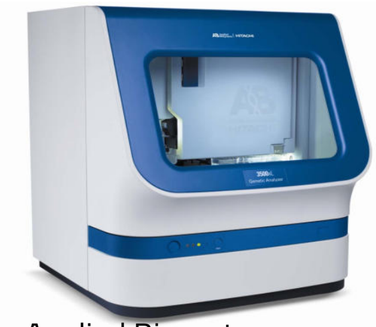


Prodotti profili a 26 loci autosomici e 28 loci Y

- GlobalFiler
- PowerPlex Fusion
- Investigator 24Plex GO!
- Investigator Argus Y-28
- YfilerPlus
- PowerPlex Y23

L’Attività tecnica

TIPIZZAZIONE



Applied Biosystems
3500xL Genetic Analyzer
(Thermo Fisher Scientific)

Tracciato analitico
(elettroferogramma)

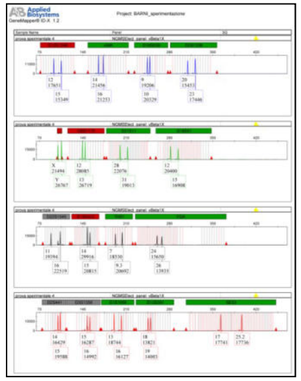
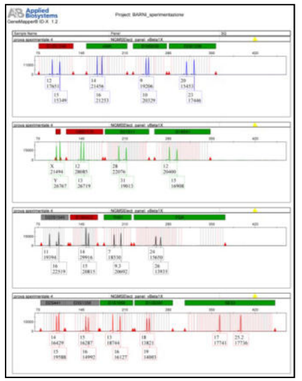
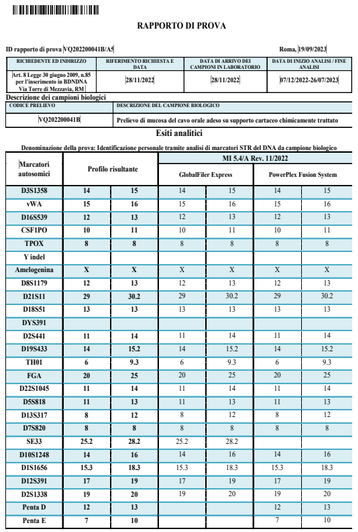


Tabella riepilogativa
(del profilo genetico)



Rapporto di prova
contenente il profilo
genetico risultante



RAPPORTO DI PROVA

ID rapporto di prova [VQ202200041B/A5] Roma, [19/09/2022]

RICHIEDENTE ED INDIRIZZO	RIFERIMENTO RICHIESTA E DATA	DATA DI ARRIVO DEI CAMPIONI IN LABORATORIO	DATA DI INIZIO ANALISI / FINE ANALISI
Art. 8 Legge 30 giugno 2009, n.85 per l'inserimento in BDNDNA Via Torre di Mezzavia, RM	[28/11/2022]	[28/11/2022]	[07/12/2022-26/07/2023]

Descrizione dei campioni biologici

CODICE PRELIEVO	DESCRIZIONE DEL CAMPIONE BIOLOGICO
[VQ202200041B]	Prelievo di mucosa del cavo orale adeso su supporto cartaceo chimicamente trattato

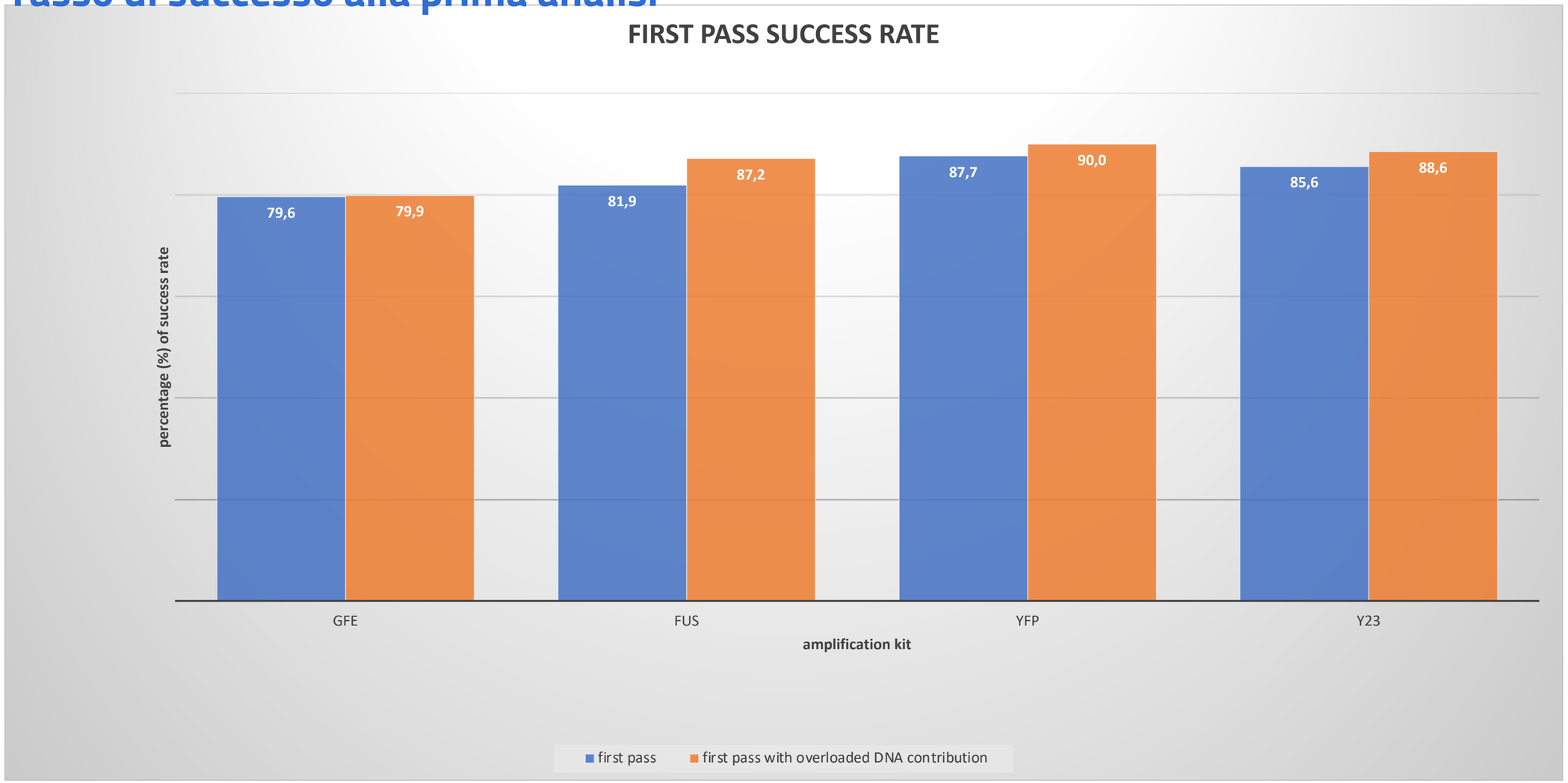
Esiti analitici

Denominazione della prova: Identificazione personale tramite analisi di marcatori STR del DNA da campione biologico

Marcatori autosomici	Profilo risultante		MI 5.4/A Rev. 11/2022			
			GlobalFiler Express		PowerPlex Fusion System	
D3S1358	14	15	14	15	14	15
vWA	15	16	15	16	15	16
D16S539	12	13	12	13	12	13
CSF1PO	10	11	10	11	10	11
TPOX	8	8	8	8	8	8
Y indel						
Amelogenina	X	X	X	X	X	X
D8S1179	12	13	12	13	12	13
D21S11	29	30.2	29	30.2	29	30.2
D18S51	13	13	13	13	13	13
DYS391						
D2S441	11	14	11	14	11	14
D19S433	14	15.2	14	15.2	14	15.2
TH01	6	9.3	6	9.3	6	9.3
FGA	20	25	20	25	20	25
D22S1045	11	14	11	14	11	14
D5S818	11	13	11	13	11	13
D13S317	8	12	8	12	8	12
D7S820	8	8	8	8	8	8
SE33	25.2	28.2	25.2	28.2		
D10S1248	14	16	14	16	14	16
D1S1656	15.3	18.3	15.3	18.3	15.3	18.3
D12S391	17	19	17	19	17	19
D2S1338	19	20	19	20	19	20
Penta D	12	13			12	13
Penta E	7	10			7	10

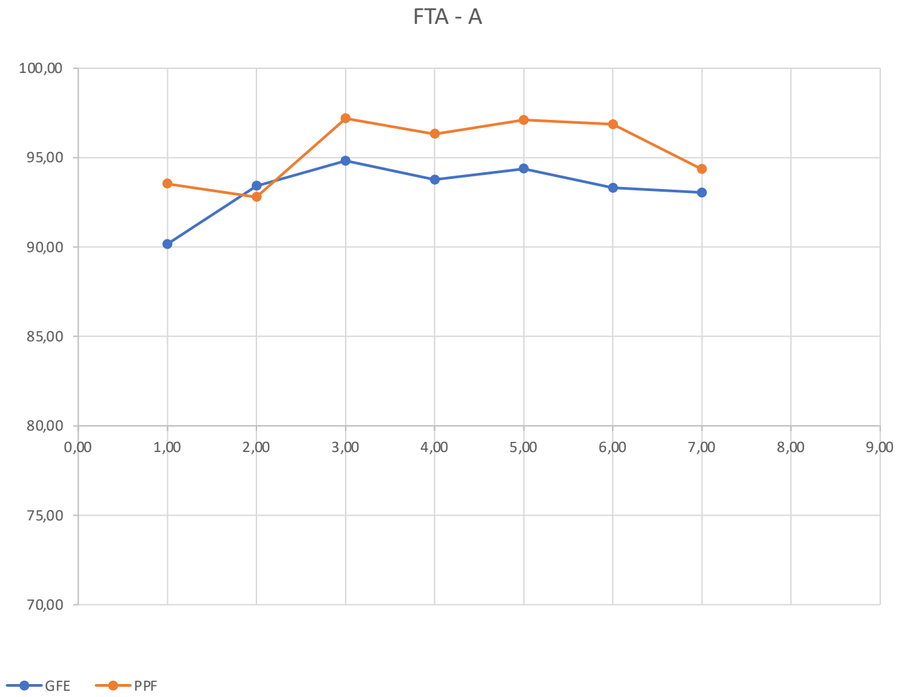
L'Attività tecnica

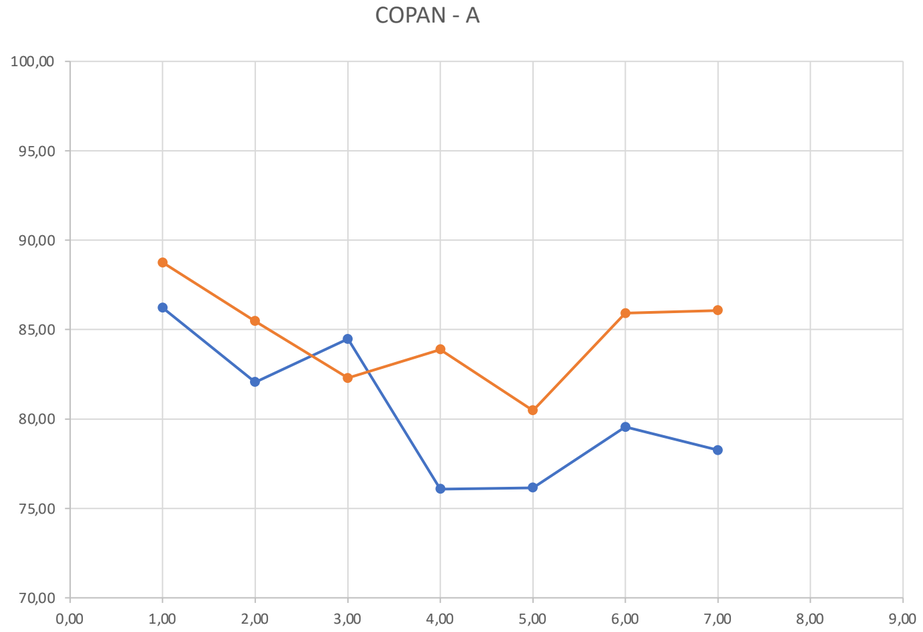
Tasso di successo alla prima analisi

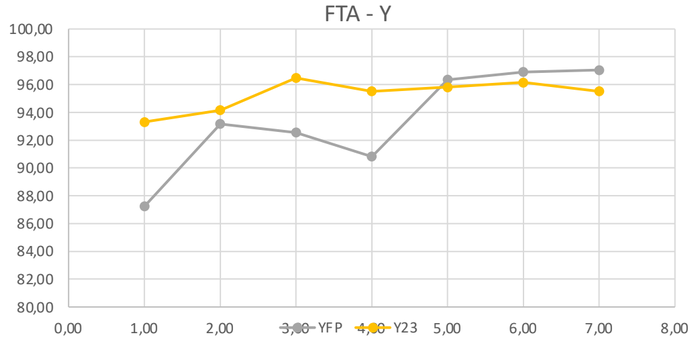


L'Attività tecnica

Tasso di successo alla prima analisi/età prelievo

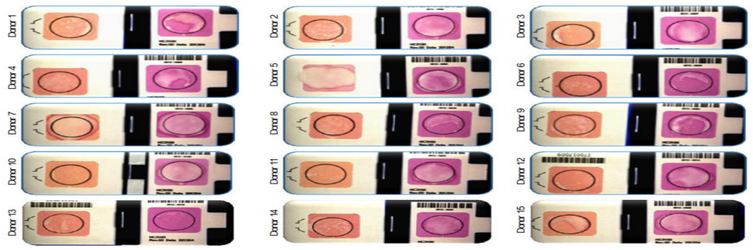




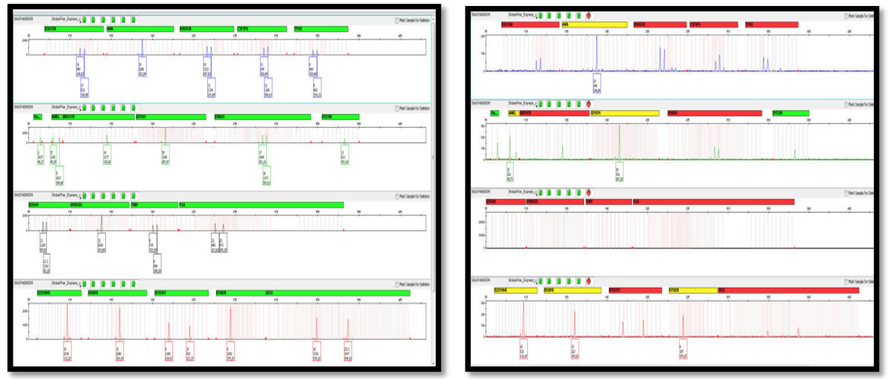


Problematiche:

Variabilità del donatore



Variabilità nella stessa card (punch 2mm)



Recovery e seconde card

- Nel caso di profilo genetico con <10 loci l'analisi viene ripetuta ripartendo dalla fase del punching
- Tempi e costi di analisi raddoppiano
- A fronte di un risultato negativo è prevista la ripetizione del prelievo o analisi della seconda card (numero di analisi raddoppiano)

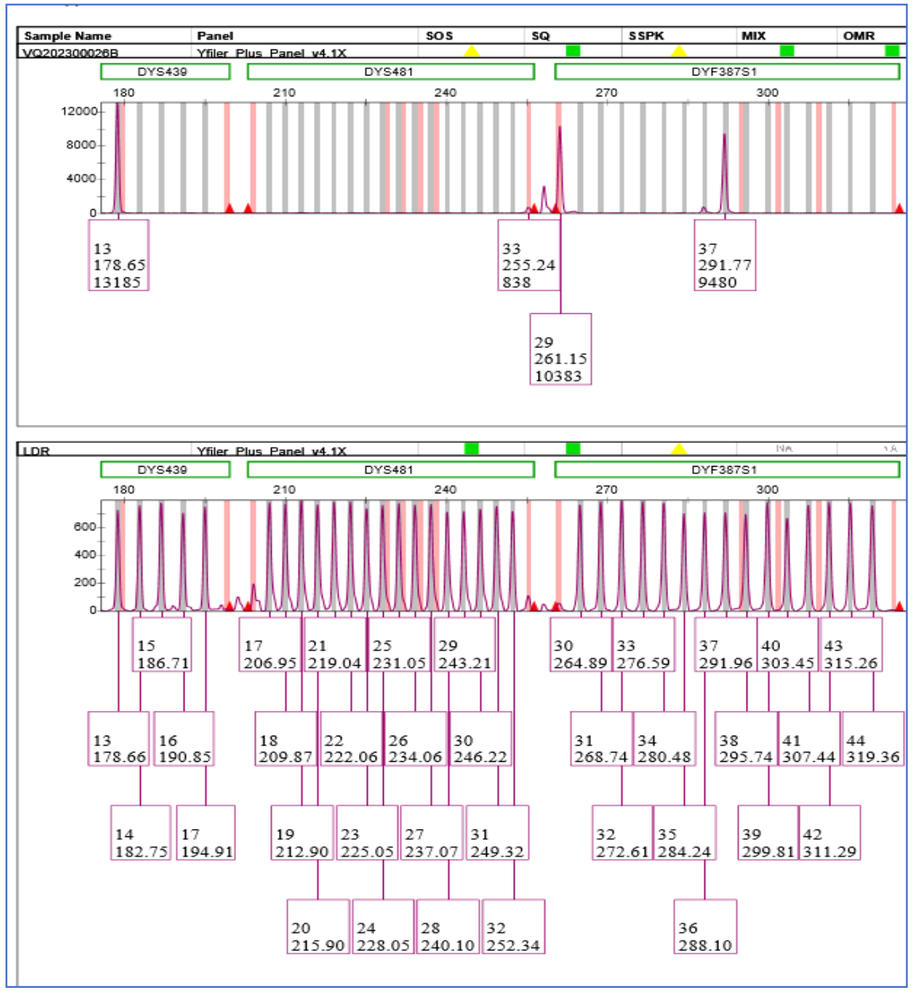
Identificazione di alleli rari/mutazioni

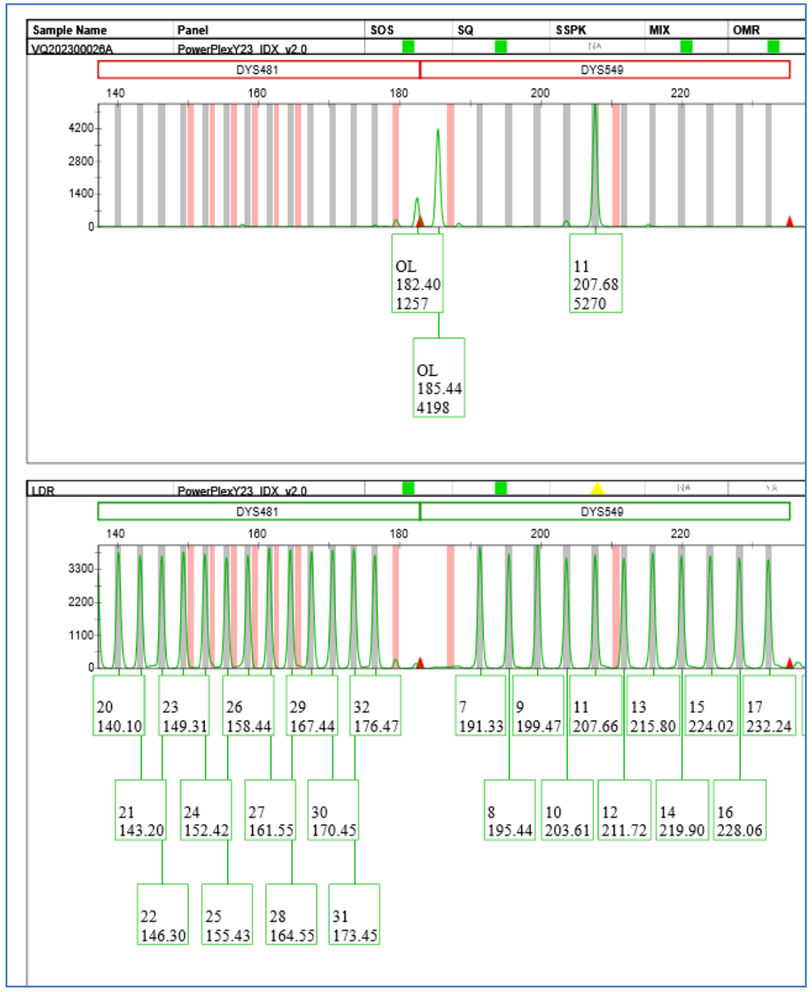
- Match parziali
- Difformità rispetto ai Laboratori che utilizzano solo 1 chimica

Problematiche:

Proficiency test CTS Test 23-5840

Item 3





Problematiche:

Proficiency test CTS Test 23-5840

Collaborative Testing Services, Inc.
Individual Report, continued
Test 23-5840: DNA Database - Saliva

Participant Code: **U8787A**
WebCode: **64JLVL**

YSTR Amplification Kit(s) & Results for Participant U8787A

Amplification Kit Item	DYF387S1	DYS19	DYS385	DYS389-I	DYS389-II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393
	DYS437	DYS438	DYS439	DYS448	DYS449	DYS456	DYS458	DYS460	DYS481
	DYS518	DYS533	DYS549	DYS570	DYS576	DYS627	DYS635	DYS643	YGATAH4
Yfiler® Plus, PowerPlex® Y 23									
3	37	16	14,18	13	29	23	10	11	14
	14	9	13	18	32	15	16	10	
	37	12	11	18	18	21	22	12	11
3	29,37	16	14,18	13	29	23	10	11	14
	14	9	13	18	32	15	16	10	*
	37	12	11	18	18	21	22	12	11

* A consensus was not achieved for the loci indicated.

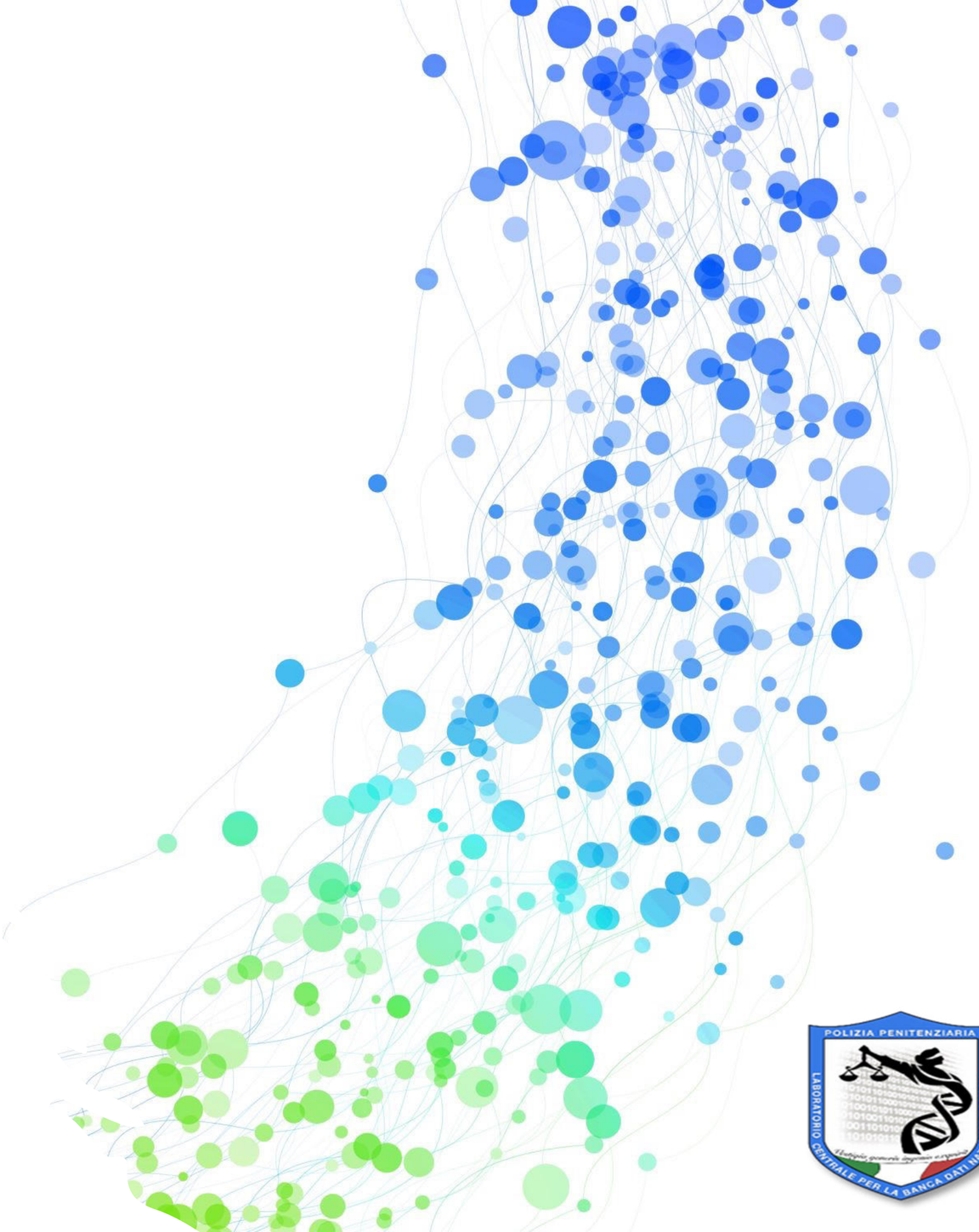
Additional Comments

Regarding the results obtained for ITEM 3, we have identifiled an "off marker" allele at Locus DYS481 as allele 35 with PP PROMEGA Y23 and YFILER PLUS Kits. Our Internal Method does not allow to attribute a specific call at an "out of bin" and/or "off marker" allele without direct sequencing step. Therefore we decide to not assign the call "35" at DYS481 Locus.

Valore vero stabilito con metodo del consenso tra almeno 10 laboratori

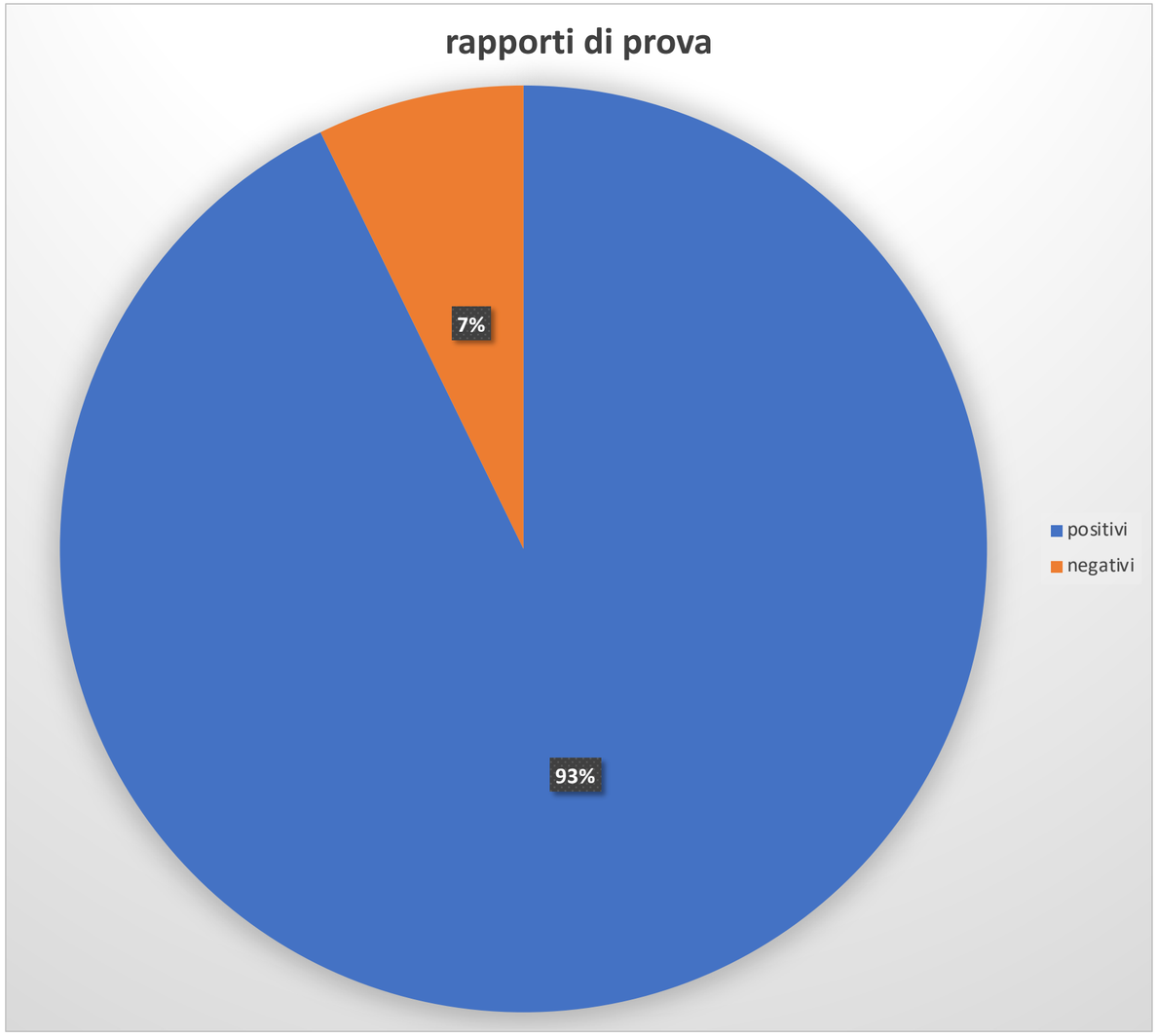
3

RISULTATI E PROSPETTIVE FUTURE



Risultati

Un po’ di numeri…



In caso di esito negativo:

-Ripetizione del Prelievo e annullamento del codice prelievo precedente e distruzioni dei campioni

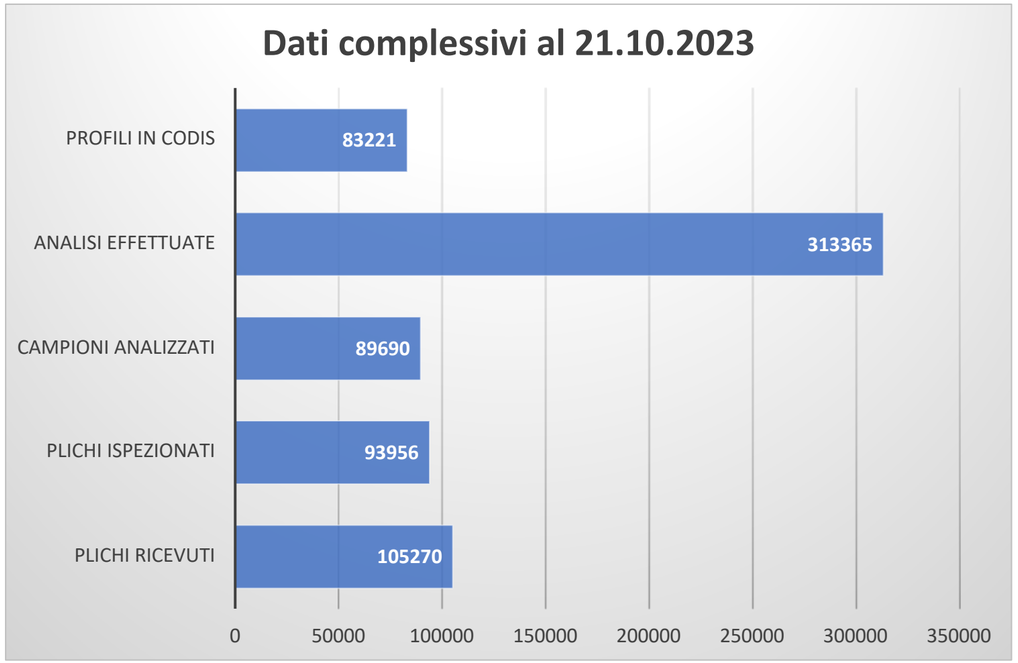
- Analisi della seconda card

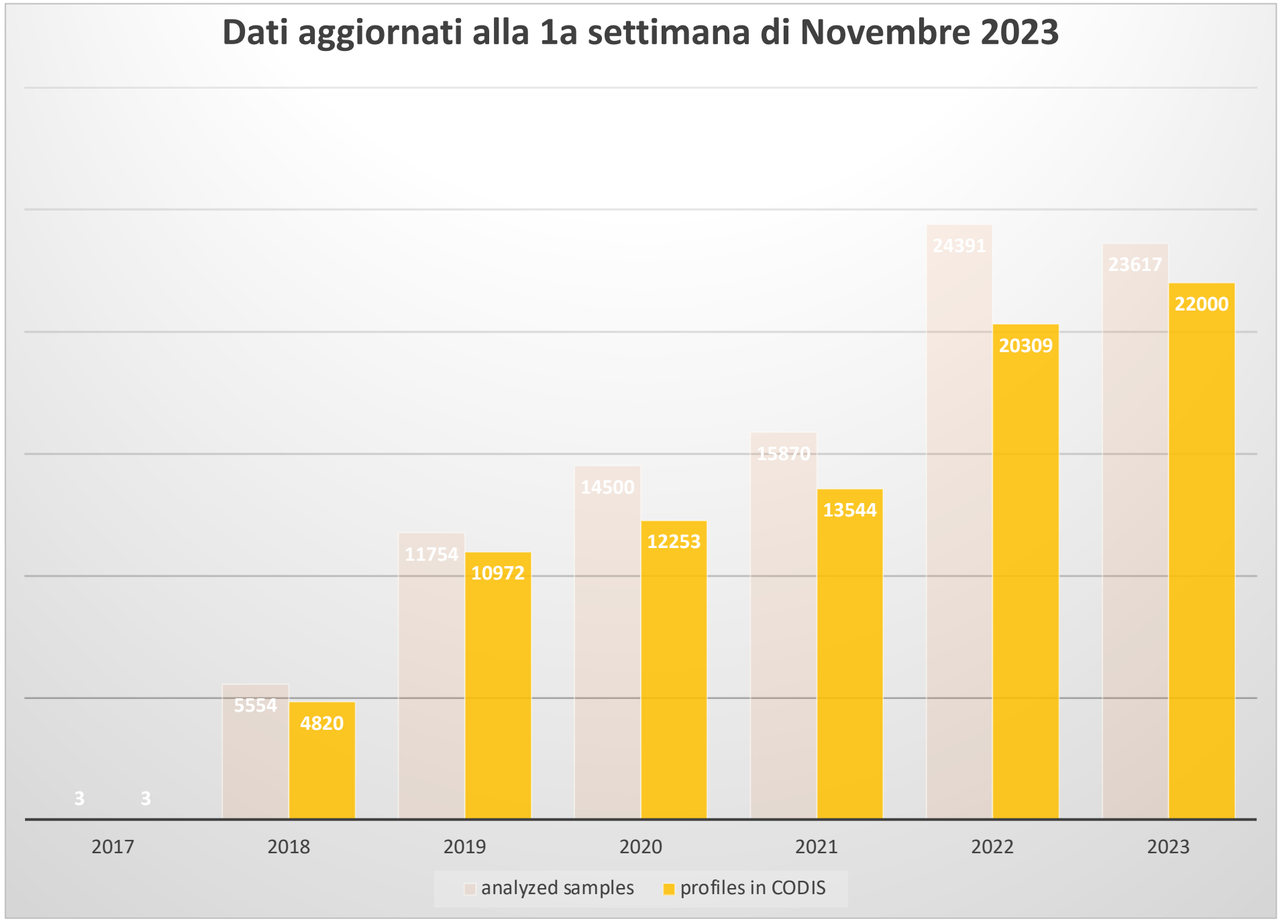
SECONDE CARD ANALIZZATE: 526 delle quali circa il 39,92% POSITIVE

PROCEDURE D’URGENZA circa 600 (Dal 2020 ad oggi)

Inserimenti in CODIS

ANDAMENTO ANNUO CRESCENTE DAL 2017

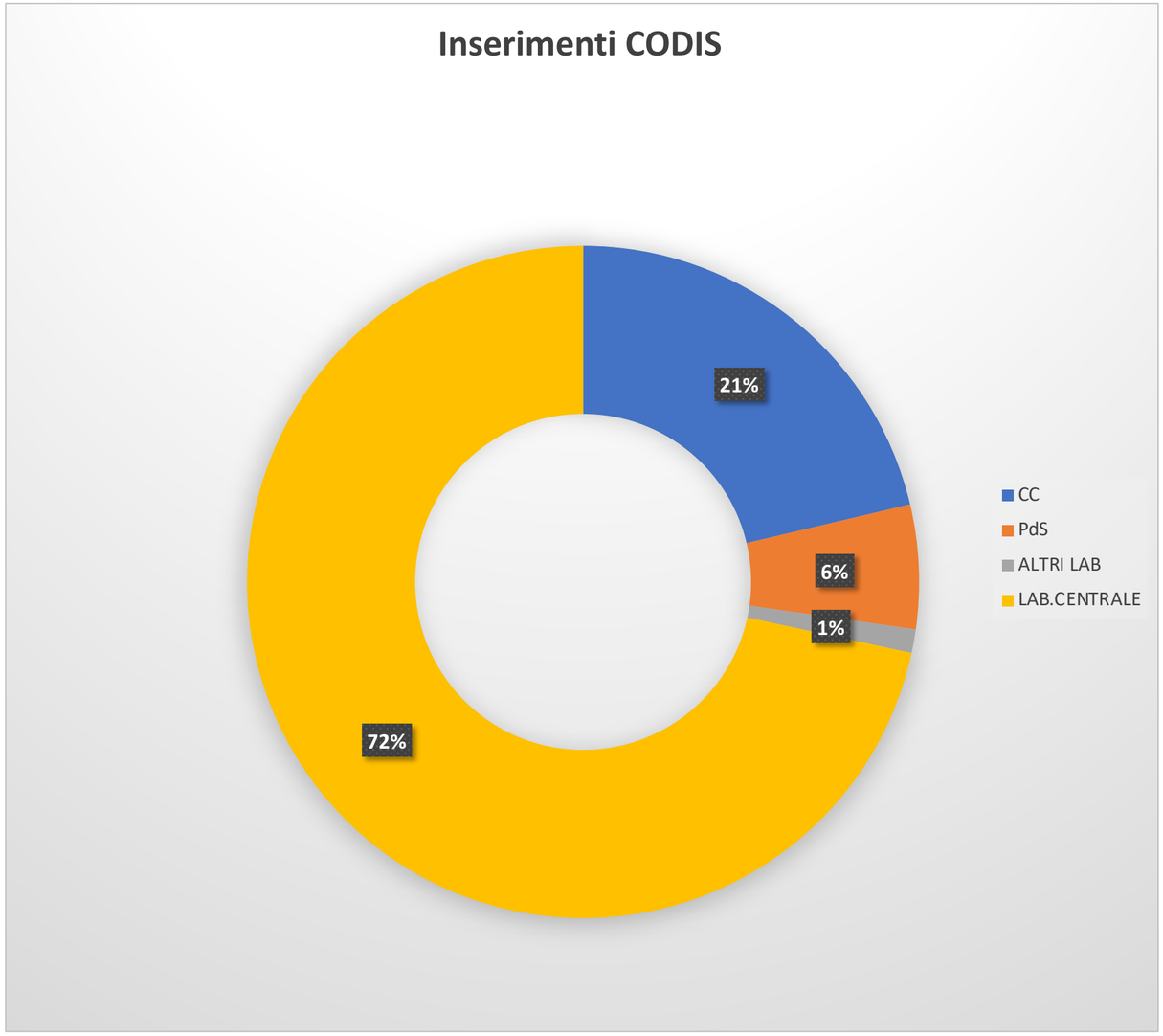




+35% inserimenti da 1 giugno 2023 rispetto anno precedente

BDNDNA

I numeri



Match

- Match nazionali: 3100
- Prum match: 1480
  - Prum DE: 1050
  - Prum AT: 430
- Interpol match: 60

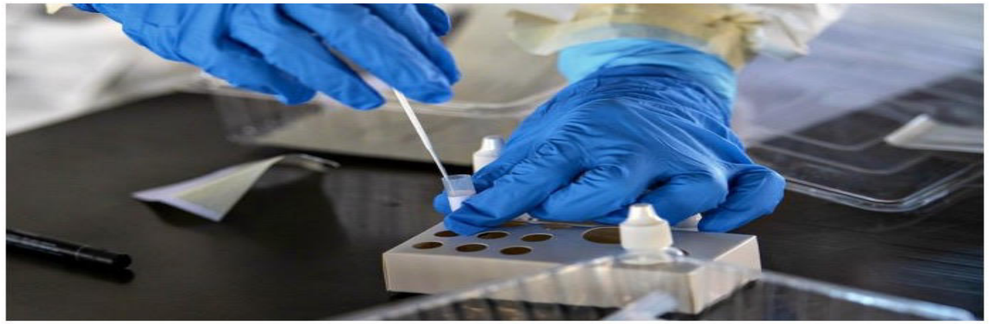
Dati stimati in base a registrazioni su LIMS interno

Dopo il Match…

MATCH: 43% furti, 23% rapine, il 10% omicidi dolosi, il 5% violenze sessuali e il 3% tentati omicidi

< GIUSTIZIA & IMPUNITÀ

Violentò una donna in strada a Milano, autore identificato dopo 14 anni grazie alla Banca dati del Dna



La violenza avvenne nel 2006 ai danni di una donna che stava andando al lavoro la mattina presto. I carabinieri hanno eseguito nei confronti dell'uomo l'ordinanza di custodia cautelare in carcere. Le accuse sono di violenza sessuale e rapina aggravata

di F. Q. | 16 GENNAIO 2021

Un *cold case* risolto a distanza **14 anni fa.** L'autore di una violenza sessuale avvenuta 14 anni fa a Milano è stato identificato grazie al Dna. Si tratta di un **uomo** di **49 anni**, cittadino algerino, in **carcere** dal **2017** per altri reati. La violenza avvenne nel **2006** ai danni di una donna che stava andando al lavoro la mattina presto. La **svolta**

SEZIONI | CERCA

il mattino di Padova

Home > Notizie > Elisea e Cristina, massacro risolto L'assassino è morto in carcere a Forlì

inserisci il termine che cerchi CERCA

precedente 3030 di 9724 successivo

Elisea e Cristina, massacro risolto L'assassino è morto in carcere a Forlì

Il Dna di Gaetano Tripodi sui vestiti che madre e figlia, trevigiane di Paese, indossavano il giorno della mattanza 22 anni fa

paese

Arriva da Roma la clamorosa svolta per l'omicidio di Elisea Marcon e la figlia adottiva Cristina De Carli. Il Dna di Gaetano Tripodi, morto nei giorni scorsi in carcere a Forlì dov'era condannato all'ergastolo per la decapitazione della moglie avvenuto nel 2006, è il medesimo trovato su vestiti di madre e figlia, di Paese, ammazzate nel giugno 1998 a Rosolina Mare. Un cold case rimasto irrisolto per anni, che a marzo dell'anno scorso era arrivato ad un apparente epilogo...

Backlog

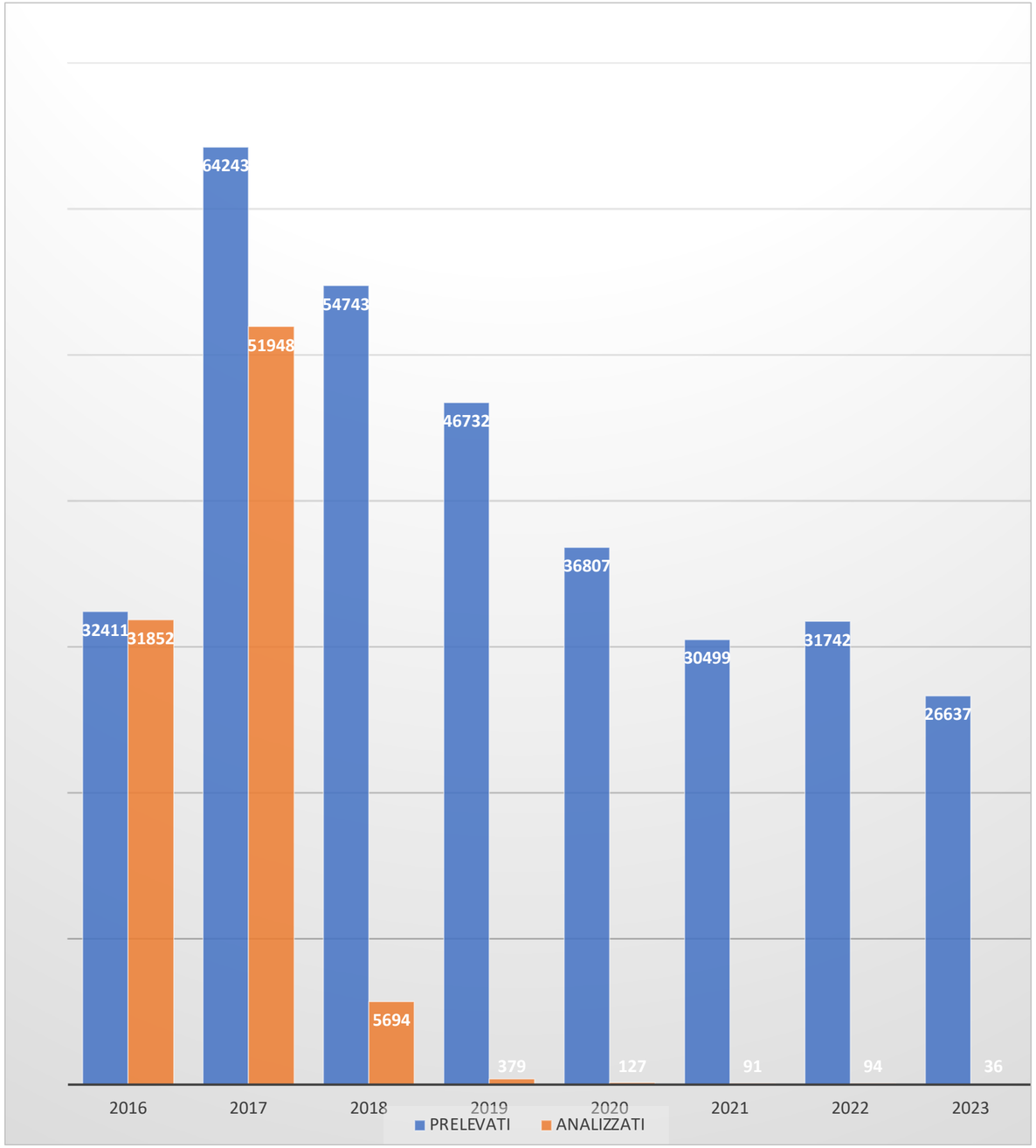
Prelievi annuali/analisi effettuate

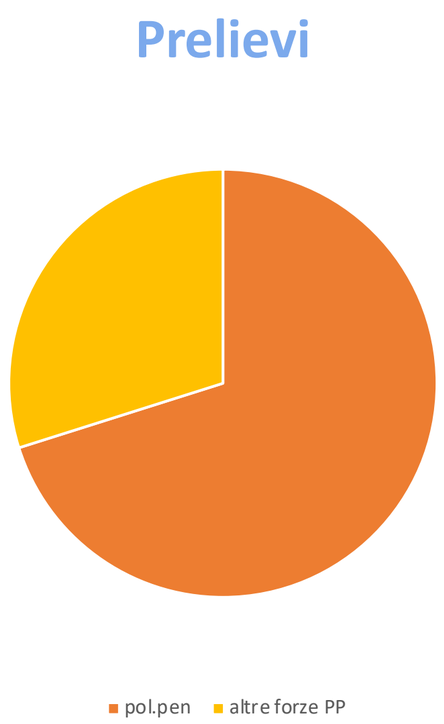
TOTALE CAMPIONI PRELEVATI: 323.814

TOTALE CAMPIONI ACCETTATI: 105.270

CAMPIONI ANALIZZATI: 89690

CAMPIONI DA ACCETTARE: circa 218.544





Strategie recupero backlog

Ricezione di tutti i campioni prelevati sul territorio

Aumento capacità stoccaggio biobanca

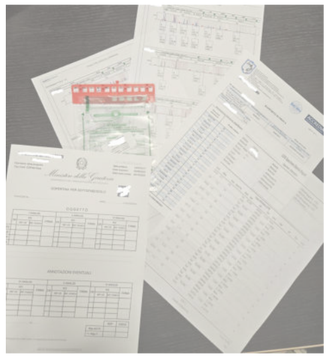
-Digitalizzazione del fascicolo da conservare secondo legge (DPR 87/2012016- DM 8 novembre 2016)

-Aumento spazio fisico di stoccaggio con costruzione nuova biobanca

STATO DELL'ARTE

3 biobanche con armadi intelligenti

Gli armadi cd. "intelligenti" con apertura magnetica mediante badge rilasciato agli operatori autorizzati; La movimentazione dall'armadio è tracciata con sistema RFID mediante software.



Strategie recupero backlog

Aumento processività analitica

Strategia 1: CAMBIO NORMATIVO

Previsione normativa attuale

DPR 87/2016 Art.22 commi 5 e 6:

5. L'amplificazione di ogni singolo campione biologico deve essere effettuata attraverso l'uso di due kit commerciali che hanno per il medesimo locus una diversa sequenza dei primers, al fine di evitare una non corretta assegnazione allelica.
6. I loci amplificati dai due kit commerciali si devono sovrapporre per almeno dieci loci.
7. L'amplificazione del DNA deve sempre essere allestita con il controllo positivo presente nel kit commerciale e con un controllo negativo.

Art. 23 comma 1 lett. e) ed f):
Lettura ed interpretazione del profilo di DNA
e) l'interpretazione del profilo del DNA deve essere effettuata da due persone distinte o dalla stessa persona in due momenti diversi;

Proposta interforze condivisa

DPR 87/2016 Art.22 commi 5 e 6:

5. L'amplificazione di ogni singolo campione biologico deve essere effettuata attraverso l'uso di UN kit commerciale.
6. Abrogato
7. L'amplificazione del DNA deve sempre essere allestita con il controllo positivo presente nel kit commerciale e con un controllo negativo.

Art. 23 comma 1 lett. e) ed f): Abrogato

Analisi di > 40.000 campioni/anno

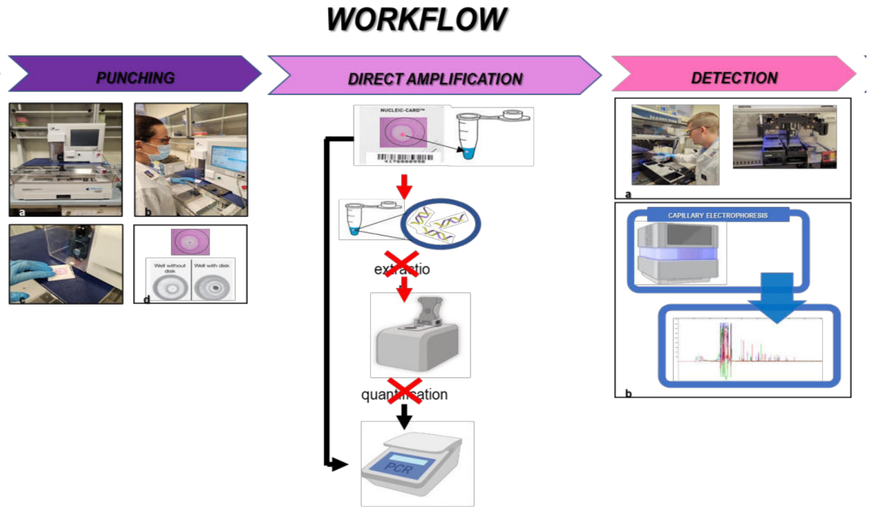
- limitare utilizzo dell'analisi Y su richiesta e per reati specifici (circa 2000/anno)
- digitalizzazione del processo analitico
- Recupero larga parte dei campioni negativi
- Aumento di personale di supporto alle attività analitiche

Strategie recupero backlog

Aumento processività analitica

Strategia 2: SENZA CAMBIO NORMATIVO

- **RADDOPPIO DEI FONDI PER ACQUISTO REAGENTI**
- Maggiore digitalizzazione e semplificazione dei processi
- AUMENTO DEL PERSONALE IN SERVIZIO (Ruolo ispettori Tecnici, funzionari tecnici e agente e assistenti per raddoppio attività tecnica)



- La spesa annua per l'acquisto unicamente dei kit di amplificazione per circa 25000 analisi è di circa **1.500.000 Euro.**
- ogni singolo campione per 4 chimiche: circa **60 euro a campione**

ESCLUSI:
- Costi di manutenzione e assistenza full risk di tutte le strumentazioni e i sistemi di monitoraggio (circa 700,000 euro di contratti di manutenzione)
- Costi di taratura/IPV
- Plasticheria
- Costi mantenimento infrastruttura informatica
- altro…

Analisi di 40.000 campioni/anno

Strategie recupero backlog

Aumento processività analitica

anno analisi	anno prelievo	tot prelevati		40000 campioni/anno						50000 campioni/anno					
	2017	2025	7505												
2024	2018	2026	54743	67038	27038					67038	17038				
2025	2019	2027	46732		73770	33770					63770	13770			
2026	2020	2028	36607			70377	30377					50377	377		
2027	2021	2029	30499				60876	20876					30876	-19124	
2028	2022	2030	31742					52618	12618					12618	-37382
2029	2023	2031	26637						39255						-10745
		ANNO DISTRUZIONE													

Prospettive future

-Implementazione di nuove chimiche e nuovi strumenti (esempio:Promega PowerPlex 35GY System e Spectrum) per aumentare la processività

- Riadattamento di strumentazione già in uso

-Formazione al personale che effettua il prelievo per miglioramento della qualità dello stesso

-Digitalizzazione e semplificazione del flusso analitico

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
Tradizione e cambiamento al centro del Mediterraneo

UniMe
1548

Ge.F.I.

29° CONVEGNO NAZIONALE
DEI GENETISTI FORENSI ITALIANI

9-11 novembre 2023
Aula Magna Università degli Studi di Messina

LA GENETICA FORENSE
AL SERVIZIO DELLA
PERSONA FRAGILE

I primi 10 anni di microaplotipi: overview delle applicazioni, metodologie analitiche ed interpretazione

Chiara Turchi

c.turchi@univpm.it

Dipartimento
di Scienze
Biomediche
e Sanità Pubblica
DISBSP

UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

Microaplotipi: primi studi pubblicati

European Journal of Human Genetics (2012) 20, 1148–1154
© 2012 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1018-4813/12
www.nature.com/ejhg

ARTICLE

Mini-haplotypes as lineage informative SNPs and ancestry inference SNPs

2012

Andrew J Pakstis[1], Rixun Fang[2], Manohar R Furtado[2], Judith R Kidd[1] and Kenneth K Kidd*,[1]

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4 (2013) e123–e124

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

2013

Microhaplotype loci are a powerful new type of forensic marker

K.K. Kidd [a,*], A.J. Pakstis [a], W.C. Speed [a], R. Lagace [b], J. Chang [b], S. Wootton [b], N. Ihuegbu [b]

[a] Genetics Department, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06520, USA
[b] Human Identification Group, Life Technologies, Foster City, CA 94404, USA

…in realtà i primi studi sugli aplotipi risalgono agli anni ’80-’90

Gerhard DS, Kidd KK, Kidd JR, Egeland JA, and Housman DE.**1984**. Identification of a recent recombination event within the human ß-globin gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Science* USA 81:7875-7879.

Murphy PD, Ferguson-Smith AC, Miki T, Feinberg AA, Ruddle FH, and Kidd KK. **1987**. A moderately frequent RFLP identified by both SacI and BanII with a probe from the HOX2 locus in man (17q11-17q22). *Nucleic Acids Research* 15:6311-6312.

Ruano, G. and Kidd KK. **1989**. Direct haplotyping of chromosomal segments from multiple heterozygotes via allele-specific PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 17:8392.

Hawley ME, and Kidd KK. **1995**. HAPLO: A program using the EM algorithm to estimate the frequencies of multi-site haplotypes. *Journal of Heredity* 86:409-411.

Yearly distribution of forensic papers about human MHs since the first in 2013

Source: PubMed

Microaplotipo…un nuovo tipo di marcatore genetico?

Microaplotipi

Kenneth K. Kidd, Professor Emeritus of Genetics, Yale School of Medicine

Kenneth K. Kidd propose un nuovo tipo di marcatore genetico con il nome di **microhaplotypes** (i.e., **microhaps** or **MHs**):

DEFINITION

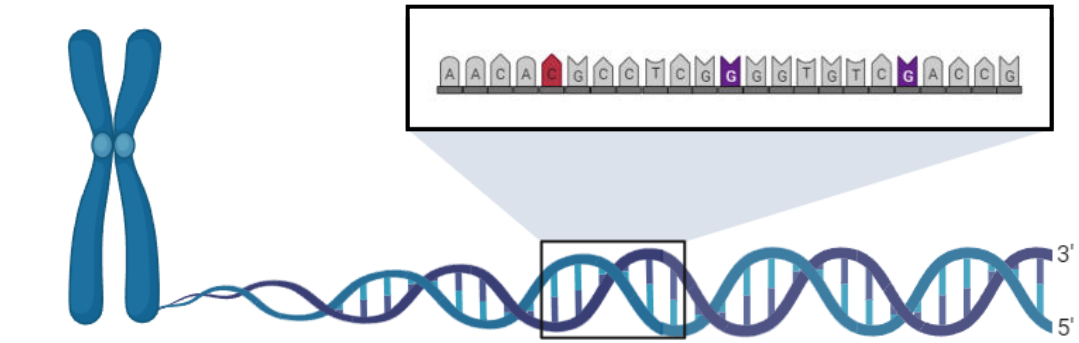
"A microhaplotype locus (or microhaps) is defined by at least two single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the length of a sequence read and the expectation of a very low recombination rate"

K.Kidd Forensic Sci. Int. Genet. 29 (2017) 29-37

micro

I **Microaplotipi** sono dei corti segmenti di DNA (< 300 nucleotidi) caratterizzati dalla presenza di due o più SNPs molto vicini e che presentano tre o più combinazioni alleliche.

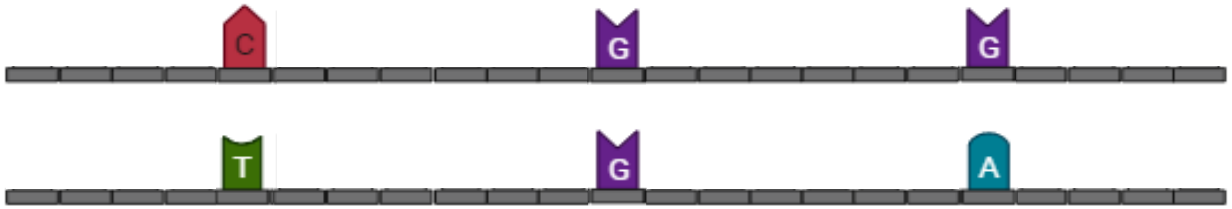
aplotipi



Cromosoma paterno

Cromosoma materno

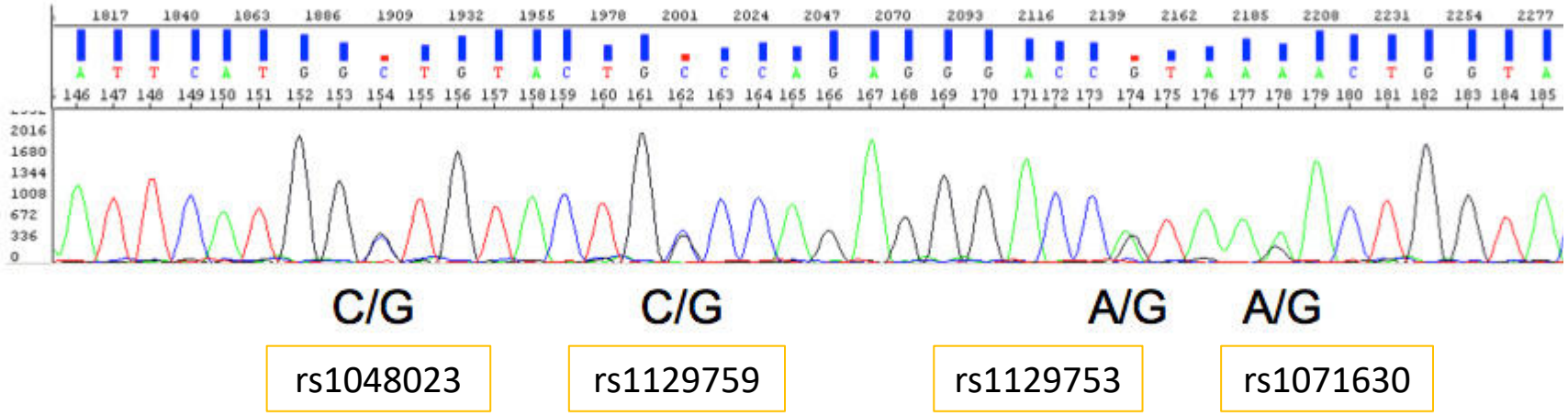
MICROAPLOTIPO



aplotipo paterno

aplotipo materno

4 diversi SNPs che mappano in piccolo segmento codificante del locus HLA-DQA1 sequenziato mediante Sanger:

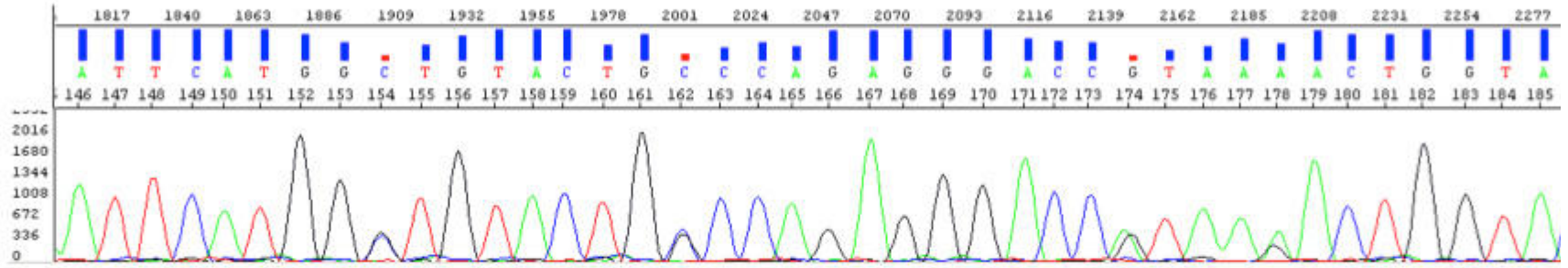


Qual è il genotipo di questo individuo?

Le combinazioni alleliche di 4 SNPs possono originare **16 diversi aplotipi** o alleli (N) ed un totale di (N*(N+1)/2 = **136 diversi genotipi**.
Otto di questi diversi genotipi sono eterozigoti in tutti e quattro i siti.

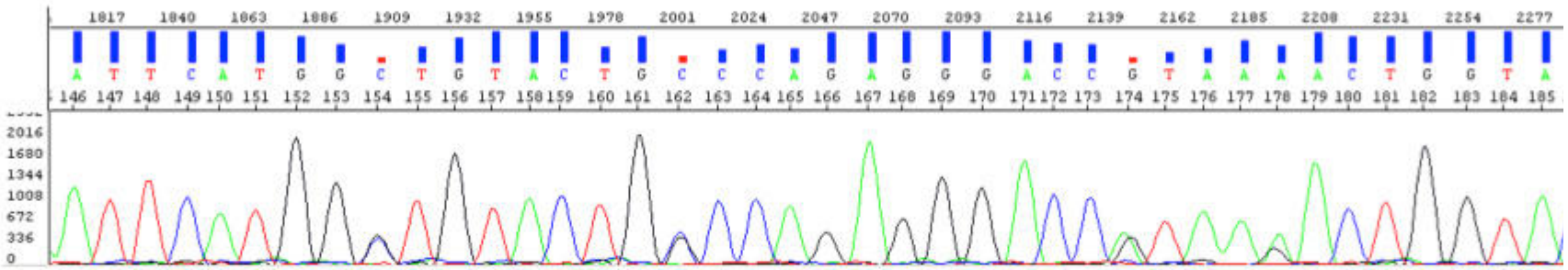
16 possibili alleli (aplotipi) per questi quattro siti SNPs

- CCAA
- CCAG
- CGAA
- CGAG
- GCAA
- GCAG
- GGAA
- GGAG



Quattro genotipi presentano lo stesso fenotipo precedentemente osservato: eterozigosi a tutti i siti

Il sequenziamento di Sanger non ha la capacità di determinare la relazione *cis/trans* tra i singoli SNPs (i.e., la fase) nel caso in cui due o più siti siano eterozigoti



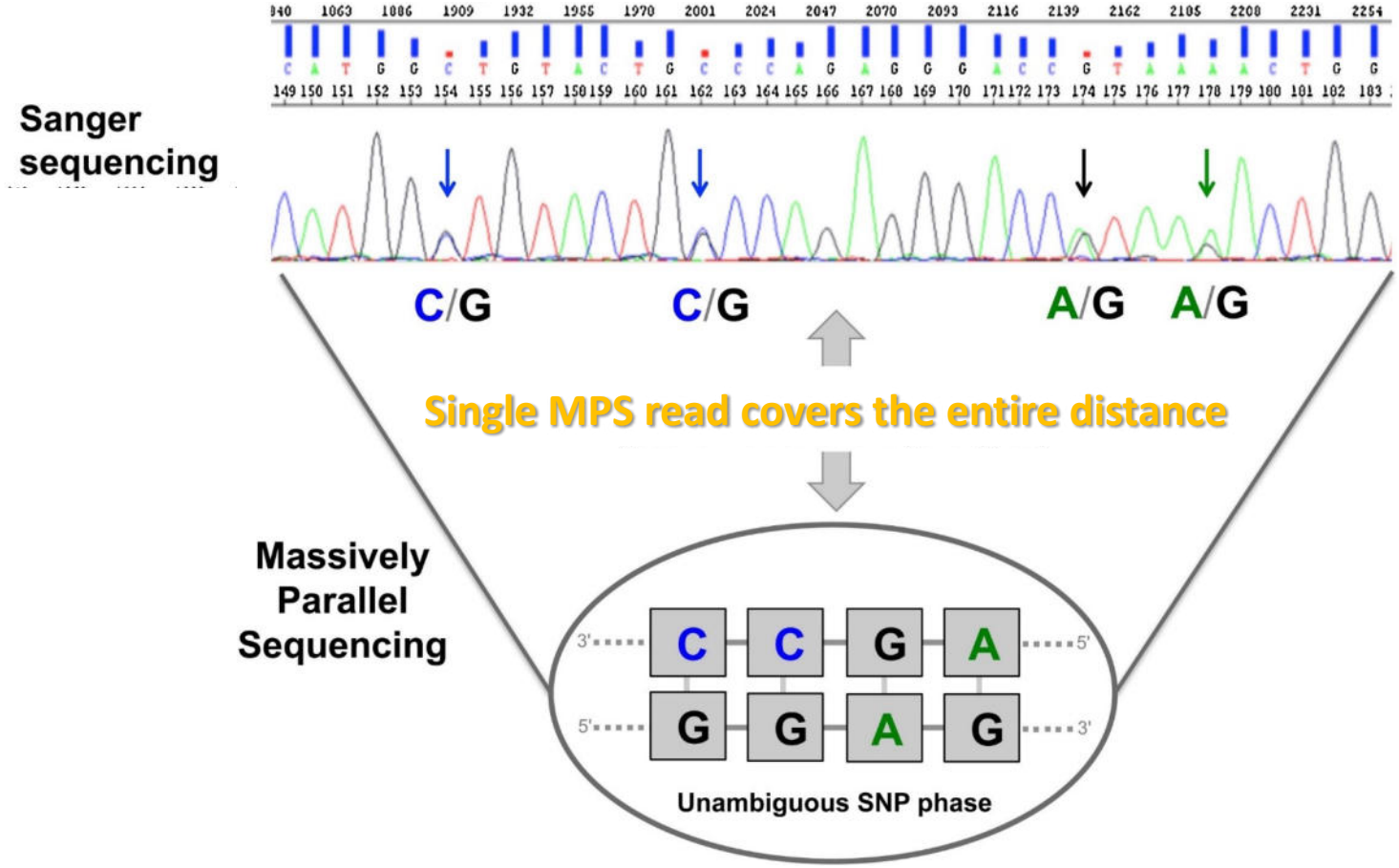
Qual è il genotipo di questo individuo?

Impossibile distinguere l'aplotipo materno da quello di derivazione paterna

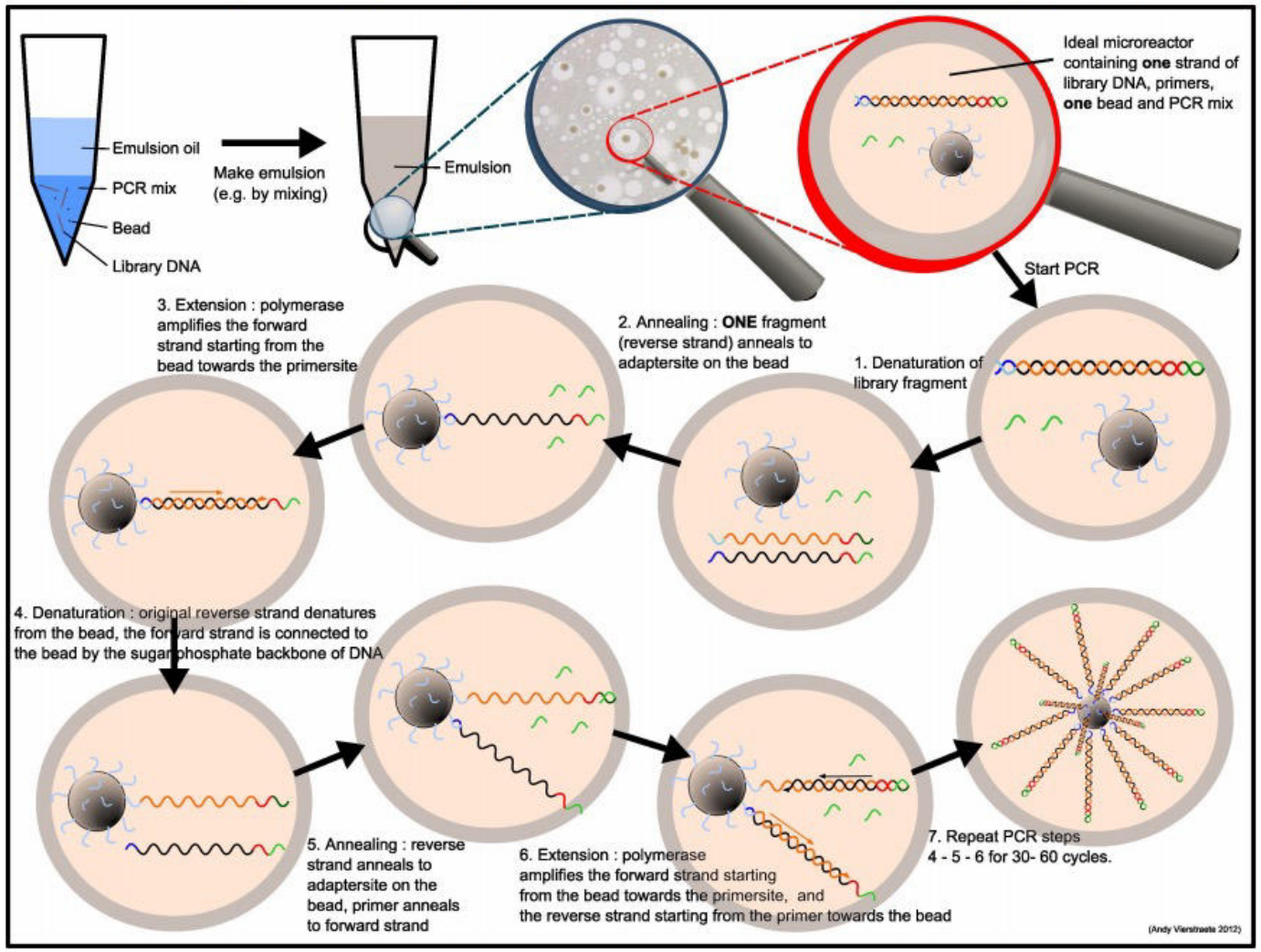
Il problema può essere superato grazie alla tecnologia Massive Parallel Sequencing …

Dal sequenziamento di Sanger al Massively Parallel Sequencing

Una singola MPS *read* può coprire interamente la breve distanza che intercorre tra i singoli SNPs, con la conseguente risoluzione delle fasi, separando cioè il cromosoma materno da quello paterno.



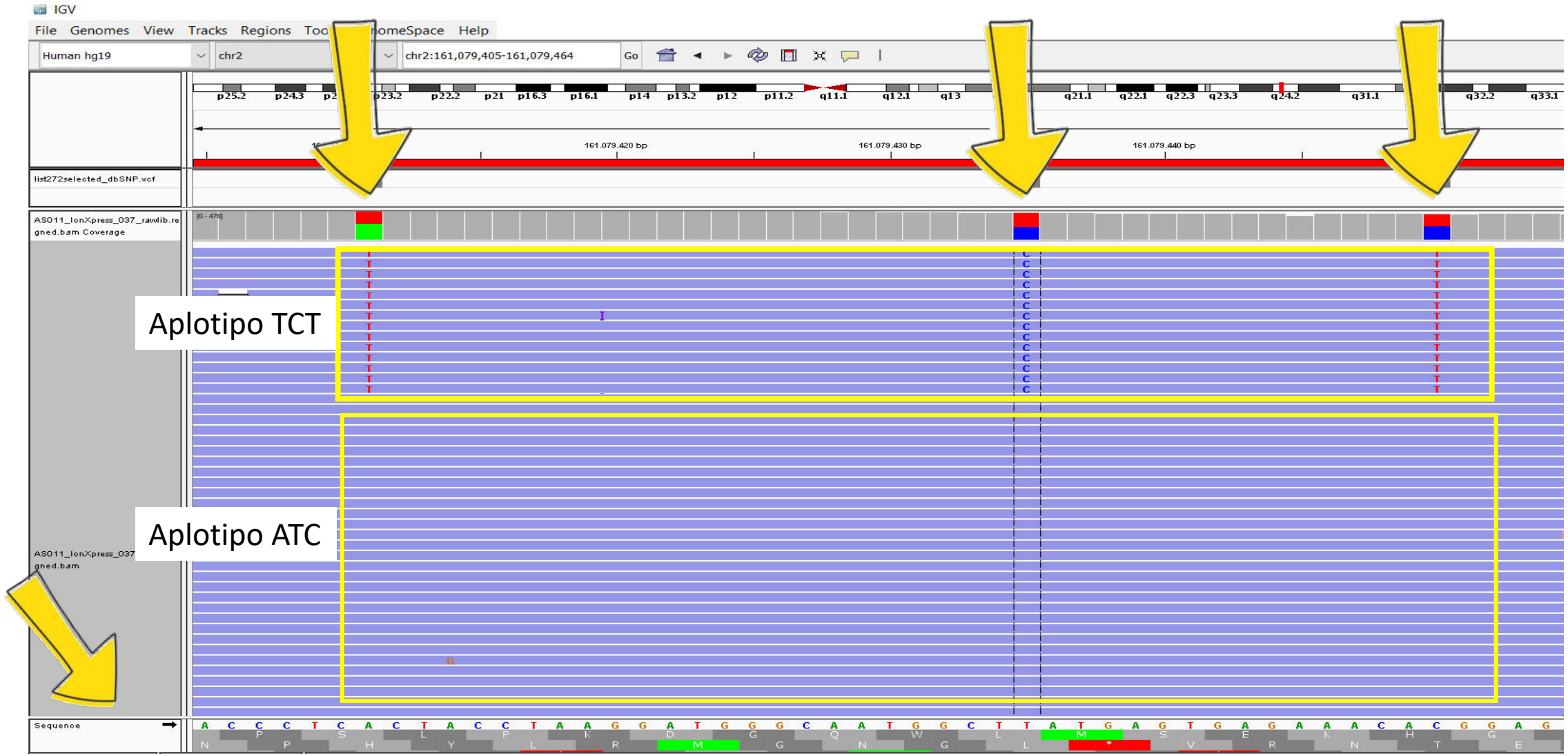
Dal sequenziamento di Sanger al Massively Parallel Sequencing



Emusion PCR

Grazie all'**MPS** è possible distinguere ciascun microaplotipo parentale mediante il **sequenziamento clonale di ogni singolo amplicone** proveniente da ciascun DNA strand presente nel campione.

MPS è l'unica metodologia che è in grado di risolvere le fasi



Analisi bioinformatica di MPS data

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5 (2015) e622–e624

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

FLfinder: A novel software for the microhaplotype marker

Jing Zhu[a], Nan Zhou[c,d], Youjing Jiang[a], Li Wang[a], Wang He[a], Duo Peng[a], Qin Su[a], Jiong Mao[b], Dan Chen[b], Weibo Liang[a,*], Lin Zhang[a,*]

Turchi et al. 2019

Sequenziamento

TSS

Ref TAGGGCCTCAGAT

Reads TAGGGCCTCAGAT
TAGGGCCTCAGAT
TAGGGCCTCGGAT
TAGGGCCTCGGAT

BAM

Chiamata delle varianti

SAMtools

TAGGGCCTCAGAT

TAGGGCCTTAGAT
TAGGACCTCAGAT

Gatk

GCCTT
ACCTC

Chiamata aplotipo MH

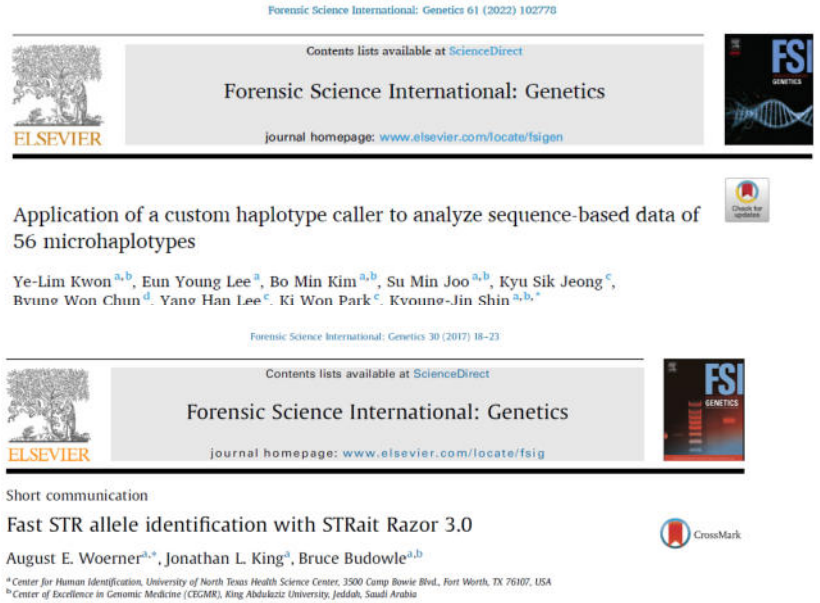
Excel

IGV software

Controllo varianti ambigue

Analisi dei dati

Analisi bioinformatica di MPS data



Forensic Science International: Genetics 61 (2022) 102778

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Application of a custom haplotype caller to analyze sequence-based data of 56 microhaplotypes

Ye-Lim Kwon [a,b], Eun Young Lee [a], Bo Min Kim [a,b], Su Min Joo [a,b], Kyu Sik Jeong [c], Byung Won Chun [d], Yang Han Lee [e], Ki Won Park [c], Kyoung-Jin Shin [a,b,*]

Forensic Science International: Genetics 30 (2017) 18–23

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

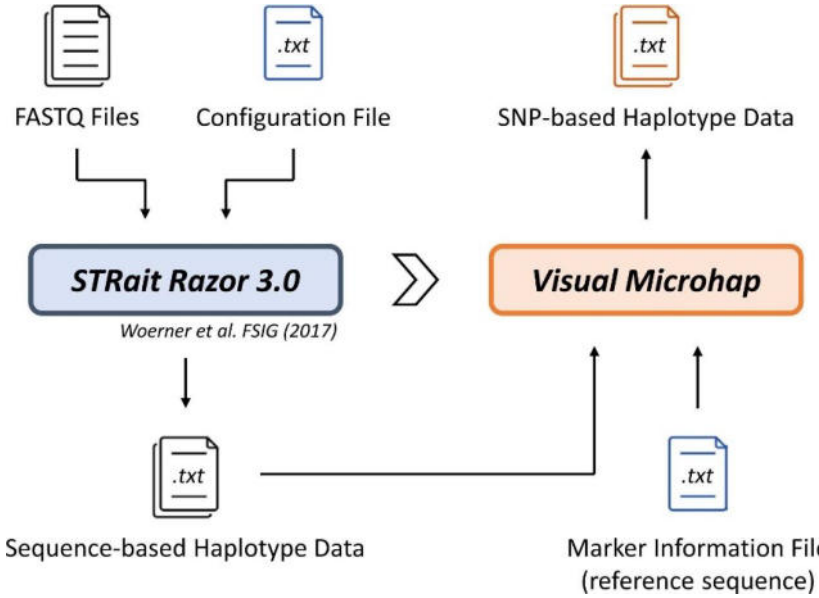
journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsig

Short communication

Fast STR allele identification with STRait Razor 3.0

August E. Woerner[a,*], Jonathan L. King[a], Bruce Budowle[a,b]

[a] Center for Human Identification, University of North Texas Health Science Center, 3500 Camp Bowie Blvd., Fort Worth, TX 76107, USA
[b] Center of Excellence in Genomic Medicine (CEGMR), King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia



ThermoFisher SCIENTIFIC

HID_Microhaplotype_Research_PluginV1.5

Ion Torrent
Torrent suite software

converge

MicroHapulator

Illumina data

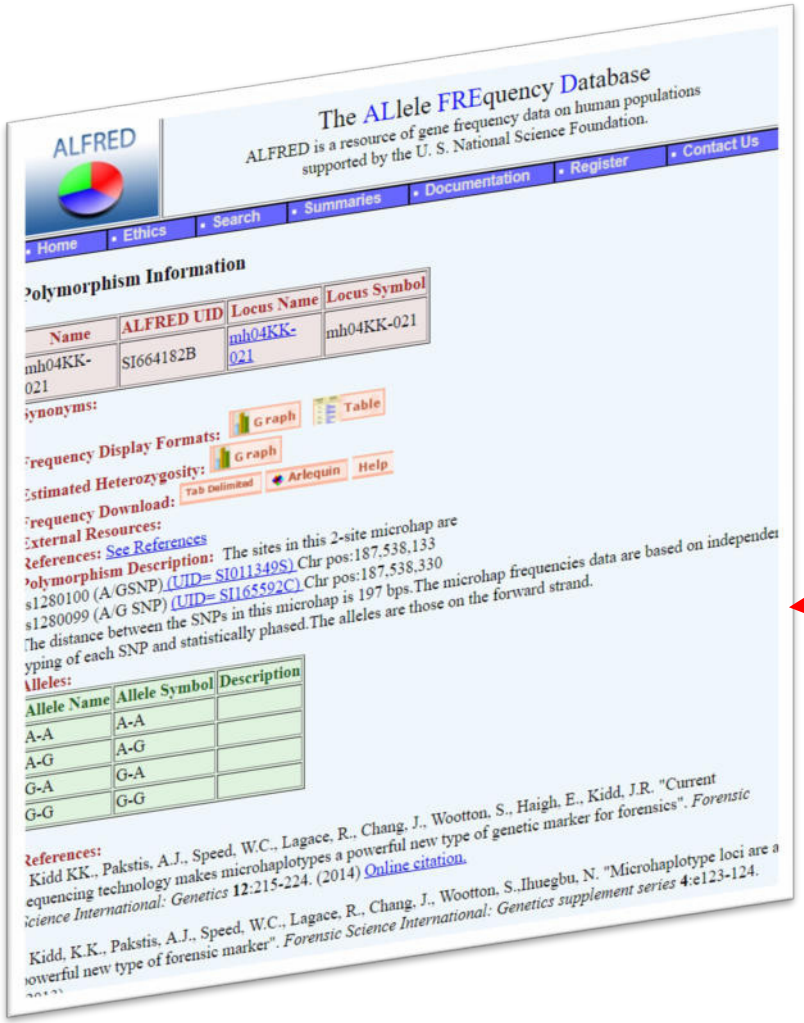
https://github.com/bioforensics/MicroHapulator

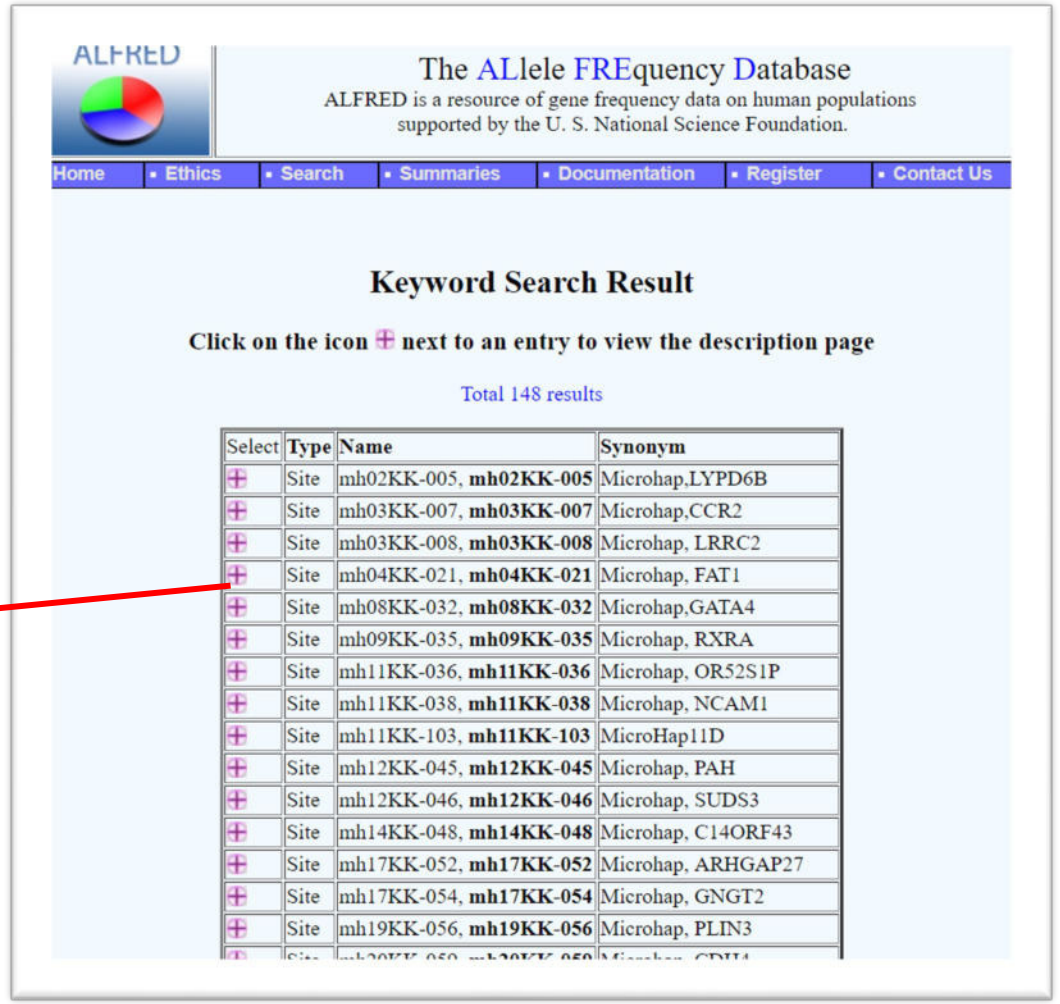
https://microhapulator.readthedocs.io

```
$ conda install microhapulator
```

ALFRED: a repository of global allele frequency data

ALFRED (**ALlele FREquency Database**), https://alfred.med.yale.edu/, represents an extensively used domain designed for both research and education in different areas of human genetic diversity and molecular anthropology.





MicroHapDB

Un database completo di microaplotipi pubblicati e relativi dati di frequenza. Strumento che contiene molte informazioni utili per implementare lo sviluppo e l'utilizzo dei microaplotipi in genetica forense.

Where to find MicroHapDB

https://github.com/bioforensics/MicroHapDB
(Raw data tables & software source code)

https://microhapdb.readthedocs.io
(User documentation)

```
$ conda install microhapdb
```
(Local data & software installation)

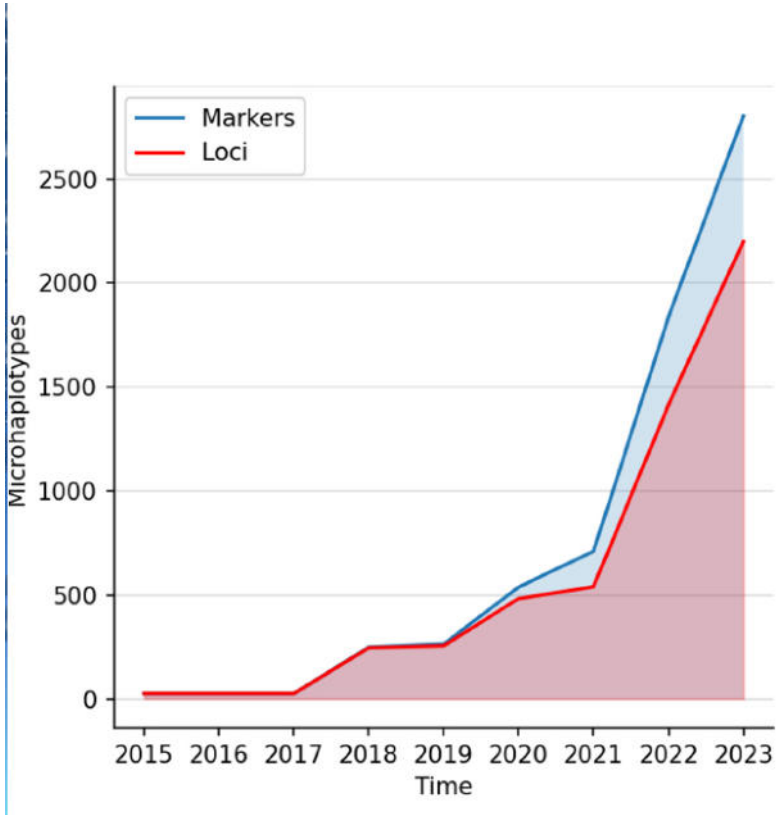
frontiers in Genetics

METHODS
published: 07 August 2020
doi: 10.3389/fgene.2020.00781

MicroHapDB: A Portable and Extensible Database of All Published Microhaplotype Marker and Frequency Data

Daniel S. Standage and Rebecca N. Mitchell*

National Bioforensic Analysis Center, National Biodefense Analysis and Countermeasures Center (NBACC), Frederick, MD, United States



MicroHapDB: diverse opzioni di ricerca

- ✓ microhapdb population
- ✓ microhapdb marker
- ✓ microhapdb frequency
- ✓ microhapdb lookup

Command line interface

MicroHapDB provides a simple and self-documenting `microhapdb` command in the terminal, a user can spe quency data, and format this data in a variety of ways.

- `microhapdb population` for retrieving information o data
- `microhapdb marker` for retrieving marker informatior
- `microhapdb frequency` for retrieving microhap popul
- `microhapdb lookup` for retrieving individual records

Reference documentation for these commands, inclu base queries, is available here. Alternatively, executi `microhapdb marker --help`) will print the same documenta

```
$ microhapdb marker --format=detail mh04CP-002
-------------------------------------------------------------[ MicroHapDB ]----
mh04CP-002    a.k.a MHDBM-342c1521, SI664878N

Marker Definition (GRCh38)
    Marker extent
        - chr4:24304952-24304972 (20 bp)
    Target amplicon
        - chr4:24304922-24305002 (80 bp)
    Constituent variants
        - chromosome offsets: 24304952,24304955,24304971
        - marker offsets: 0,3,19
        - amplicon offsets: 30,33,49
        - cross-references: rs35619595,rs34017818,rs6814654
    Observed haplotypes
        - C,A,A
        - C,A,T
        - C,G,A
        - C,G,T
        - G,A,A


--[ Core Marker Sequence ]--
>mh04CP-002
CGCGCCAGGTATGAAGTTAT


--[ Target Amplicon Sequence with Haplotypes ]--
                              *  *                 *
ATTGCTAAGCATCTACTATGTGGCAAACCCCGCGCCAGGTATGAAGTTATTATGGCTGAAGATGGATAAGTCAGACAAAG
.............................C..A.............A.............................
.............................C..A.............T.............................
.............................C..G.............A.............................
.............................C..G.............T.............................
.............................G..A.............A.............................
-------------------------------------------------------------------------------
```

07-03)

Nomenclatura

Kidd *Human Genomics* (2016) 10:16
DOI 10.1186/s40246-016-0078-y

Human Genomics

OPINION ARTICLE Open Access

Proposed nomenclature for microhaplotypes

Kenneth K. Kidd

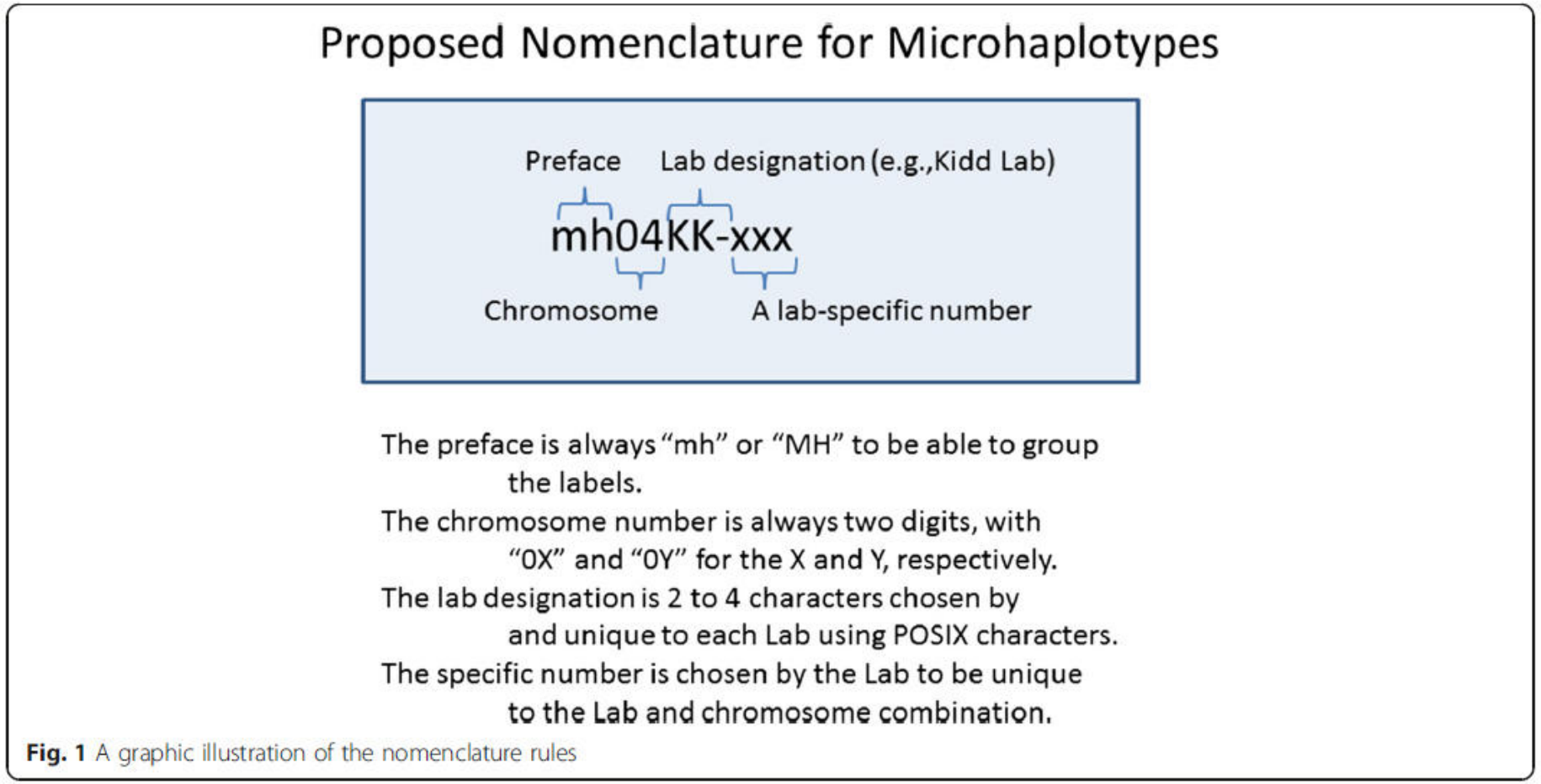
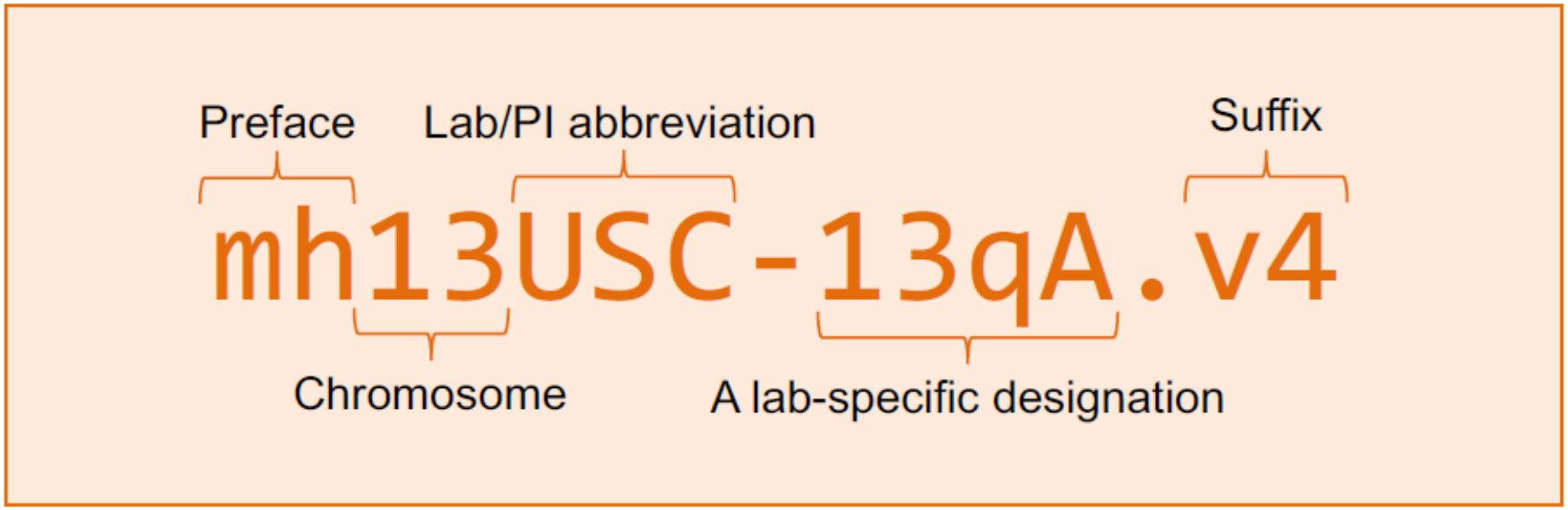


Fig. 1 A graphic illustration of the nomenclature rules

Nomenclatura proposta nel database MicroHapDB



Standage D. *et al*, *in preparation*

Caratteristiche dei microaplotipi

I microaplotipi sono **marcatori multiallelici** distribuiti in tutto il genoma umano e mostrano **diversi vantaggi rispetto ai classici STRs**:

- ✓ single-copy DNA
- ✓ tutti gli alleli ad un determinate locus hanno la stessa ampiezza
- ✓ non mostrano amplificazione preferenziale di specifici alleli ad un locus
- ✓ non generano stutter
- ✓ basso tasso di mutazione (circa 5-6 volte inferiore rispetto agli STRs)
- ✓ ampliconi corti

Mostrano, ovviamente, anche alcuni **svantaggi**:

- ✓ Presentano, generalmente, un numero minore di alleli per locus
- ✓ Per eguagliare il potere discriminativo dei pannelli STRs potrebbero essere necessari molti marcatori MHs
- ✓ Le frequenze variano significativamente tra le popolazioni
- ✓ Il workflow MPS è più laborioso e dispendioso

APPLICAZIONI DEI MICROAPLOTIPI IN GENETICA FORENSE

Identificazione umana

Analisi di relazioni parentali

Predizione origine biogeografica

Analisi delle tracce miste

DNA degradato

I microaplotipi sono potenzialmente migliori degli STRs in tutte queste applicazioni!!!

Criteri per la selezione dei microaplotipi

Per la selezione dei loci ottimali, devono essere considerati due parametri fondamentali: effective number of alleles (A_e) and informativeness (I_n)

A_e : effective number of alleles, $A_e = \frac{1}{\sum_i p_i^2}$

p = frequenza allelica

«A_e is described as the corresponding number of evenly frequent neutral alleles, based on population dynamics, that would produce the same heterozygosity as the locus with several alleles at different frequencies".

A_e si riferisce al livello di variabilità del marcatore entro una specifica popolazione ed il suo valore è associato con l'abilità del marcatore di distinguere un individuo da un altro (i.e. the random match probability or RMP)

Identificazione umana

Analisi delle tracce miste

Analisi di relazioni parentali

A_e : effective number of alleles, $A_e = \frac{1}{\sum_i p_i^2}$

Il calcolo di Ae consente la classificazione dei loci in base alle loro probabilità di rilevare una traccia mista o alla loro informatività nell'identificazione individuale

Microhaps	SNP per MH	Allele No	Ae	Major.Allele.Frequency	Genotype No	Het	Matching Probability (PI)
mh10KK-163	5	11	5,801	0,2121	27	0,8384	0,062
mh16KK-049	5	7	5,647	0,2600	20	0,8600	0,065
mh04KK-013	5	6	4,723	0,3100	20	0,7900	0,087
mh19KK-299	5	6	4,116	0,3441	17	0,6882	0,094
mh09KK-157	5	5	4,004	0,3535	14	0,7778	0,114
mh13KK-218	4	14	8,344	0,2300	48	0,8400	0,032
mh02KK-134	4	12	6,818	0,2071	34	0,8384	0,045
mh21KK-320	4	7	5,973	0,2500	26	0,8367	0,053
mh21KK-324	4	12	5,949	0,2450	32	0,8200	0,056
mh22KK-303	4	3	2,019	0,5100	4	0,5200	0,376
mh16KK-302	4	5	1,921	0,7050	11	0,4300	0,318

Turchi C. *et al* 2019

Criteri per la selezione dei microaplotipi

Per la selezione dei loci ottimali, devono essere considerati due parametri fondamentali: effective number of alleles (A_e) and informativeness (I_n)

I_n: informativeness for population differences, based on variances

Questo parametro, nota anche come misura di informatività di Rosenberg, fornisce un **indicatore della variazione delle frequenze alleliche** (aplotipiche) osservate **tra le diverse popolazioni** testate.

Elevati valori di I_n indicano che un locus ha alleli frequenti in certe popolazioni e rari in altre

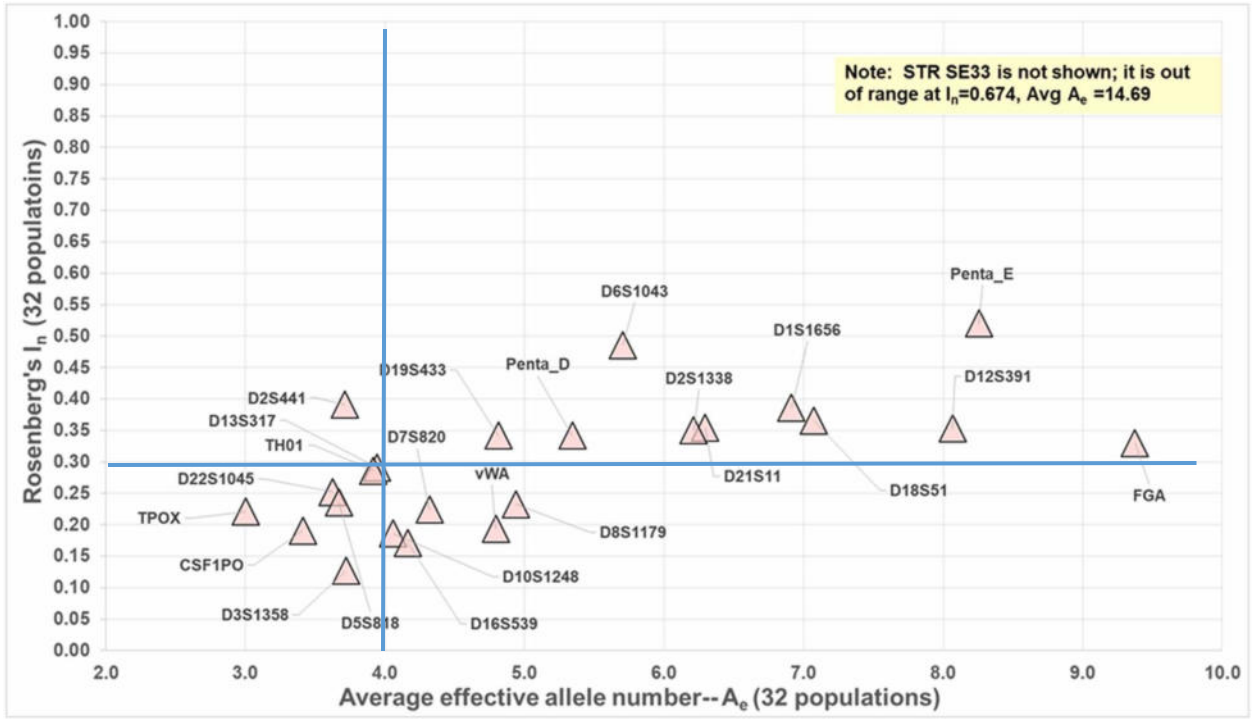
Predizione origine biogeografica

Criteri per la selezione dei microaplotipi

Il **locus ideale** dovrebbe mostrare **elevati valori sia di A_e che di I_n,** vale a dire che ogni popolazione presenterà molti alleli e alcuni/ la maggior parte/ tutti varieranno in frequenza nelle diverse popolazioni.

A_e vs I_n

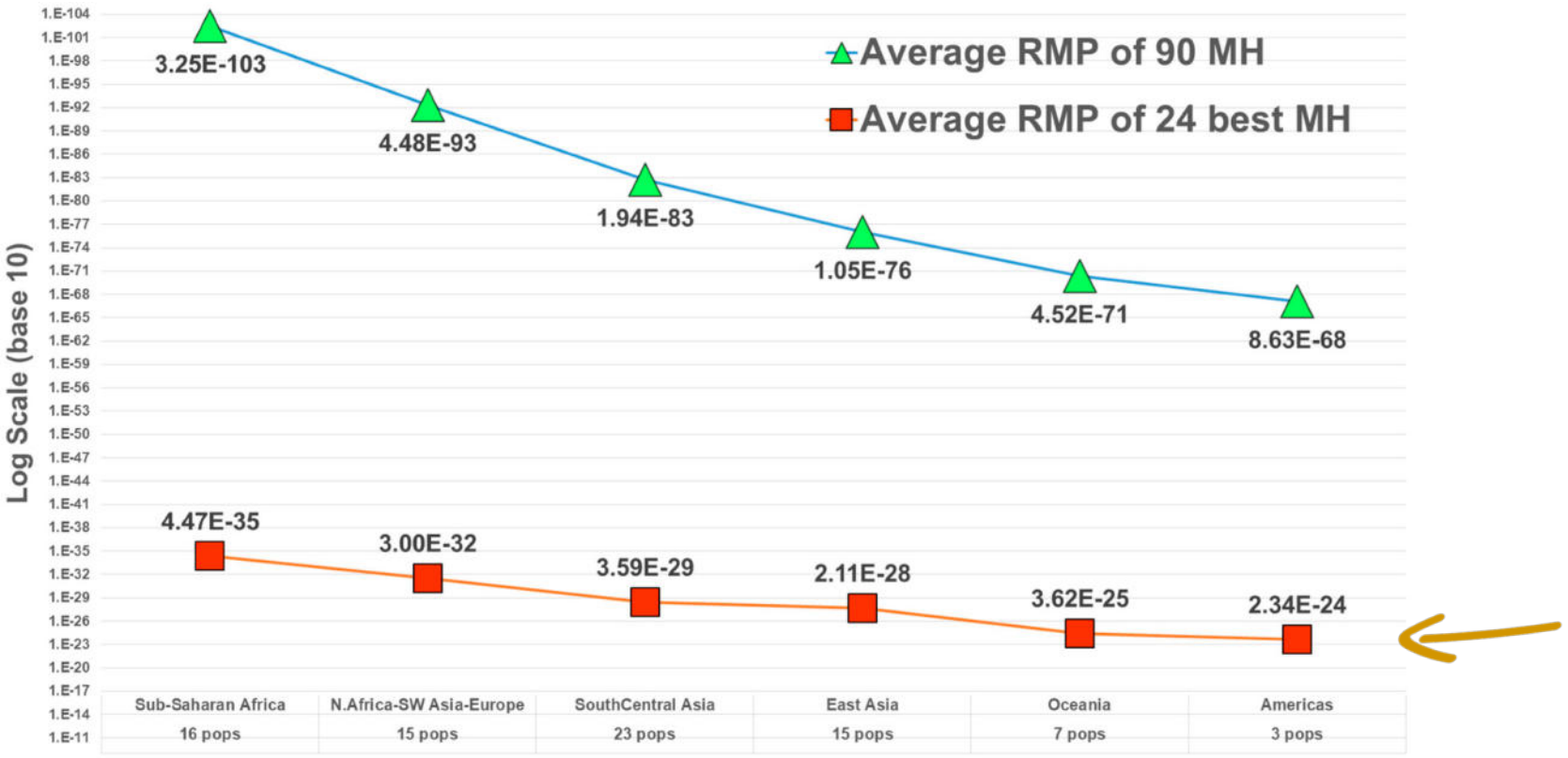
24 loci STRs (20 CODIS + 4 loci)



24 microaplotipi

Kidd K. *et al* FSI: Genetics 60 (2022)

Identificazione individuale



Valori simili a RMP dei 24 STRs

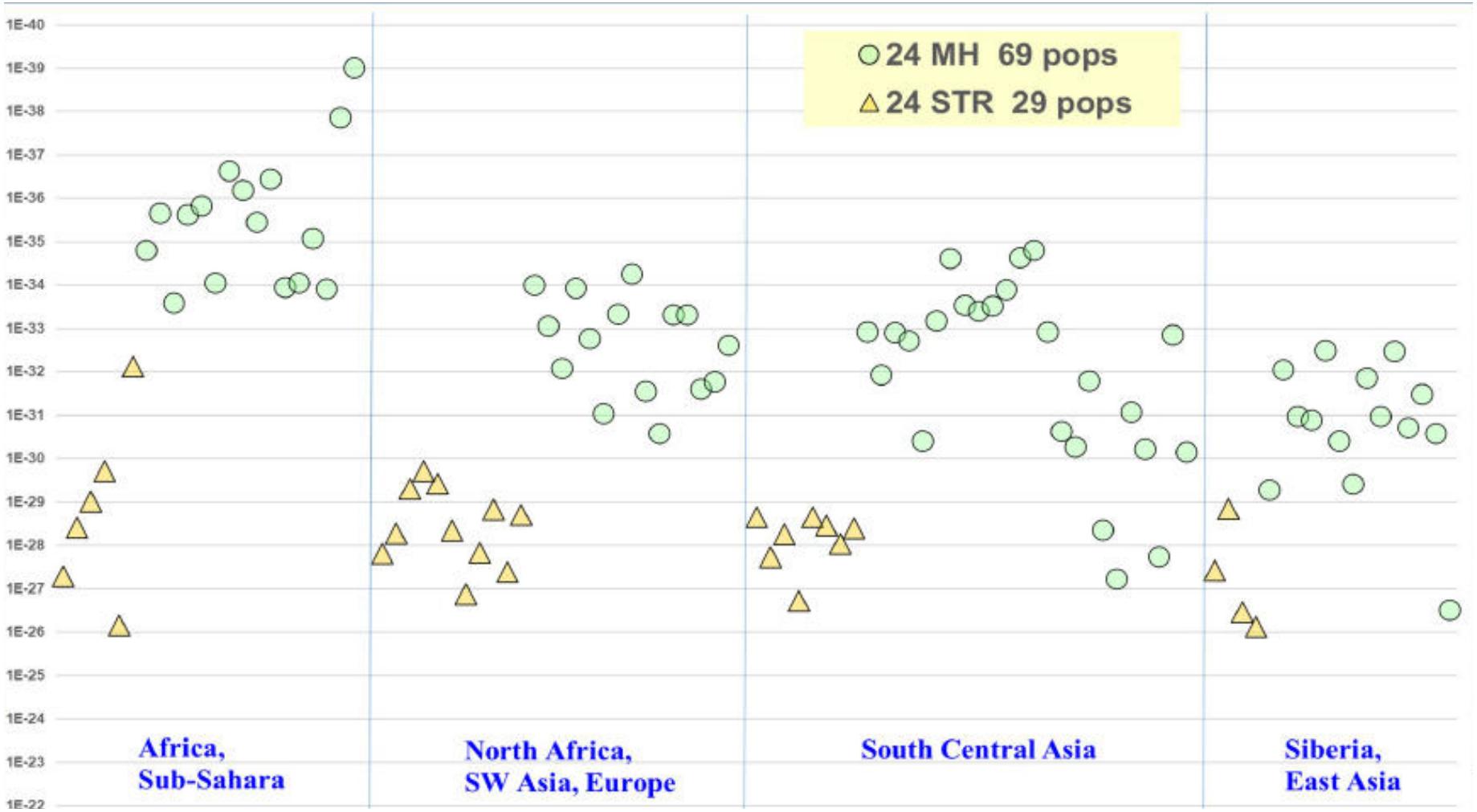
MHs che mappano sullo stesso cromosoma devono essere abbastanza distanti in modo che non vi sia LD.
1 o 10 Mb

L'individuazione di MH con valori di Ae sempre più elevati, consente di ottenere valori di RMP più piccoli anche con un numero inferiore di loci MH.

Kidd K. *et al* Genes (2022)

Identificazione individuale

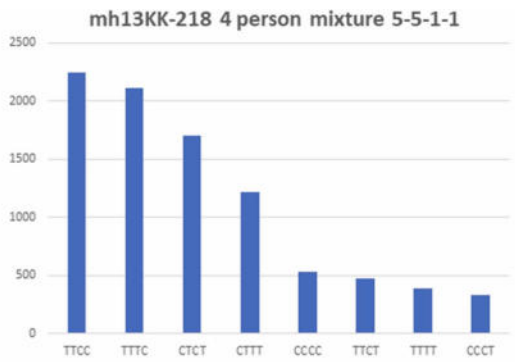
Random Match Probability per regione geografica

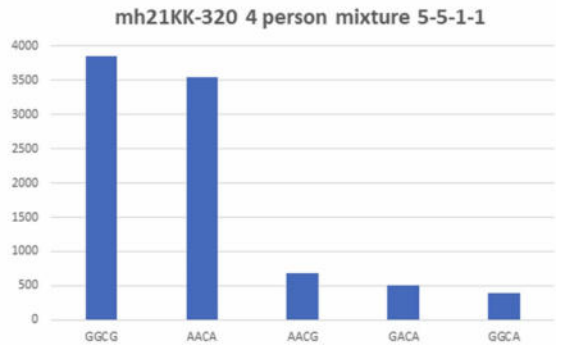


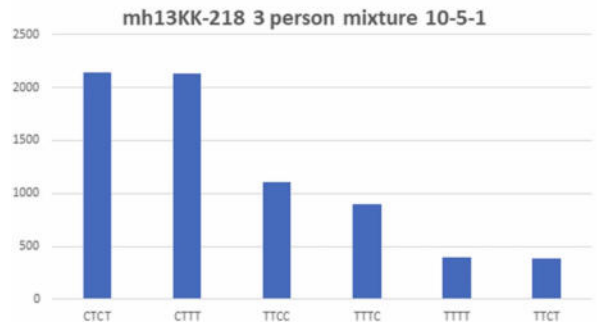
Analisi e deconvoluzione delle tracce miste

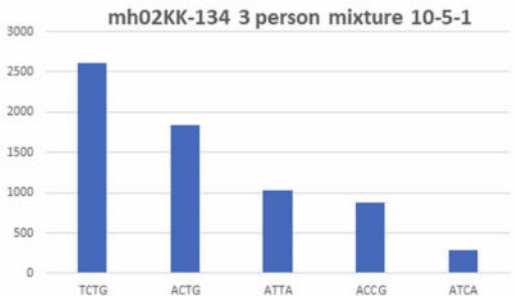
Vantaggi dell'analisi dei microhaps nelle tracce miste rispetto agli STR :

- ✓ assenza di stutter
- ✓ effetti stocastici ridotti, e.g. l'eliminazione dell'amplificazione preferenziale degli alleli più corti
- ✓ i microaplotipi possono presentare un grado di polimorfismo confrontabile, se non più elevato, degli STR









Kidd K. *et al* FSI: Genetics 60 (2022)

Analisi e deconvoluzione delle tracce miste

MPS

Ion Torrent S5™

74 loci

Microhaplotype Panel
(in collaboration with Thermo Fisher Scientific)

35 loci

Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2
(Thermo Fisher Scientific)

CE

ABI 3500

24 loci

AmpFlSTR™ Globalfiler PCR Kit
(Thermo Fisher Scientific)

Probabilistc Genotyping
Continuous:
DNA·VIEW©, EuroForMix

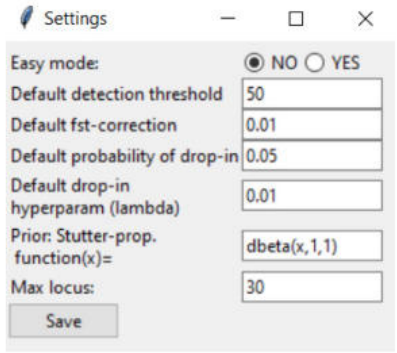
Oldoni F. et al, FSI:Genet 49 (2020)

Credits: D. Podini

Analisi e deconvoluzione delle tracce miste

EuroForMix

- All mixtures were run on EuroForMix v 3.3.0



2-person

Hp	Hd
A+U	U+U
B+U	U+U
A+B	A+U
A+B	B+U
A+B	U+U

3-person

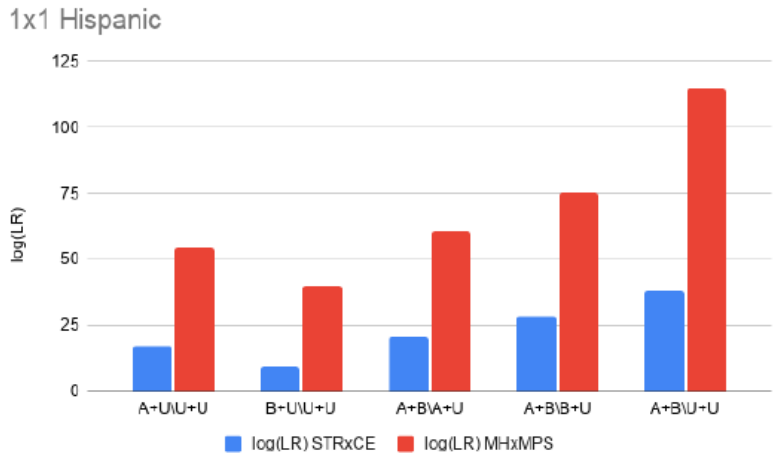
Hp	Hd
A+U+U	U+U+U
B+U+U	U+U+U
C+U+U	U+U+U
A+B+U	U+U+U
A+C+U	U+U+U
B+C+U	U+U+U
A+B+C	U+U+U

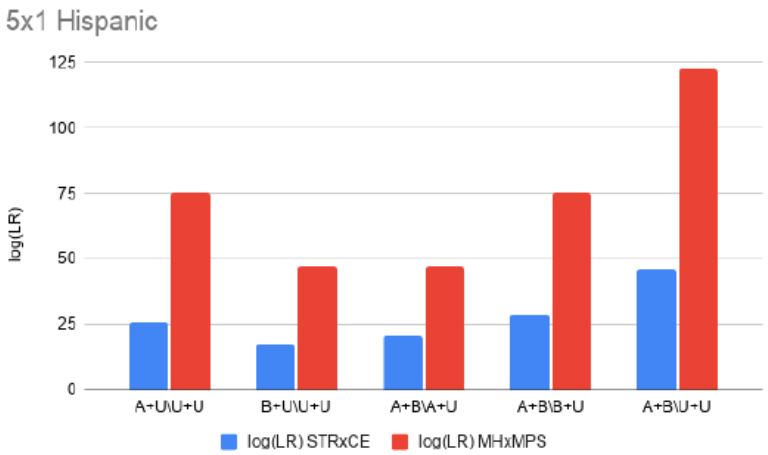
4-person

Hp	Hd
A+U+U+U	U+U+U+U
B+U+U+U	U+U+U+U
C+U+U+U	U+U+U+U
D+U+U+U	U+U+U+U
A+B+C+D	U+U+U+U

Coble, M. D., & Bright, J.-A. (2019). Probabilistic genotyping software: An overview. *Forensic Science International: Genetics*, 219-224.

Two-Person Mixtures EuroForMix





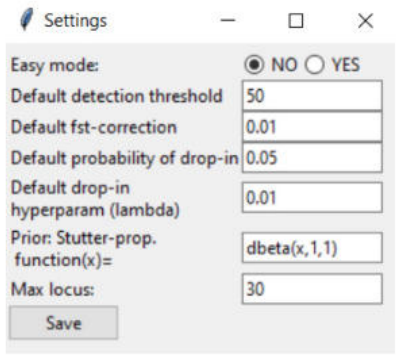
Oldoni F. et al, FSI:Genet 49 (2020)

Credits: D. Podini

Analisi e deconvoluzione delle tracce miste

EuroForMix

- All mixtures were run on EuroForMix v 3.3.0



2-person

Hp	Hd
A+U	U+U
B+U	U+U
A+B	A+U
A+B	B+U
A+B	U+U

3-person

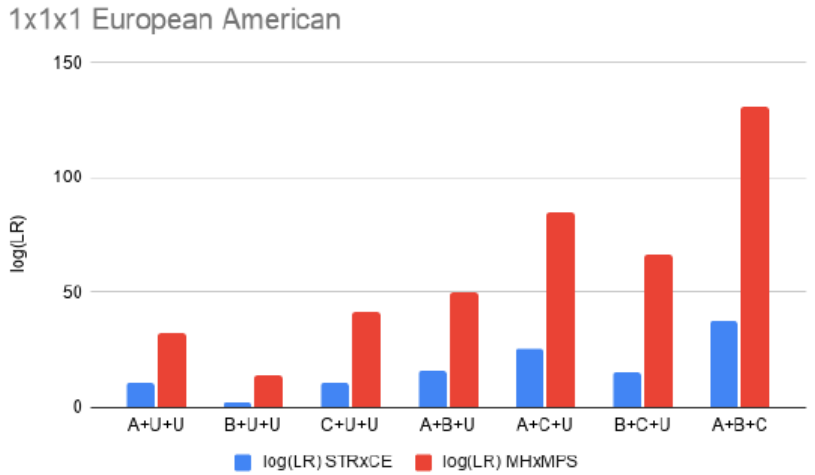
Hp	Hd
A+U+U	U+U+U
B+U+U	U+U+U
C+U+U	U+U+U
A+B+U	U+U+U
A+C+U	U+U+U
B+C+U	U+U+U
A+B+C	U+U+U

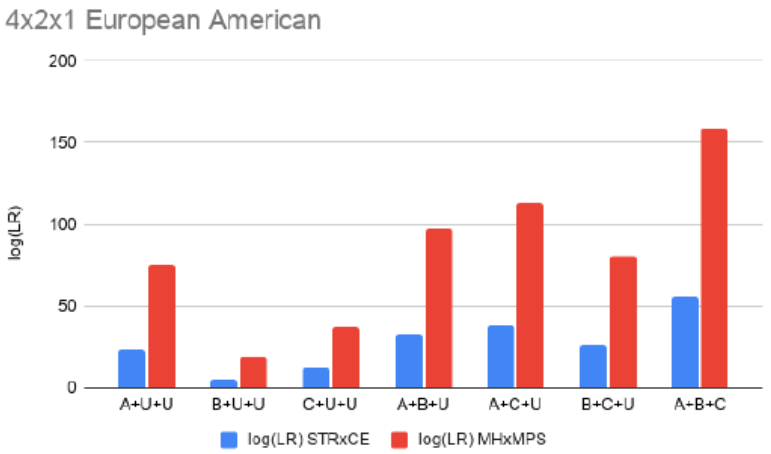
4-person

Hp	Hd
A+U+U+U	U+U+U+U
B+U+U+U	U+U+U+U
C+U+U+U	U+U+U+U
D+U+U+U	U+U+U+U
A+B+C+D	U+U+U+U

Coble, M. D., & Bright, J.-A. (2019). Probabilistic genotyping software: An overview. *Forensic Science International: Genetics*, 219-224.

Three-Person Mixtures EuroForMix





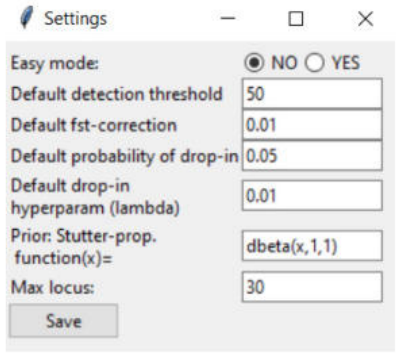
Oldoni F. et al, FSI:Genet 49 (2020)

Credits: D. Podini

Analisi e deconvoluzione delle tracce miste

EuroForMix

- All mixtures were run on EuroForMix v 3.3.0



2-person

Hp	Hd
A+U	U+U
B+U	U+U
A+B	A+U
A+B	B+U
A+B	U+U

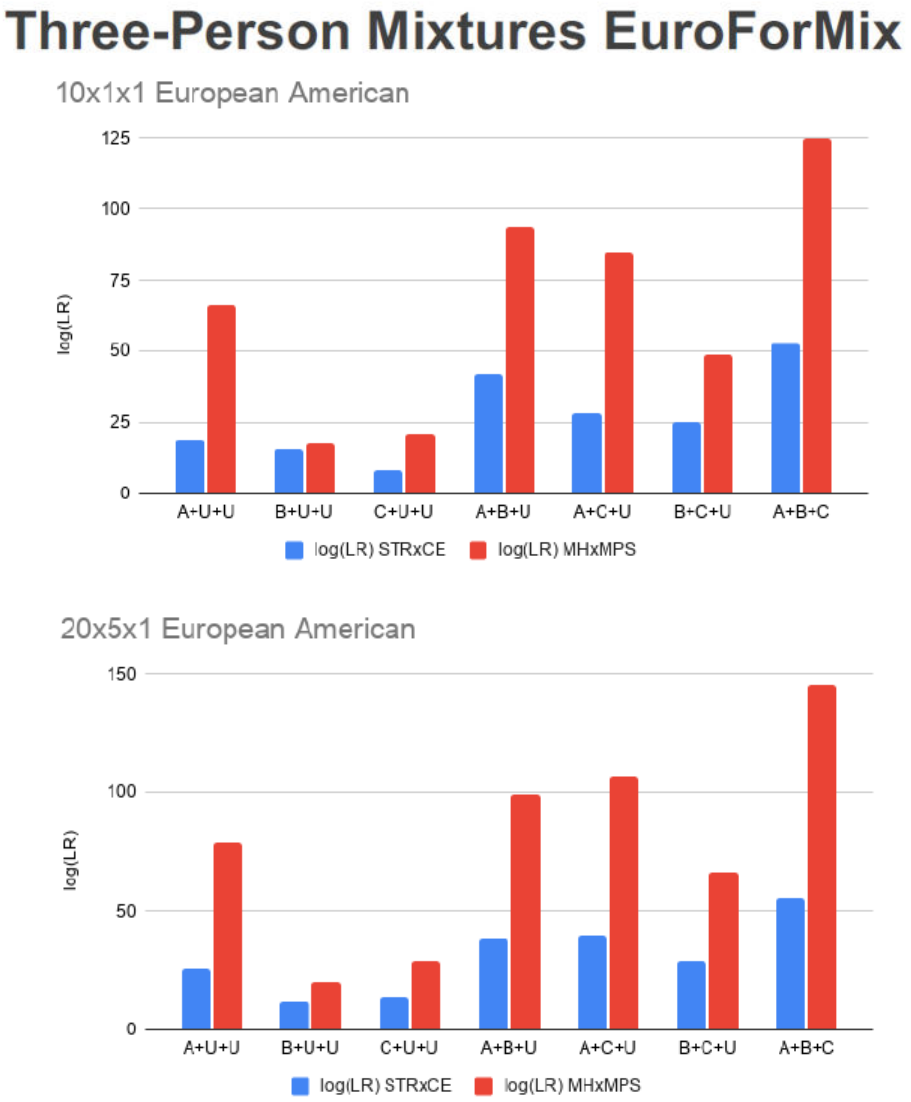
3-person

Hp	Hd
A+U+U	U+U+U
B+U+U	U+U+U
C+U+U	U+U+U
A+B+U	U+U+U
A+C+U	U+U+U
B+C+U	U+U+U
A+B+C	U+U+U

4-person

Hp	Hd
A+U+U+U	U+U+U+U
B+U+U+U	U+U+U+U
C+U+U+U	U+U+U+U
D+U+U+U	U+U+U+U
A+B+C+D	U+U+U+U

Coble, M. D., & Bright, J.-A. (2019). Probabilistic genotyping software: An overview. *Forensic Science International: Genetics*, 219-224.

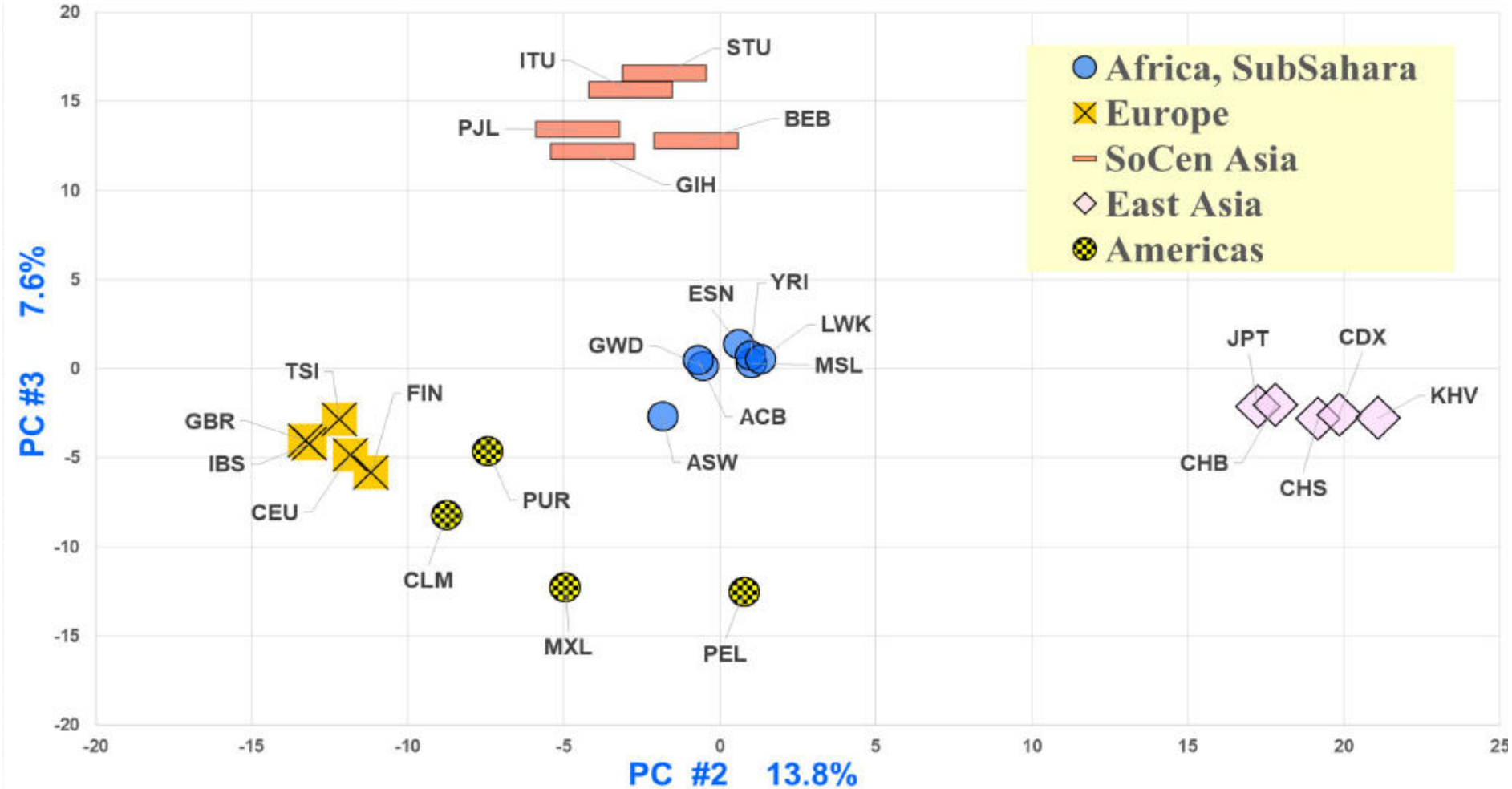


Oldoni F. et al, FSI:Genet 49 (2020)

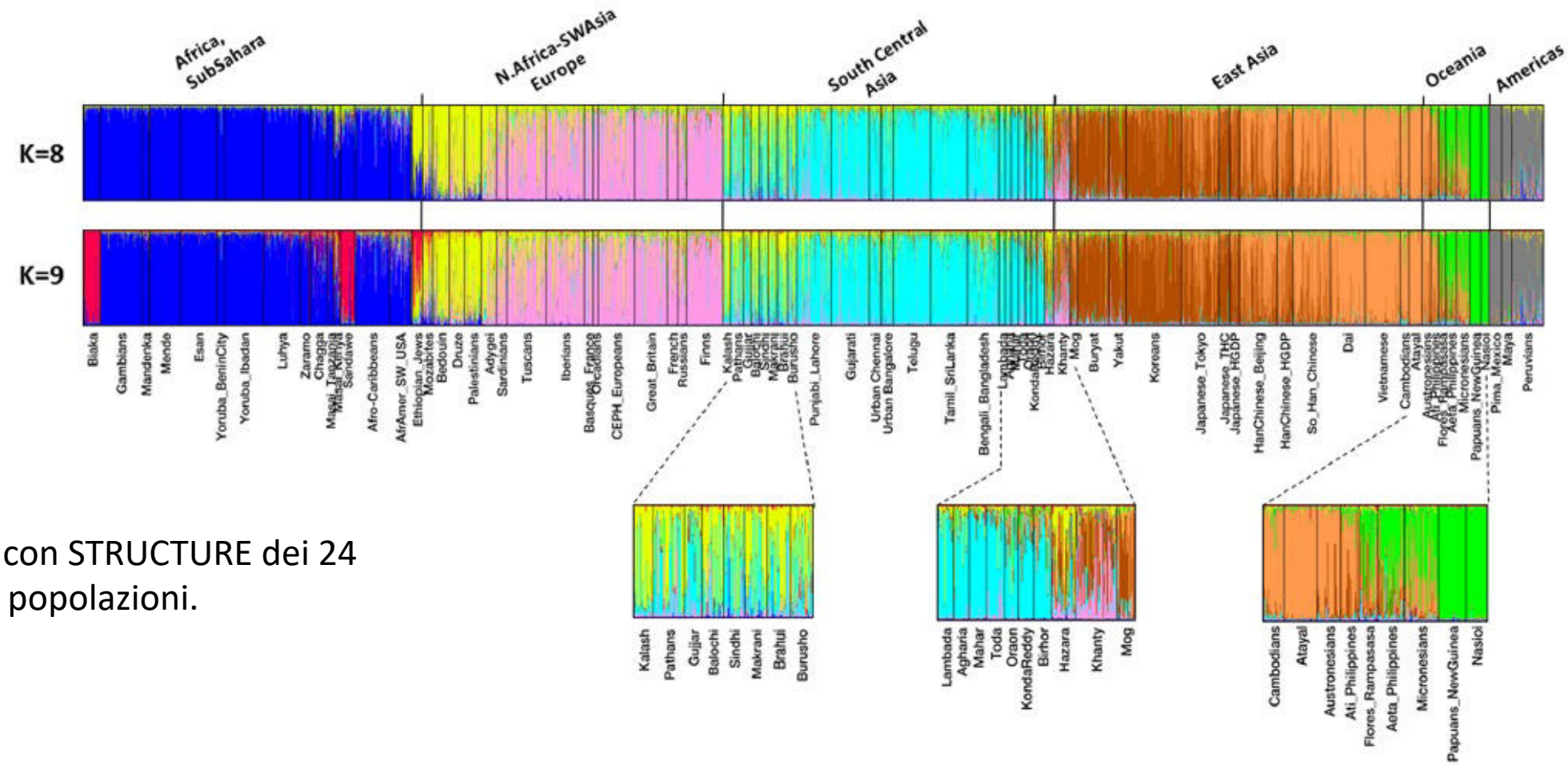
Credits: D. Podini

Predizione origine biogeografica

Analisi PCA dei 24 microaplotipi considerando le popolazioni riportate in 1000 genomi



Predizione origine biogeografica



Risultati dell'analisi con STRUCTURE dei 24 microaplotipi in 79 popolazioni.

Kidd K. *et al* FSI: Genetics 60 (2022)

C. Turchi et al., Minerva Medicoleg. 140 (2020)

DNA degradato

1 pool di primer

Loci mh range: ***18-115bp***

Amplicon size: *126-174bp*

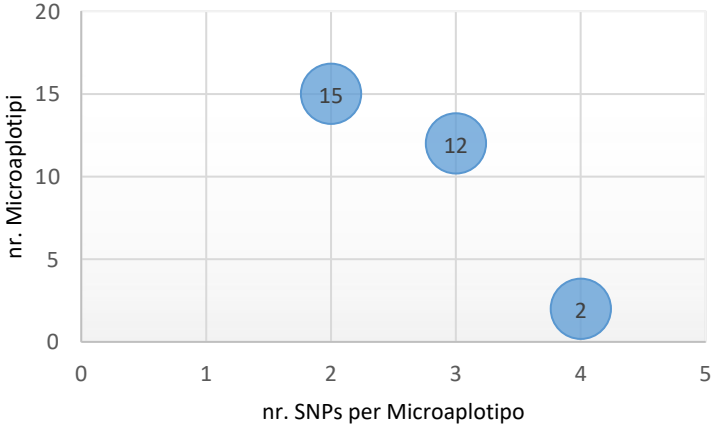
DNA non degradato

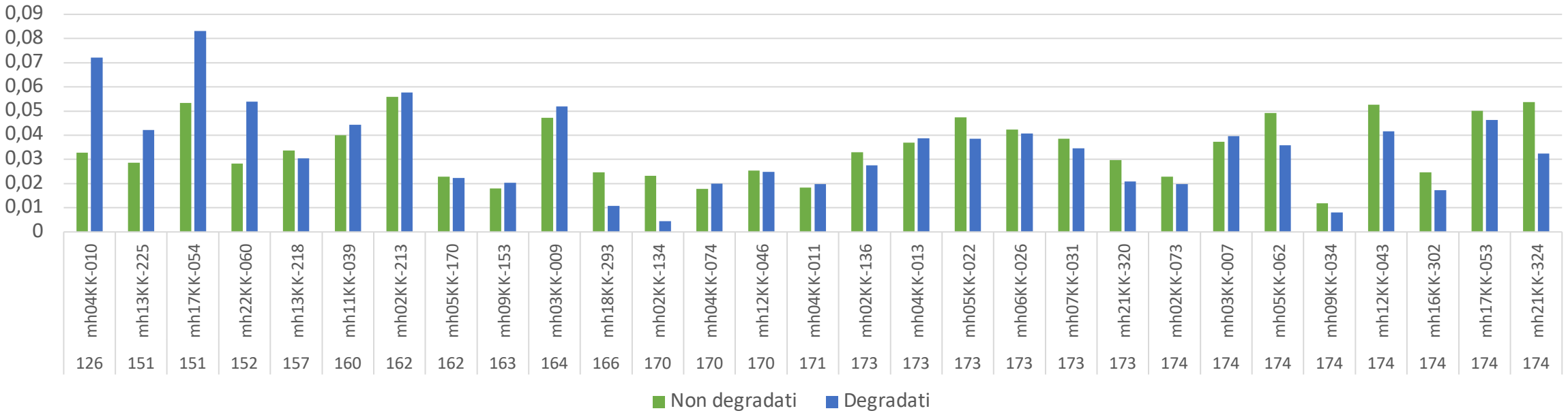
DNA degradato artificialmente

Campioni forensi reali

2800M

Pannello 29 microaplotipi

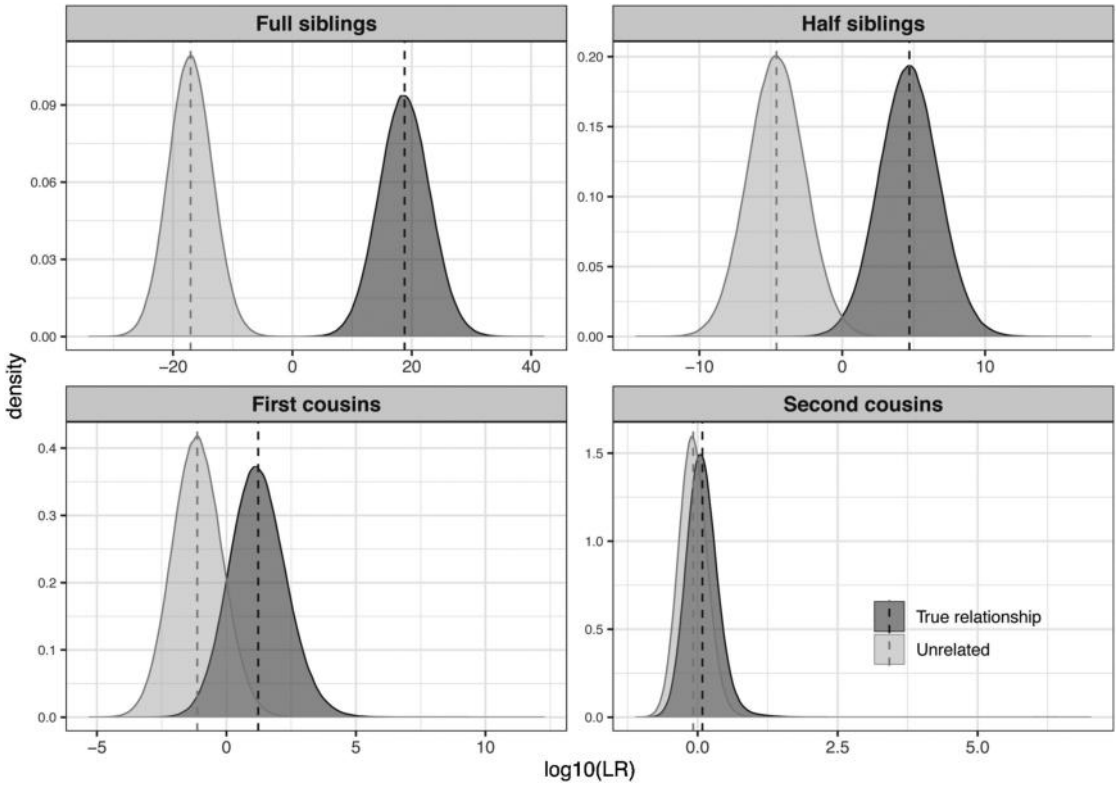




Analisi delle relazioni parentali

Valutare l'informatività di 118 microaplotipi in diversi scenari dell'analisi di parentela, mediante delle simulazioni di diversi pedigree con Familias v3.1.9.6 e utilizzando le frequenze aplotipiche europee in 1KG. Parentele simulate: i) full-siblings; ii) halfsiblings; iii) first-cousins; e iv) second-cousins.

Risultati delle simulazioni di analisi di parentela



La distribuzione dei valori di LRs, confrontando ipotesi di parentela ipotizzata e non parentela, **non si sovrappongono per full-siblings e half-siblings.**

Il grado di **sovrapposizione nelle distribuzioni LR** nel caso **di first-cousins** suggerisce la necessità di marcatori aggiuntivi; mentre l'analisi di **second-cousins** richiede necessariamente un numero molto più elevato di marcatori.

M. de la Puente *et al*. FSI Genet 45 (2020)

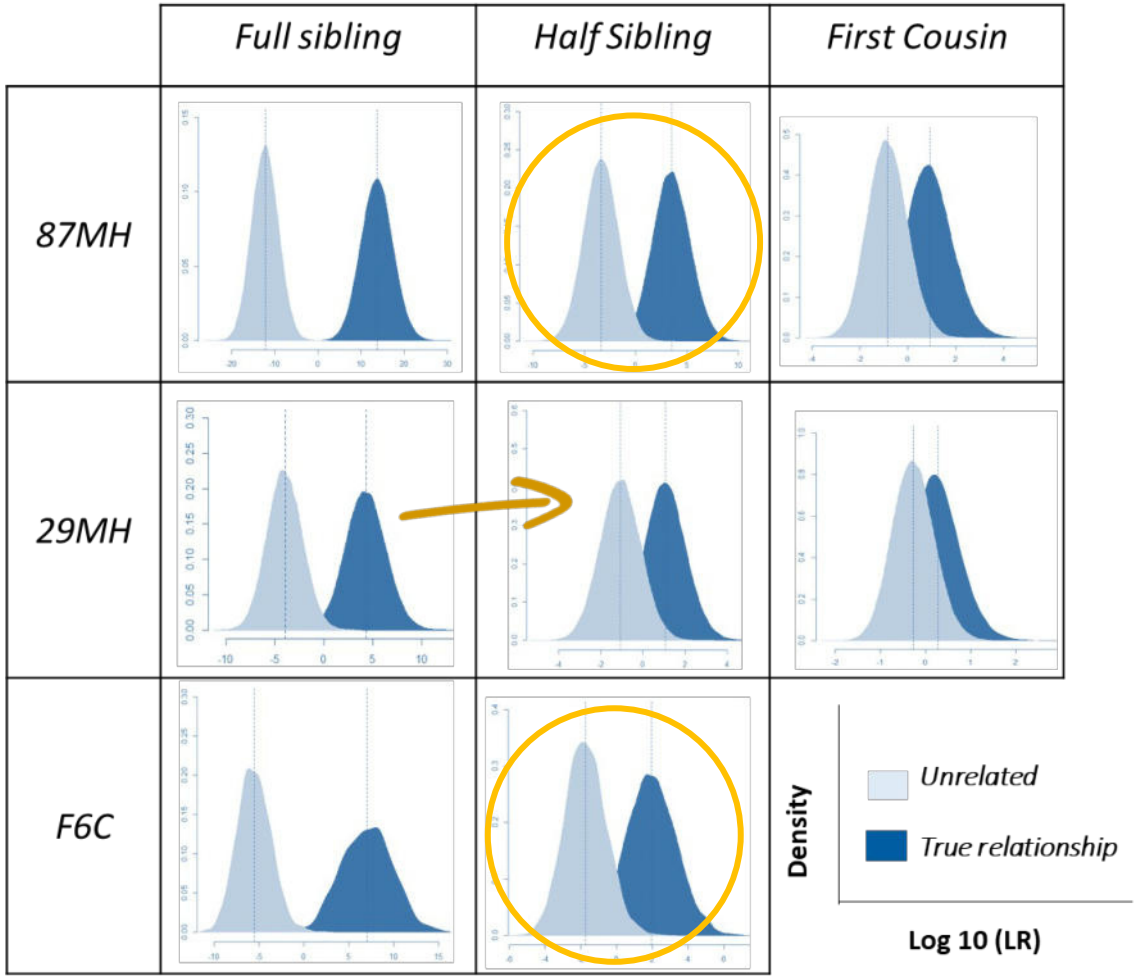
Analisi delle relazioni parentali

Valutazione potere informativo di 87 microaplotipi, 29 microaplotipi e Powerplex Fusion 6C

Software: *Familas v3.2.6*

Simulazioni pedigree= *10000*

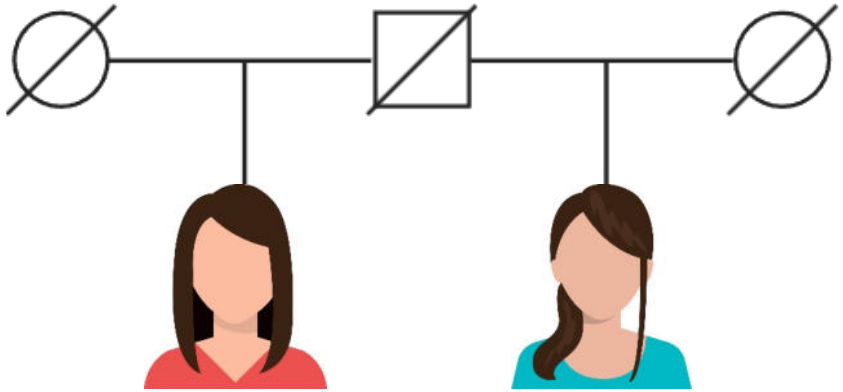
Numero di MH troppo basso per Half Sibling



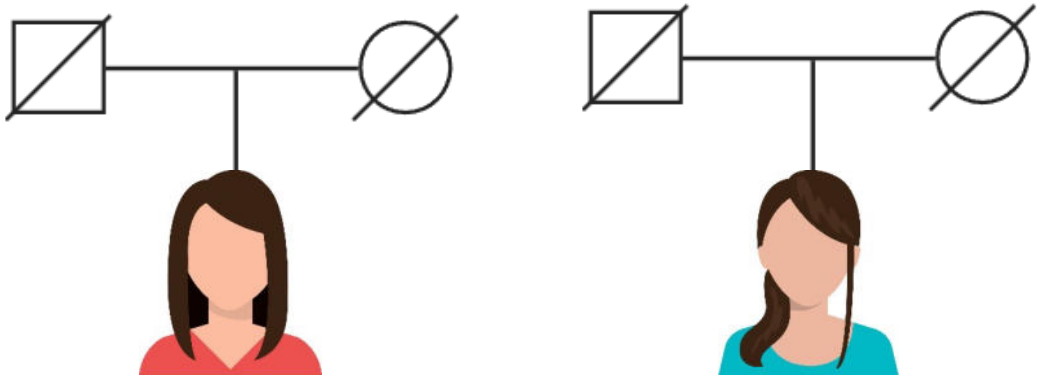
C. Turchi et al., Minerva Medicoleg. 140 (2020)

Applicazione dei microaplotipi in un caso di analisi parentale

Hp: mezze sorelle da parte paterna



Hd: non imparentate



Madri e presunto padre deceduti, DNA non disponibile

Analisi con STR autosomici

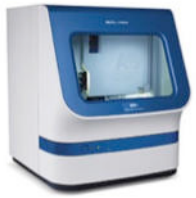
23 STRs
PowerPlex® Fusion 6C System

CE
3500 Genetic Analyzer

LR = 16,8

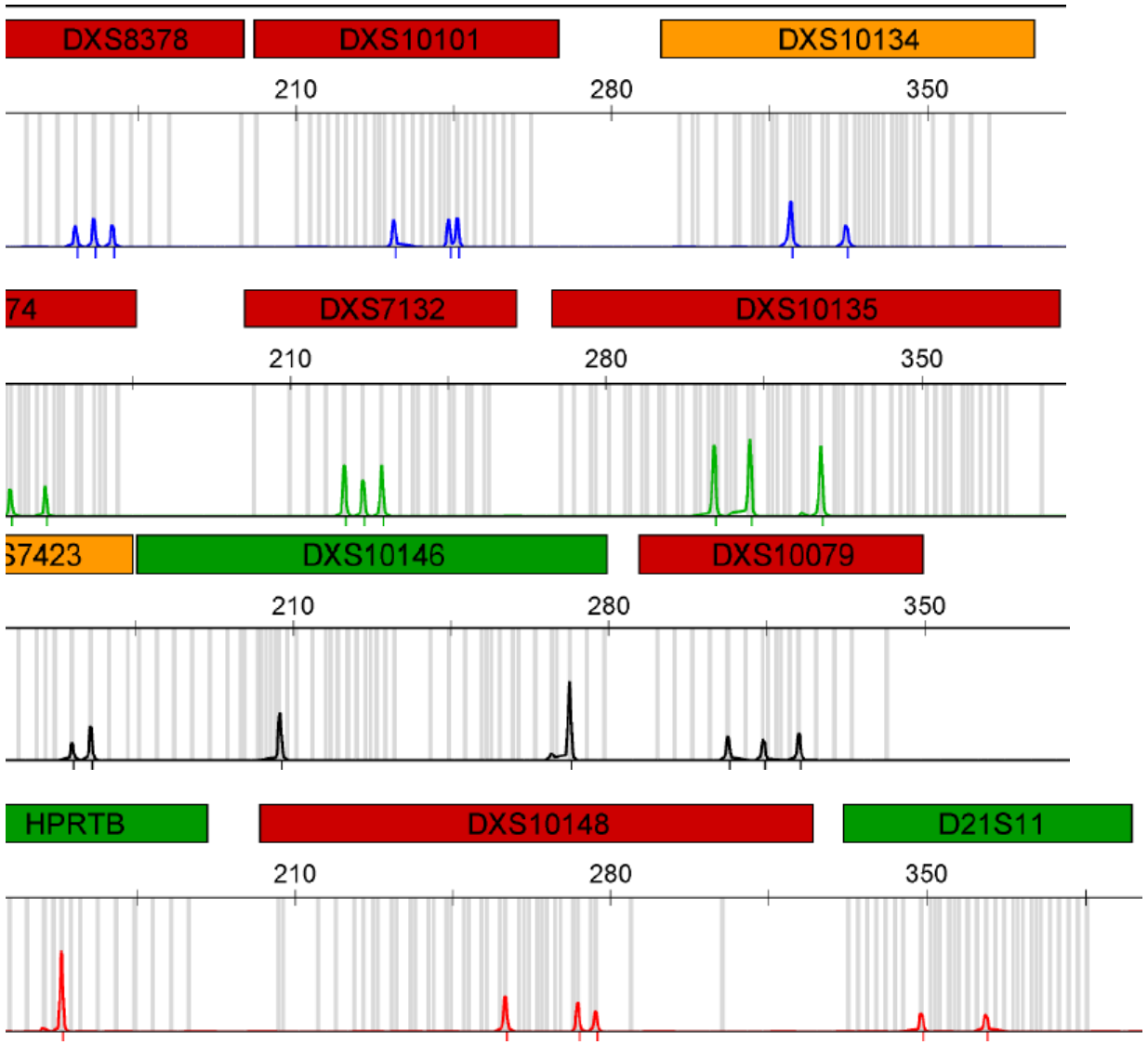
Analisi con STR del cromosoma X

12 X-STRs
Investigator Argus X-12 QS Kit



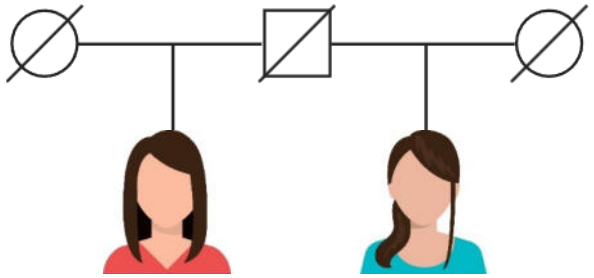
CE
3500 Genetic Analyzer

La tipizzazione dei 12 X-STRs ha mostrato un pattern TRIALLELICO in una delle due probande….

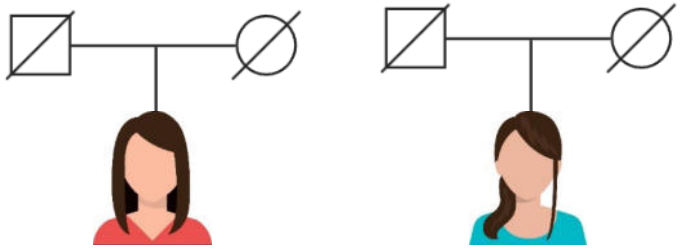


Applicazione dei microaplotipi in un caso di analisi parentale

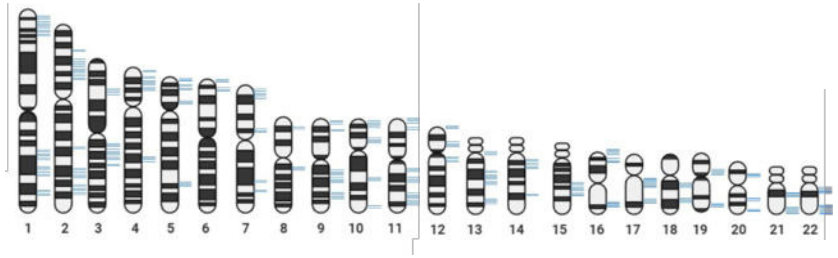
Hp: mezze sorelle da parte paterna



Hd: non imparentate



Analisi con 77 microaplotipi



Progettato per DNA degradato, 319 SNPs

MPS
Ion GeneStudio™ S5 System

LR = 10^8

The Microhaplotype Working Group

Una collaborazione internazionale «informale» tra genetisti forensi interessati allo studio dei microaplotipi, nata dopo l'ultimo congresso ISFG di Washington nel Settembre 2022. October 25th 2022 first meeting.

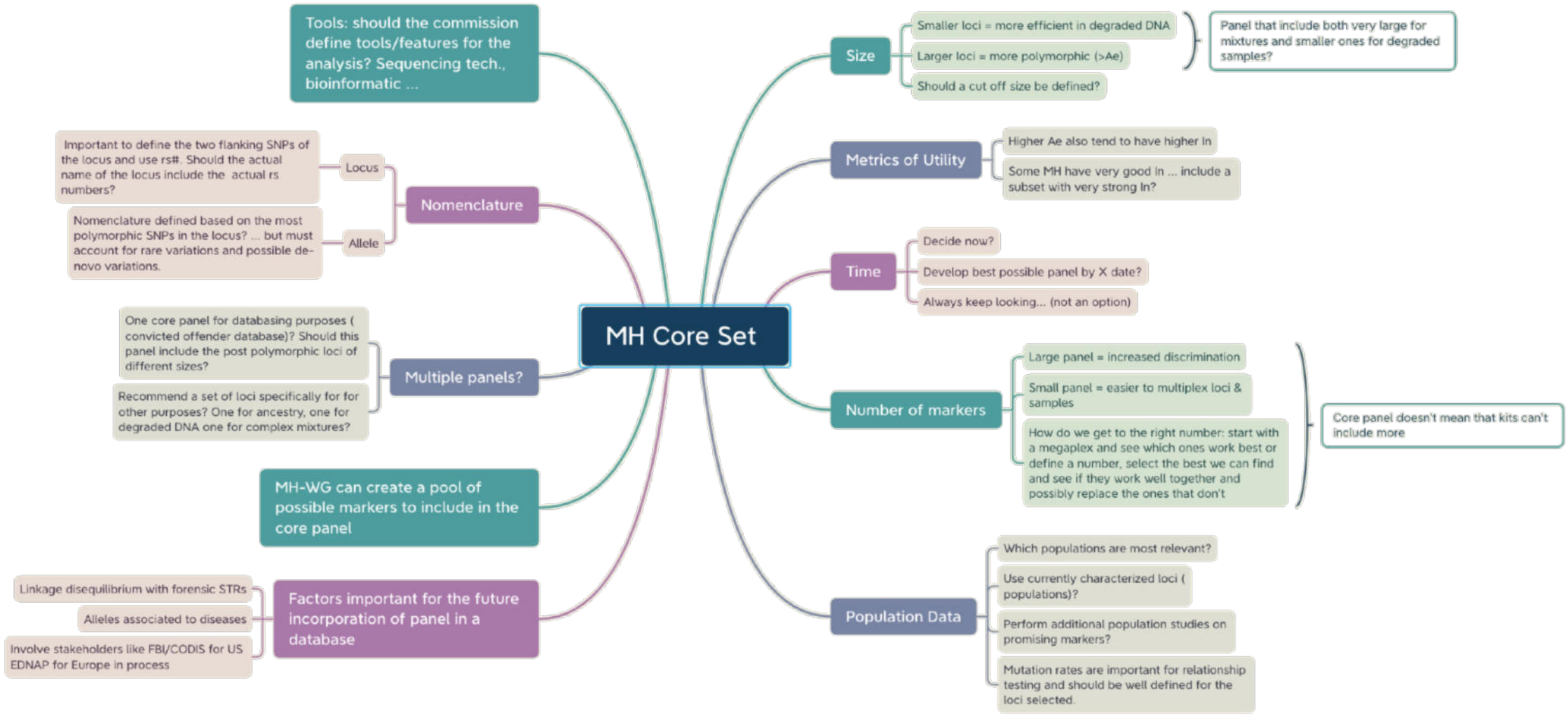
Obiettivi principali:

- ✓ Definire i parametri per la selezione di un core di microaplotipi
- ✓ Proporre all'ISFG la creazione di una commissione per raccomandare un core di MHs da includere in un pannello

….ma anche

- ✓ Stabilire degli standard per l'analisi dei microaplotipi in genetica forense.
- ✓ Promuovere l'utilizzo dei microaplotipi in casi forensi
- ✓ Coordinare il lavoro tra diversi laboratori

Mind map


MH Core Set
Tools: should the commission define tools/features for the analysis? Sequencing tech., bioinformatic ...
Nomenclature
Locus
Important to define the two flanking SNPs of the locus and use rs#. Should the actual name of the locus include the actual rs numbers?
Allele
Nomenclature defined based on the most polymorphic SNPs in the locus? ... but must account for rare variations and possible de-novo variations.
Multiple panels?
One core panel for databasing purposes (convicted offender database)? Should this panel include the post polymorphic loci of different sizes?
Recommend a set of loci specifically for for other purposes? One for ancestry, one for degraded DNA one for complex mixtures?
MH-WG can create a pool of possible markers to include in the core panel
Factors important for the future incorporation of panel in a database
Linkage disequilibrium with forensic STRs
Alleles associated to diseases
Involve stakeholders like FBI/CODIS for US EDNAP for Europe in process
Size
Smaller loci = more efficient in degraded DNA
Larger loci = more polymorphic (>Ae)
Should a cut off size be defined?
Panel that include both very large for mixtures and smaller ones for degraded samples?
Metrics of Utility
Higher Ae also tend to have higher In
Some MH have very good In ... include a subset with very strong In?
Time
Decide now?
Develop best possible panel by X date?
Always keep looking... (not an option)
Number of markers
Large panel = increased discrimination
Small panel = easier to multiplex loci & samples
How do we get to the right number: start with a megaplex and see which ones work best or define a number, select the best we can find and see if they work well together and possibly replace the ones that don't
Core panel doesn't mean that kits can't include more
Population Data
Which populations are most relevant?
Use currently characterized loci (populations)?
Perform additional population studies on promising markers?
Mutation rates are important for relationship testing and should be well defined for the loci selected.

The Microhaplotype Working Group

MH selection

Consensus:

- ✓ Locus should be defined based on the first and last SNP of the targeted region using rs# and chromosome location (HG38)
- ✓ Identify the best markers within each size range *(<100, 100-200, 200-300)*
- ✓ Most polymorphic in most populations
- ✓ Minimize indels
- ✓ Minimize homopolymers
- ✓ Absence of linkage disequilibrium within the selected MHs and (ideally) with forensic STRs

Special Thanks...

- ✓ **Kenneth K. Kidd,** Professor Emeritus of Genetics, Yale School of Medicine
- ✓ **Andrew Pakstis**, Ph.D., retired research scientist in genetics, Yale School of Medicine
- ✓ **Daniele Podini**, Associate Professor and Chair, Department of Forensic Sciences, The George Washington University
- ✓ **Filomena Melchionda**, Ph.D., genetista forense, Università Politecnica delle Marche
- ✓ **The Microhaplotype Working Group**

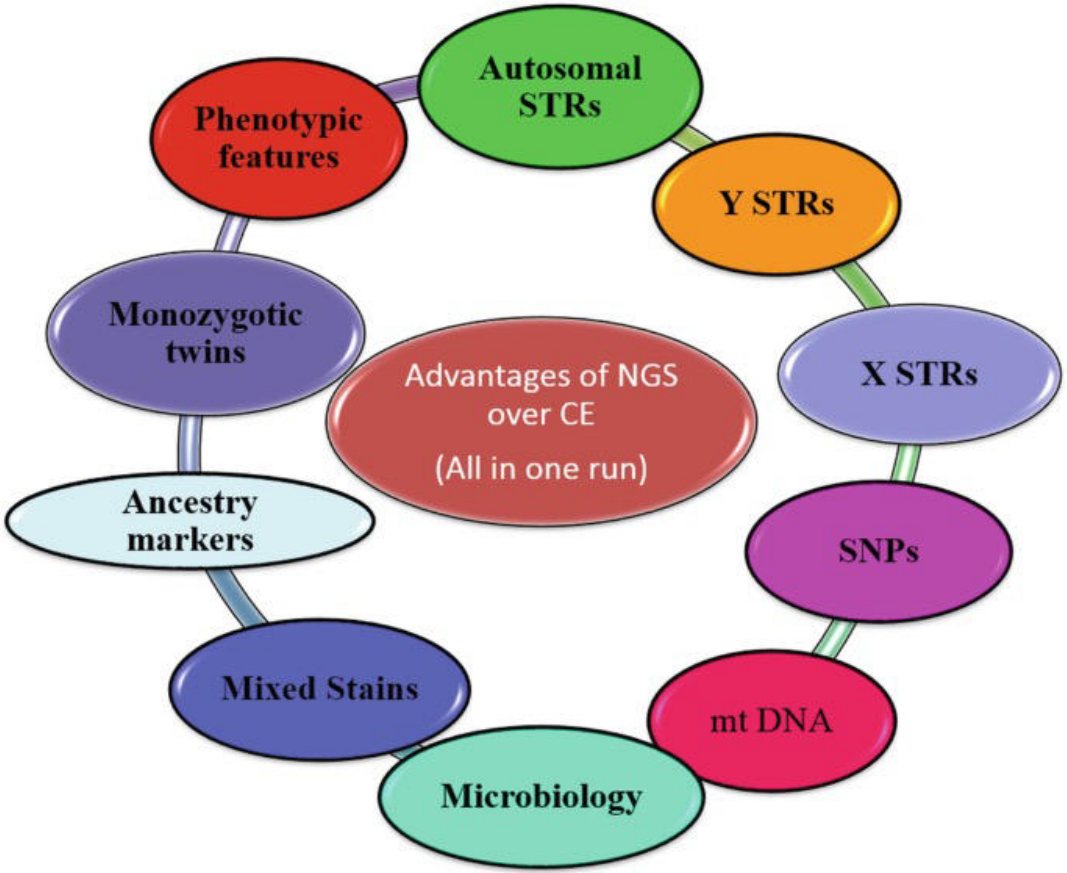
…e voi **TUTTI** per l'attenzione!!!

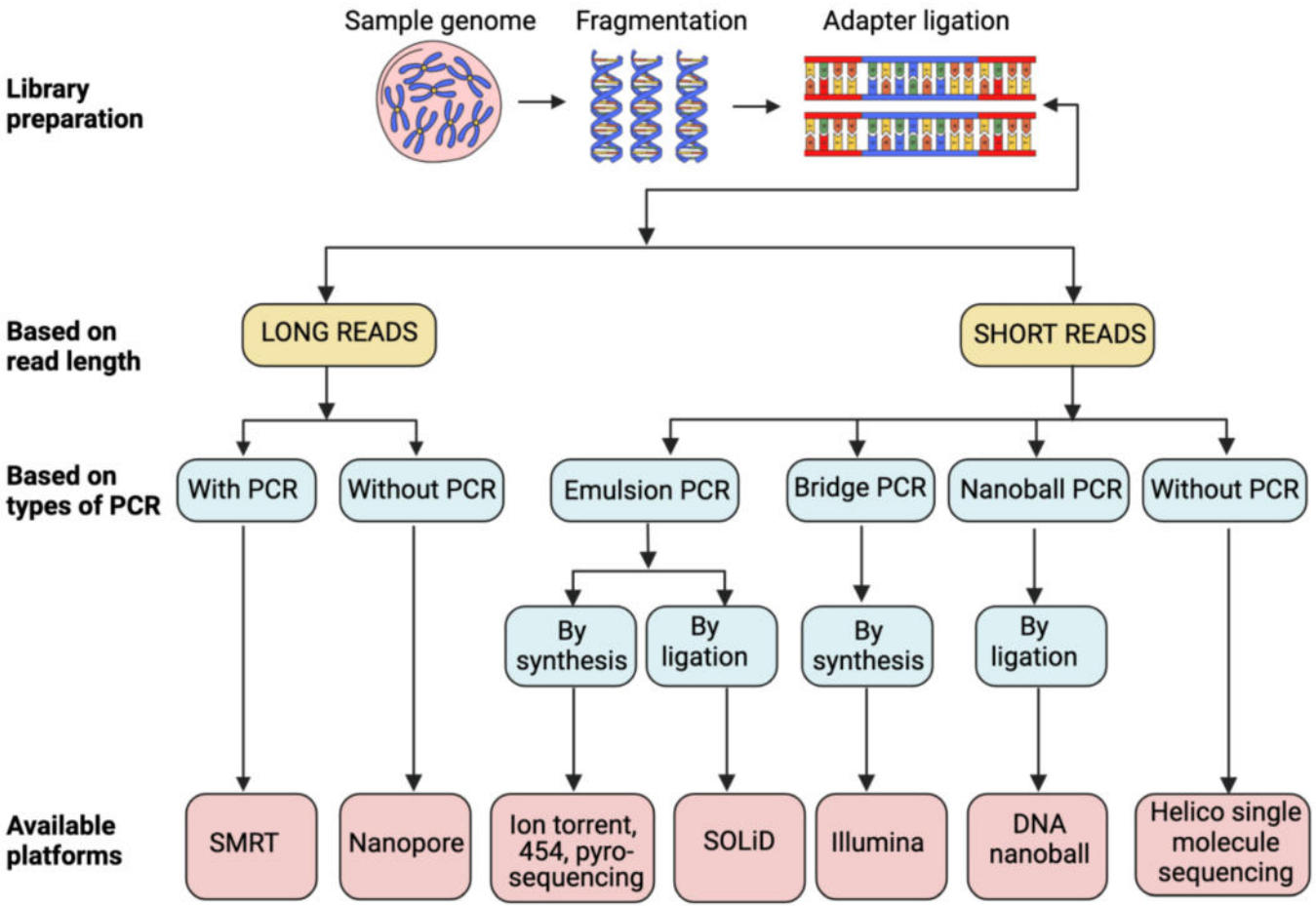
XXIX CONGRESSO NAZIONALE GEFI
Messina, 9-11 novembre 2023

Casi complessi e complicati

Emiliano Giardina

Univ. degli Studi di Roma «Tor Vergata»
Laboratorio di Genetica Forense
emiliano.giardina@uniroma2.it

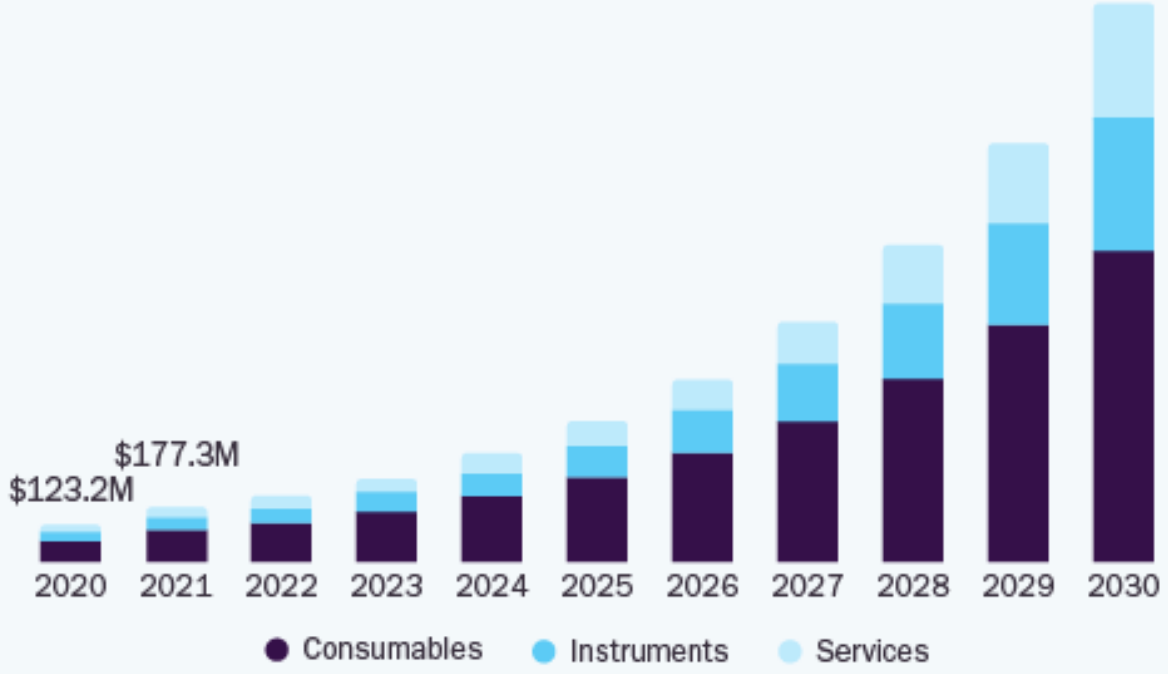

Autosomal STRs
Y STRs
X STRs
SNPs
mt DNA
Microbiology
Mixed Stains
Ancestry markers
Monozygotic twins
Phenotypic features
Advantages of NGS over CE
(All in one run)



Satam *et al.*, 2023

U.S. Long Read Sequencing Market

Size, by Product, 2020 - 2030 (USD Million)

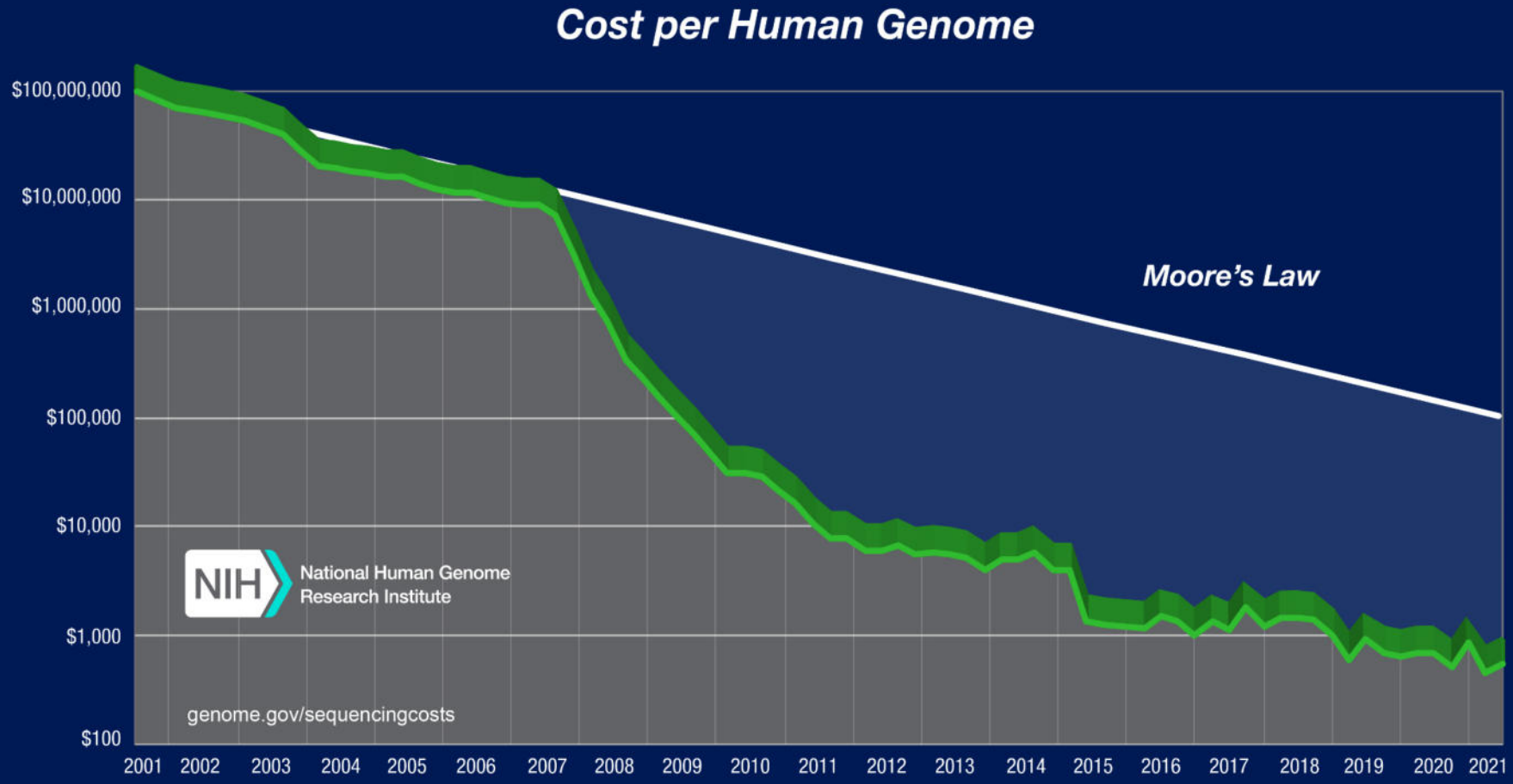


GRAND VIEW RESEARCH

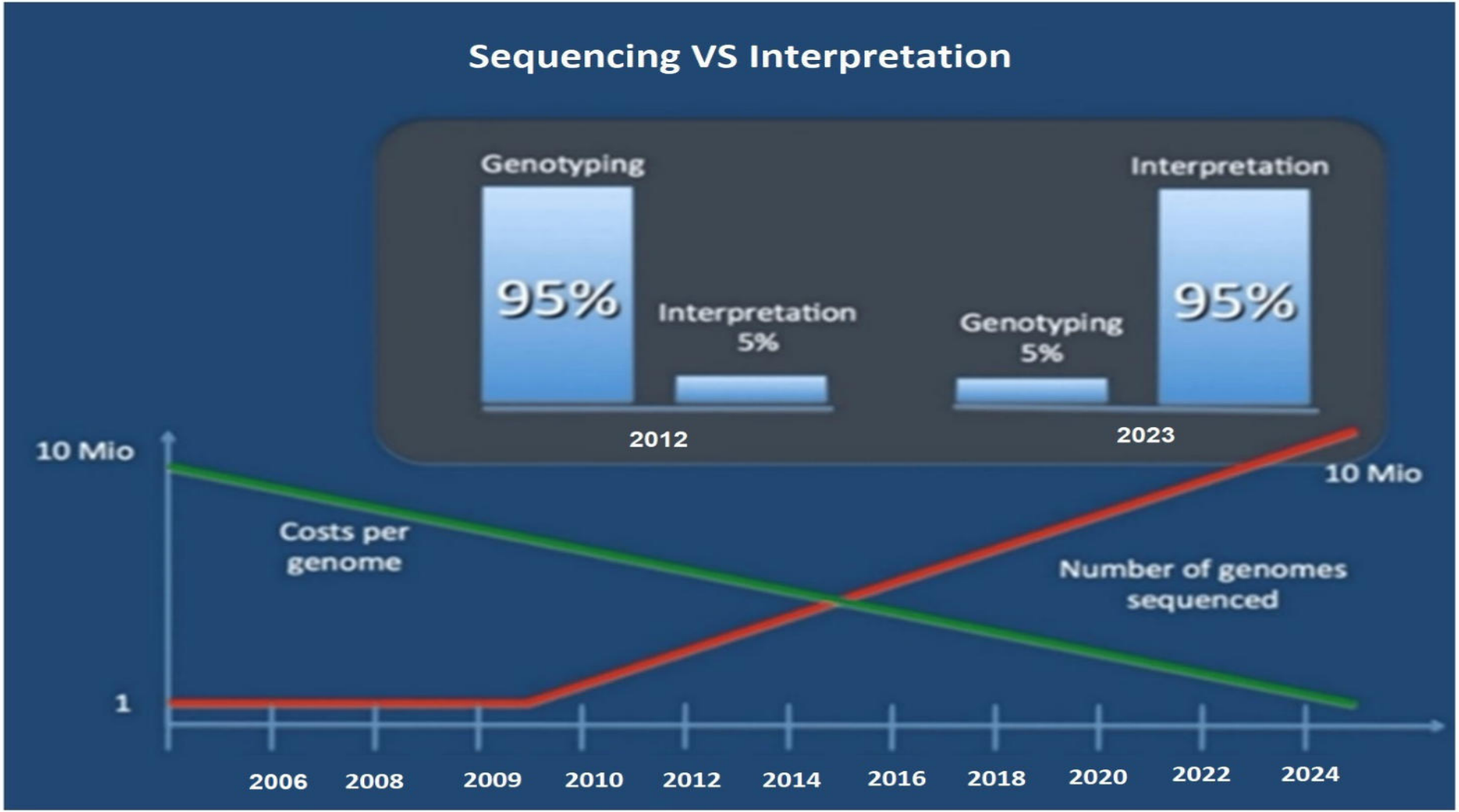
30.7%

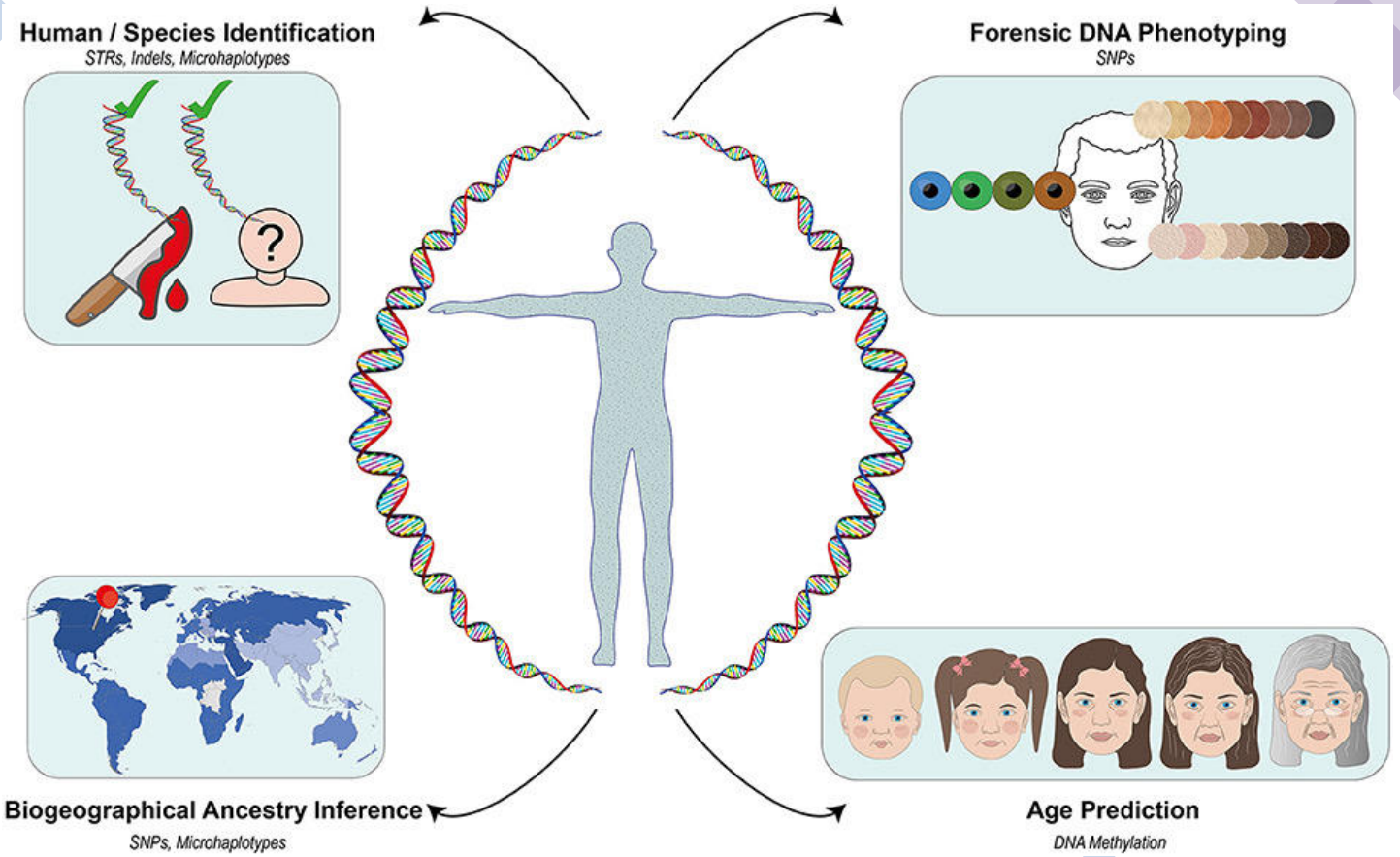
U.S. Market CAGR, 2023 - 2030

Source:
www.grandviewresearch.com


Cost per Human Genome
$100,000,000
$10,000,000
$1,000,000
$100,000
$10,000
$1,000
$100
Moore's Law
NIH
National Human Genome
Research Institute
genome.gov/sequencingcosts
2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021

Sequencing VS Interpretation




Human / Species Identification
STRs, Indels, Microhaplotypes
?
Forensic DNA Phenotyping
SNPs
Biogeographical Ancestry Inference
SNPs, Microhaplotypes
Age Prediction
DNA Methylation

NGS
Ancestry

Precision ID Ancestry Panel

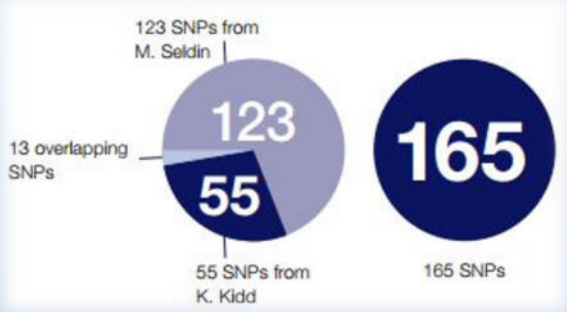
165 marcatori autosomici

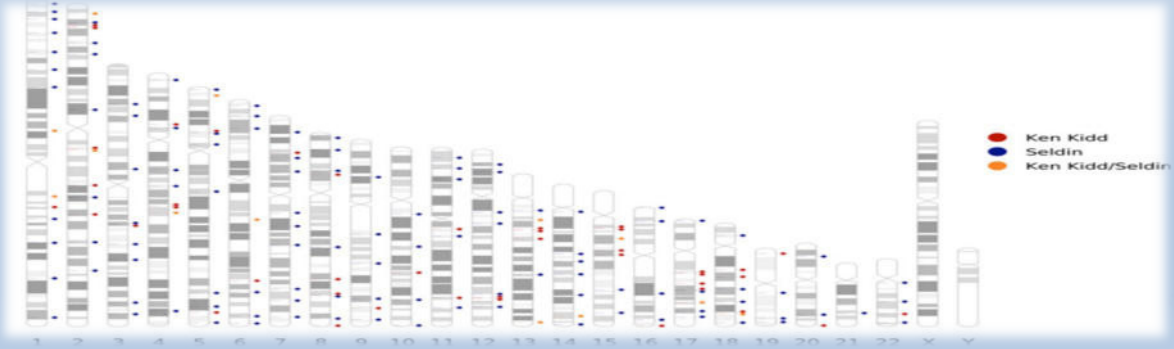
- 55 Ken Kidd (55 AIM set)[1]

Dimensione media 130 bp

- 123 M. Seldin [2]

Dimensione media 122 bp



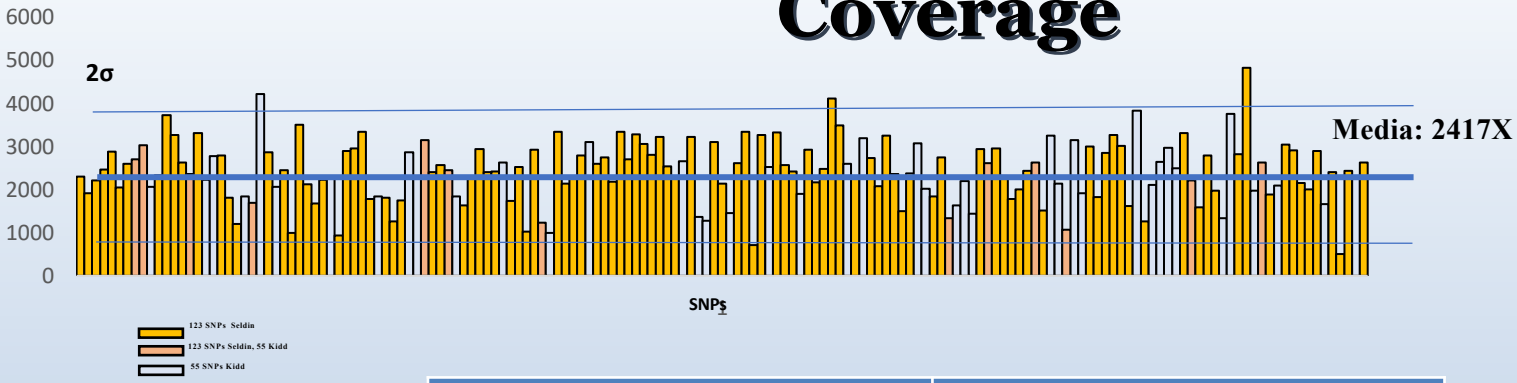


1 Kidd, K. K. (2012). Better SNPs for Better Forensics: Ancestry, Phenotype, and Family Identification. Poster
2 Nassir, R., Kosoy, R., Tian, C., White, P. A., Butler, L. M., Silva, G., et al. (2009). An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. BMC Genetics, 10(1), 39.

Raccolta dei campioni

CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITA'	CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITA'	CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITA'
72 FAF	AFRICANA	**1 AS**	ASIATICA	**1 FEU**	EUROPEA
73 FAF	AFRICANA	**7 AS**	ASIATICA	**2 FEU**	EUROPEA
74 FAF	AFRICANA	**8 AS**	ASIATICA	**3 FEU**	EUROPEA
75 FAF	AFRICANA	**12 AS**	ASIATICA	**4 FEU**	EUROPEA
76 FAF	AFRICANA	**14 AS**	ASIATICA	**5 FEU**	EUROPEA
76 MAF	AFRICANA	**16 AS**	ASIATICA	**1 MEU**	EUROPEA
77 MAF	AFRICANA	**17 AS**	ASIATICA	**2 MEU**	EUROPEA
78 MAF	AFRICANA	**18 AS**	ASIATICA	**3 MEU**	EUROPEA
79 MAF	AFRICANA	**19 AS**	ASIATICA	**4 MEU**	EUROPEA
80 MAF	AFRICANA	**20 AS**	ASIATICA	**5 MEU**	EUROPEA
		1 AS/EU	ASIATICA/EUROPEA		

Coverage

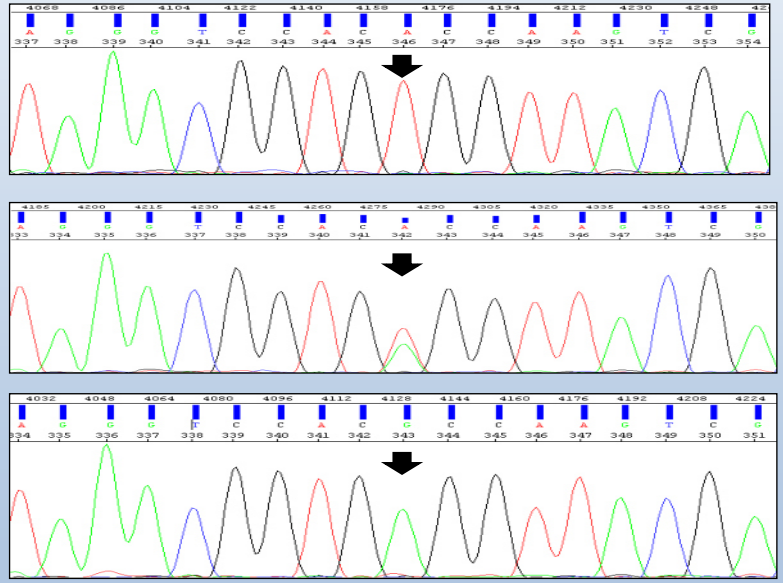


Coverage	SNP
505X	rs1296819
714X	rs2306040
928X	rs9845457
996X	rs1569175
998X	rs3823159

SNPs il cui livello di copertura è risultato basso.

Confronto dati genotipici ottenuti con metodica Sanger

SNP	NGS	Sanger
rs1296819	C/A	C/A
rs2306040	T/C	T/C
rs9845457	G/A	G/A
rs1569175	T/C	T/C
rs3823159	A/G	A/G
rs6754311	T/C	T/C
rs8113143	c/A	C/A
rs13400937	T/G	T/G
rs3827760	A/G	A/G
rs6990312	G/T	G/T



HID SNP Genotyper Plugin v4.2

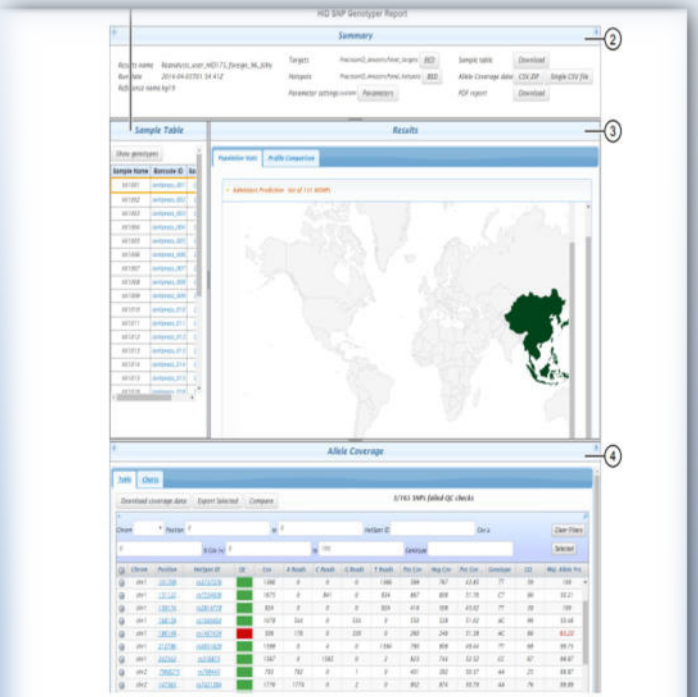
- ***Admixture Prediction***

1. Africa
2. America
3. Europa Sud Occidentale (Medio-Oriente)
4. Europa
5. Oceania
6. Asia Orientale
7. Asia Meridionale

- ***Population Likelihood***

$$L_P = \prod_N f_P(g,i)$$

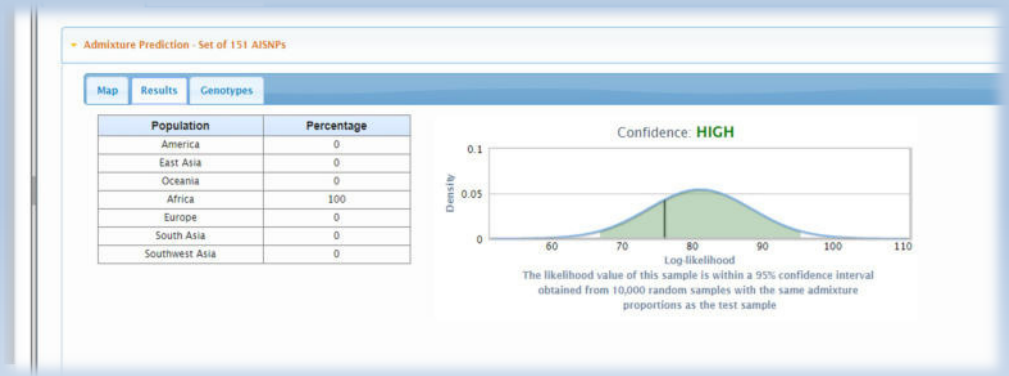
Lp: valore di ancestralità di popolazione (*P*) più verosimile
fp (*g,i*): frequenza del genotipo *g* al locus *i*
N: numero di loci

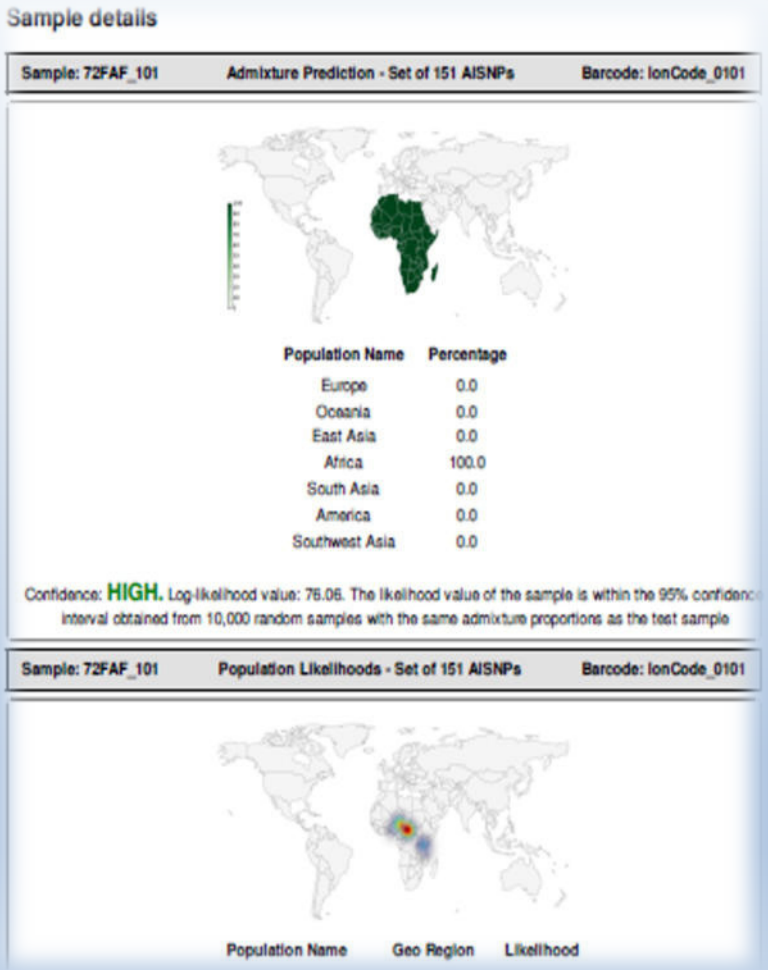


Example HID SNP Genotyper Report (Ancestry Panel results)
① **Sample Table** pane
② **Summary** pane
③ **Results** pane
④ **Allele Coverage** pane

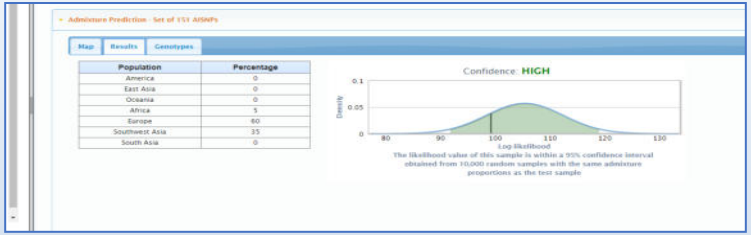
Valutazione dell'Ancestralità Africana

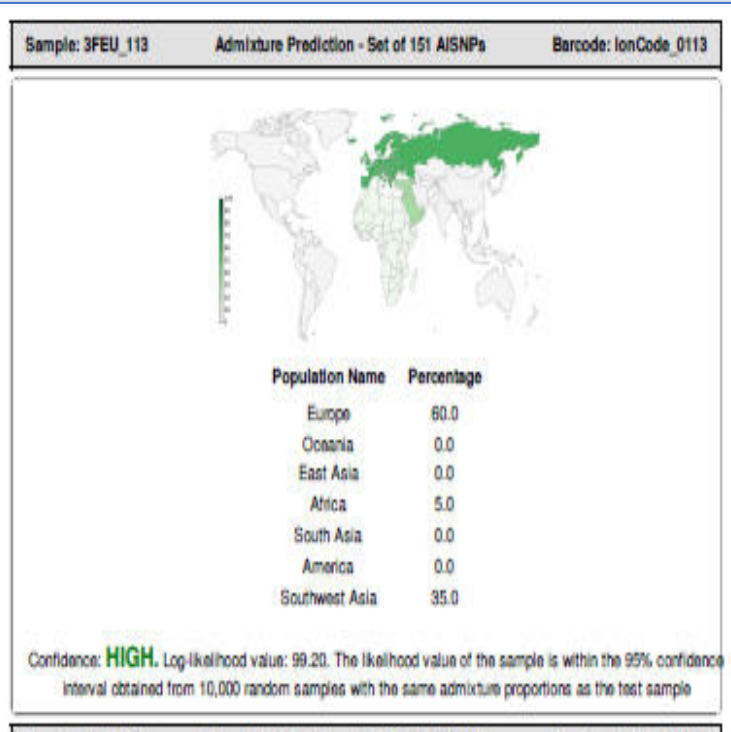
NOME CAMPIONE	PERCENTUALE
72FAF	100% Africa
73FAF	100% Africa
74FAF	95% Africa-5% Oceania
75FAF	100% Africa
76FAF	100% Africa
76MAF	100% Africa
77MAF	100% Africa
78MAF	100% Africa
79MAF	100% Africa
80MAF	100% Africa





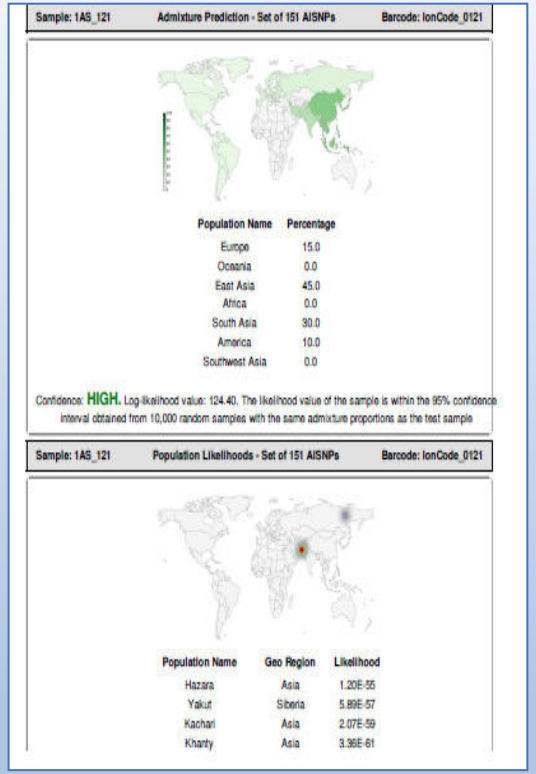
Valutazione dell'Ancestralità Europea





NOME CAMPIONE12	PERCENTUALE
1FEU	85% Europa-15% Medio-Oriente
2FEU	35% Europa-65% Medio-Oriente
3FEU	60% Europa-35% Medio-Oriente-5% Africa
4FEU	65%Europa-35% Medio-Oriente
5FEU	100% Europa
1MEU	75% Europa-25% Medio-Oriente
2MEU	65%Europa-35% Medio-Oriente
3MEU	60%Europa-40% Medio-Oriente
4MEU	30%Europa-70% Medio-Oriente
5MEU	65%Europa-30% Medio-Oriente-5% Oceania

Valutazione dell'Ancestralità Asiatica



Sample: 1AS_121 Admixture Prediction - Set of 151 AISNPs Barcode: IonCode_0121

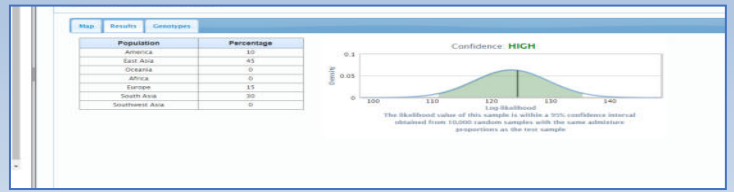
Population Name	Percentage
Europe	15.0
Oceania	0.0
East Asia	45.0
Africa	0.0
South Asia	30.0
America	10.0
Southwest Asia	0.0

Confidence: HIGH. Log-likelihood value: 124.40. The likelihood value of the sample is within the 95% confidence interval obtained from 10,000 random samples with the same admixture proportions as the test sample

Sample: 1AS_121 Population Likelihoods - Set of 151 AISNPs Barcode: IonCode_0121

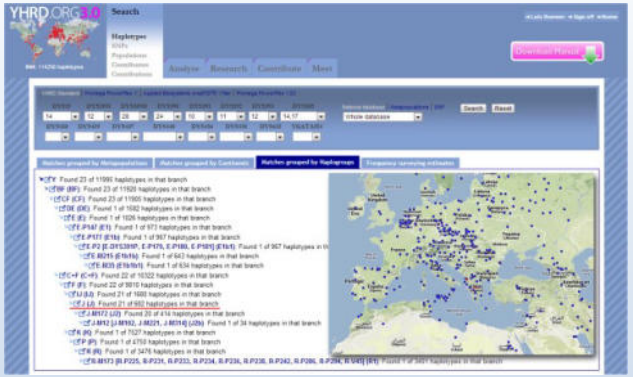
Population Name	Geo Region	Likelihood
Hazara	Asia	1.20E-55
Yakut	Siberia	5.89E-57
Kachari	Asia	2.07E-59
Khanty	Asia	3.36E-61

NOME CAMPIONE	PERCENTUALE
1AS	45% Asia Orientale- 30% Asia Meridionale-15% Europa-10% America
7AS	100% Asia Orientale
8AS	35% Asia Orientale-30% Asia Meridionale-5% Europa- 30% America
12AS	55% Asia Orientale-40% Europa-5% America
14AS	55% Asia Orientale-5% Europa--20% America-20% Oceania
16AS	45% Asia Orientale-30% Asia Meridionale-15% Europa-10% America
17AS	55% Asia Orientale-30% Asia Meridionale-5% Europa-10% America
18AS	50% Asia Orientale-50% Asia Meridionale
19AS	45% Asia Orientale-30% Europa-5% Africa-20% America
20AS	70% Asia Orientale-25% Europa-5% America

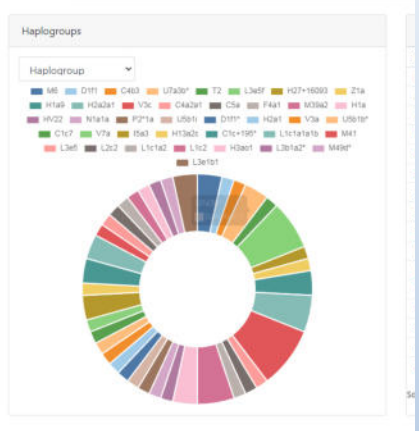


CODICE CAMPIONE	PERCENTUALE	CODICE CAMPIONE	PERCENTUALE	CODICE CAMPIONE	PERCENTUALE
72 FAF	100% AFRICA	**1 AS**	45% ASIA ORIENTALE -30 %ASIA MERIDIONALE – 15% EUROPA – 10% AMERICA	**1 FEU**	85% EUROPA – 15% MEDIO-ORIENTE
73 FAF	100% AFRICA	**7 AS**	100% ASIA ORIENTALE	**2 FEU**	35% EUROPA – 65& MEDIO-ORIENTE
74 FAF	95% AFRICA – 5% OCEANIA	**8 AS**	35% ASIA ORIENTALE – 30% ASIA MERIDIONALE – 5% EUROPA – 30% AMERICA	**3 FEU**	60% EUROPA – 35% MEDIO-ORIENTE – 5% AFRICA
75 FAF	100% AFRICA	**12 AS**	55% ASIA ORIENTALE – 40% EUROPA – 5% AMERICA	**4 FEU**	65% EUROPA – 35% MEDIO-ORIENTE
76 FAF	100% AFRICA	**14 AS**	55% ASIA ORIENTALE – 40% EUROPA – 5% AMERICA	**5 FEU**	100% EUROPA
76 MAF	100% AFRICA	**16 AS**	45% ASIA ORIENTALE – 30% ASIA MERIDIONALE – 15% EUROPA – 10% AMERICA	**1 MEU**	75% EUROPA – 25% MEDIO-ORIENTE
77 MAF	100% AFRICA	**17 AS**	55% ASIA ORIENTALE – 30% ASIA MERIDIONALE – 5% EUROPA – 10% AMERICA	**2 MEU**	65% EUROPA – 35% MEDIO-ORIENTE
78 MAF	100% AFRICA	**18 AS**	50% ASIA ORIENTALE – 50% ASIA MERIDIONALE	**3 MEU**	60% EUROPA – 40% MEDIO-ORIENTE
79 MAF	100% AFRICA	**19 AS**	45% ASIA ORIENTALE – 30% EUROPA – 5% AFRICA – 20% AMERICA	**4 MEU**	30% EUROPA – 70% MEDIO-ORIENTE
80 MAF	100% AFRICA	**20 AS**	70% ASIA ORIENTALE – 25% EUROPA – 5% AMERICA	**5 MEU**	65% EUROPA – 30% MEDIO-ORIENTE – 5% OCEANIA

CAMPIONI	ANCESTRALITÀ
72 FAF	64,86% AFRICANO
73 FAF	77,78% AFRICANO
74 FAF	100% AFRICANO
75 FAF	100% AFRICANO
76 FAF	93,75% AFRICANO
76 MAF	98,28% AFRICANO
77 MAF	100% AFRICANO
79 MAF	100% AFRICANO
80 MAF	90,16% AFRICANO
1 MEU	75% EUROPEO
2 MEU	84,09% EUROPEO
3 MEU	93,33% EUROPEO
4 MEU	50% EUROPEO
5 MEU	44,44% EUROPEO
18 MAS	90,70% ASIATICO



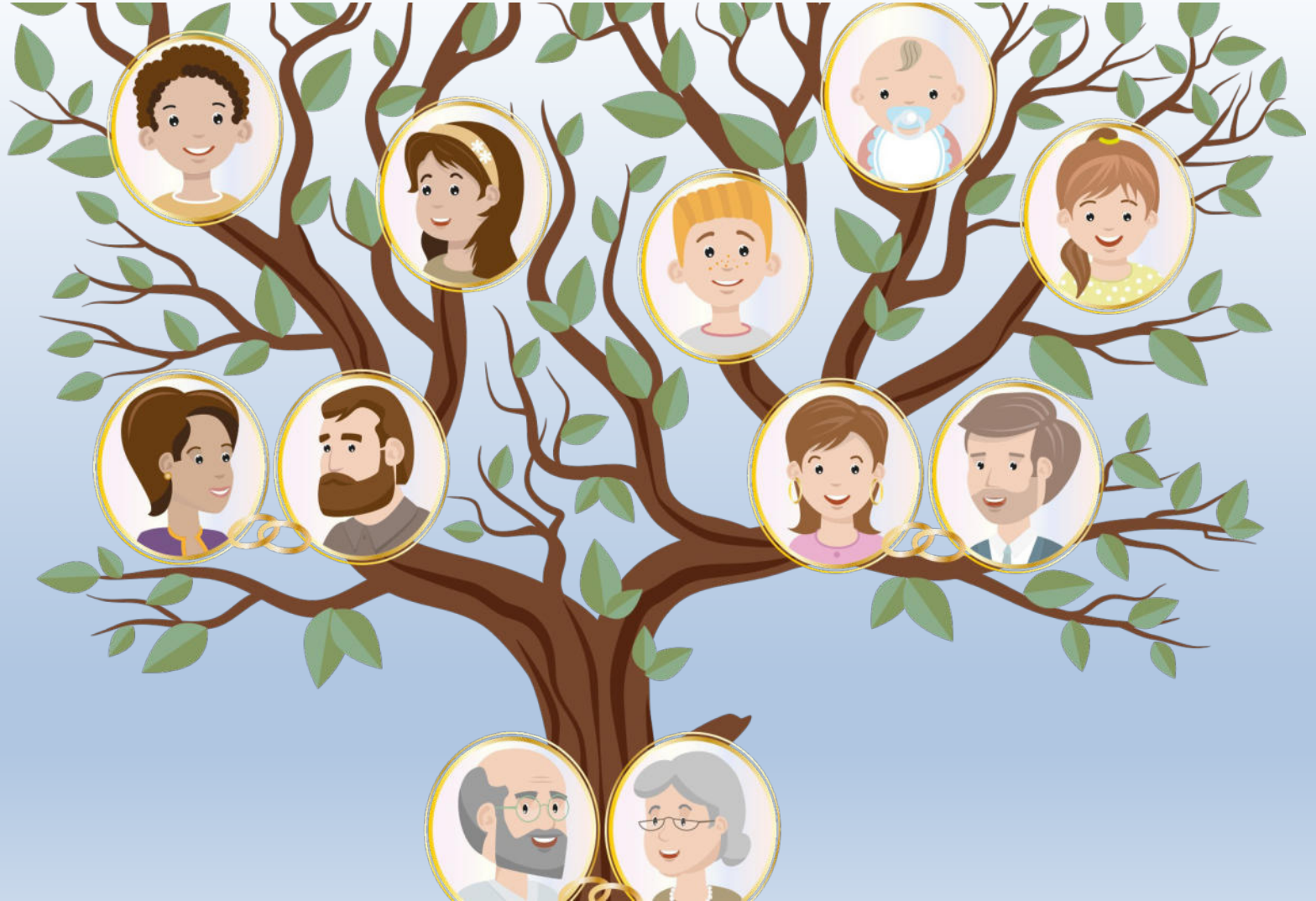
Risultati ottenuti con il database «Haplogrep 3»

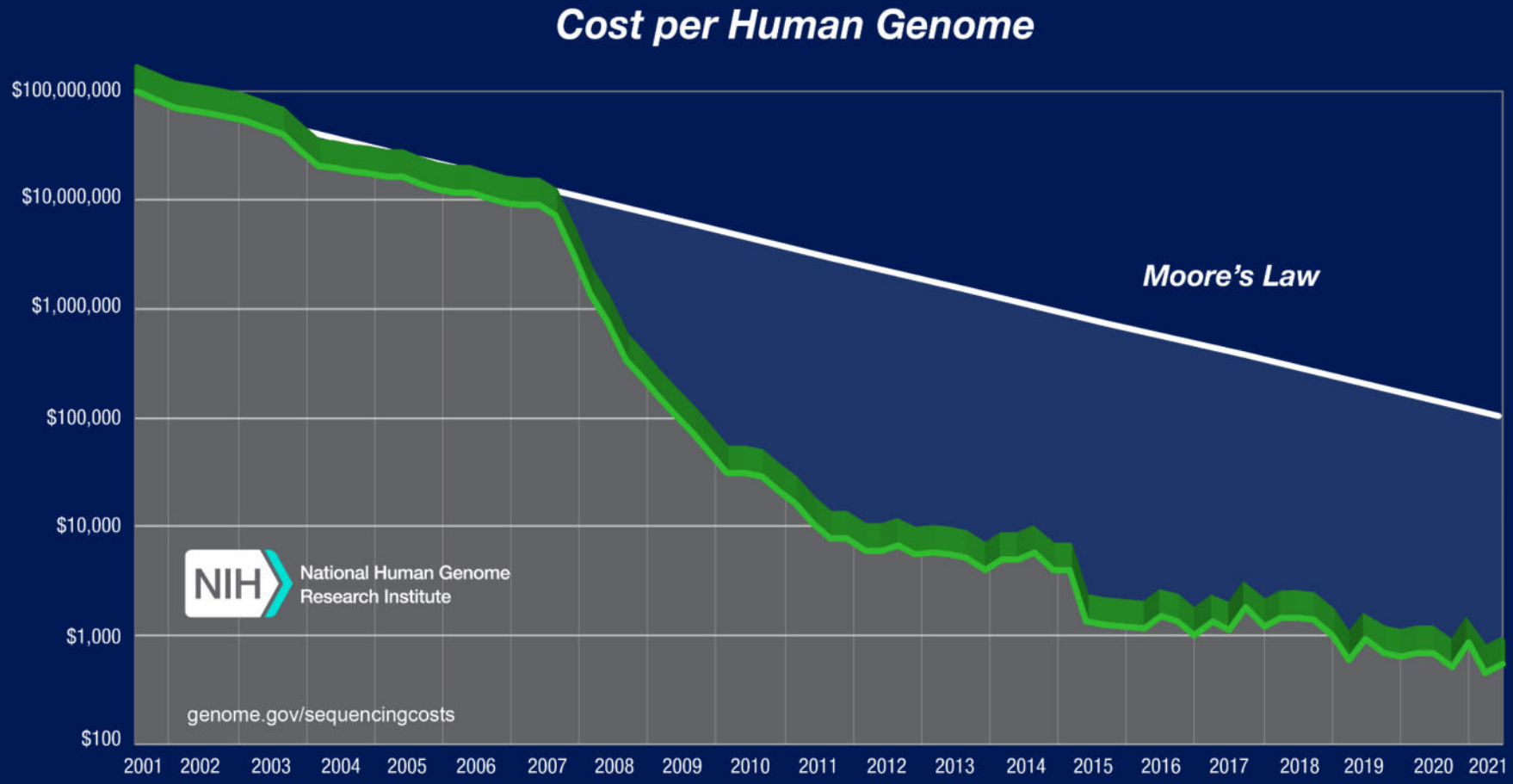


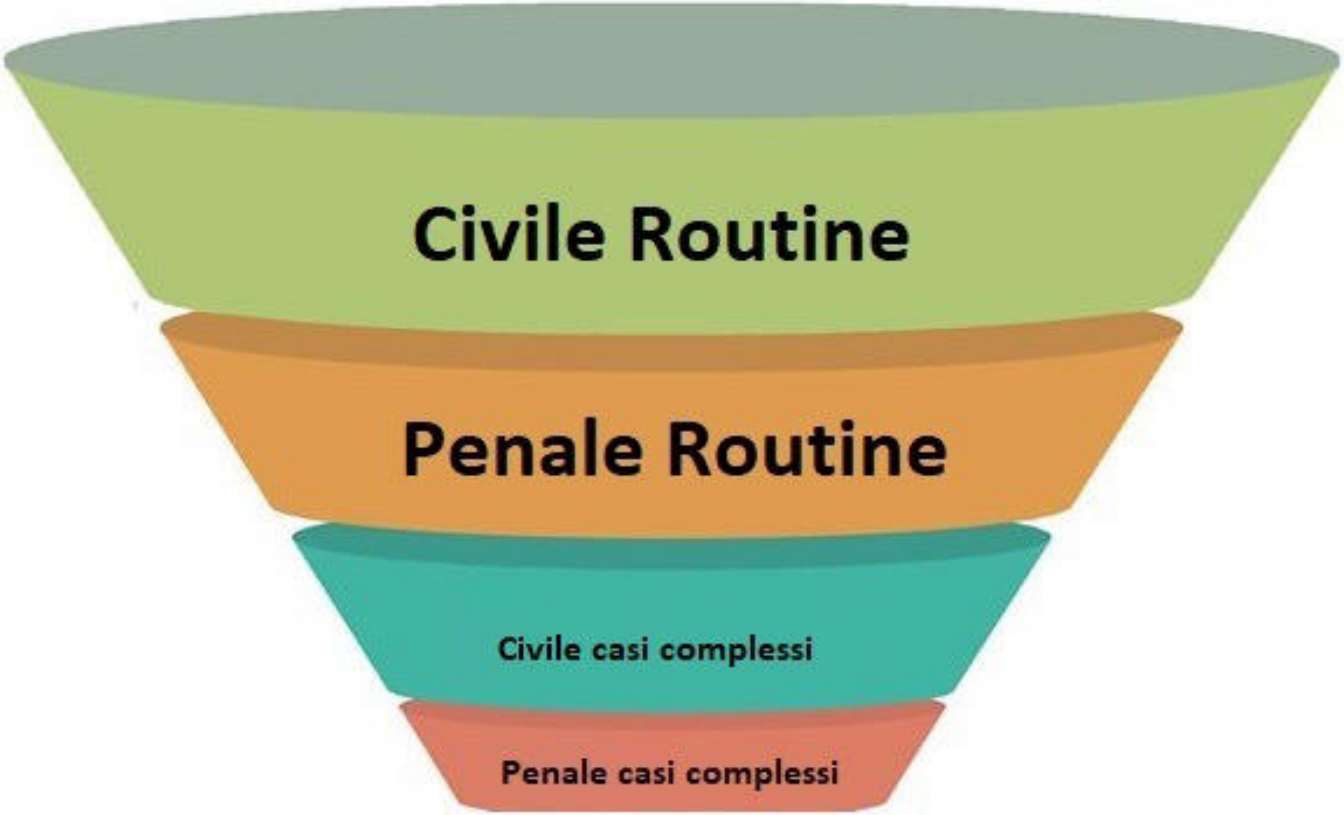
CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITÀ	APLOTIPO	CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITÀ	APLOTIPO	CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITÀ	APLOTIPO
72 FAF	79% LATINO-AMERICANO	C1c+195	**1 AS**	79% LATINO-AMERICANO	C4b3	**1 FEU**	84% EUROPEO	T2
73 FAF	93% AFRICANO	L1c1a1a1b	**7 AS**	76% EUROPEO	H1a	**2 FEU**	76% EUROPEO	H1a
74 FAF	93%AFRICANO	L1c1a1a1b	**8 AS**	59% ASIATICO	M6	**3 FEU**	76% EUROPEO	H2a2a1
75 FAF	93% AFRICANO	L3e5	**12 AS**	76% EUROPEO	H1a9	**4 FEU**	70% EUROPEO	V3a
76 MAF	93% AFRICANO	L2c2	**16 AS**	70% EUROPEO	V3c	**5 FEU**	70% EUROPEO	V7a
77 MAF	93% AFRICANO	L1c1a2	**17 AS**	79% LATINO-AMERICANO	C4a2a1	**1 MEU**	76% EUROPEO	H27+16093
78 MAF	93% AFRICANO	L1c2	**18 AS**	79% LATINO-AMERICANO	C5a	**2 MEU**	44% EUROPEO	N1a1a
79 MAF	93% AFRICANO	L3b1a2	**19 AS**	81% ASIATICO	F4a1	**3 MEU**	76% EUROPEO	H2a1
80 MAF	93% AFRICANO	L3e1b1	**20 AS**	64% EUROPEO	U5b1i	**4 MEU**	64% EUROPEO	U5b1b
			1 AS/EU	59% ASIATICO	M6	**5 MEU**	76% EUROPEO	H13a2c

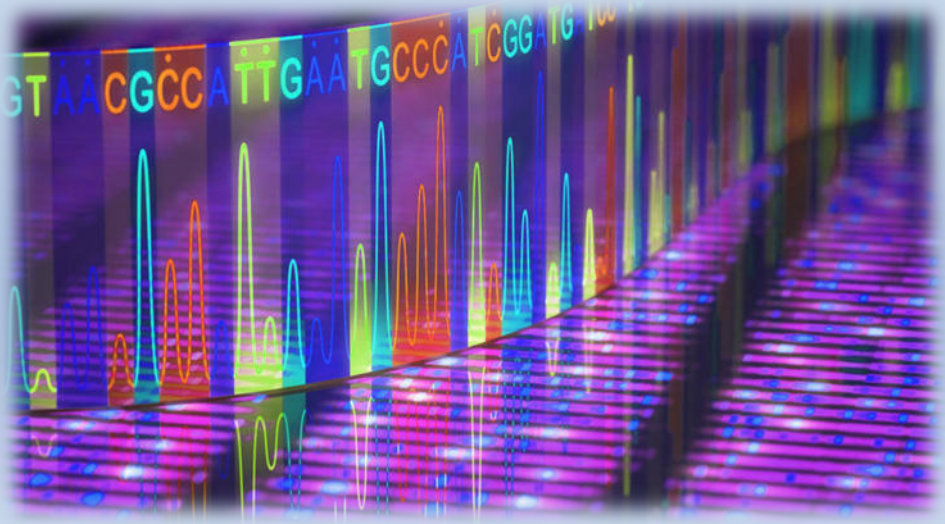
SINOSSI DEI RISULTATI

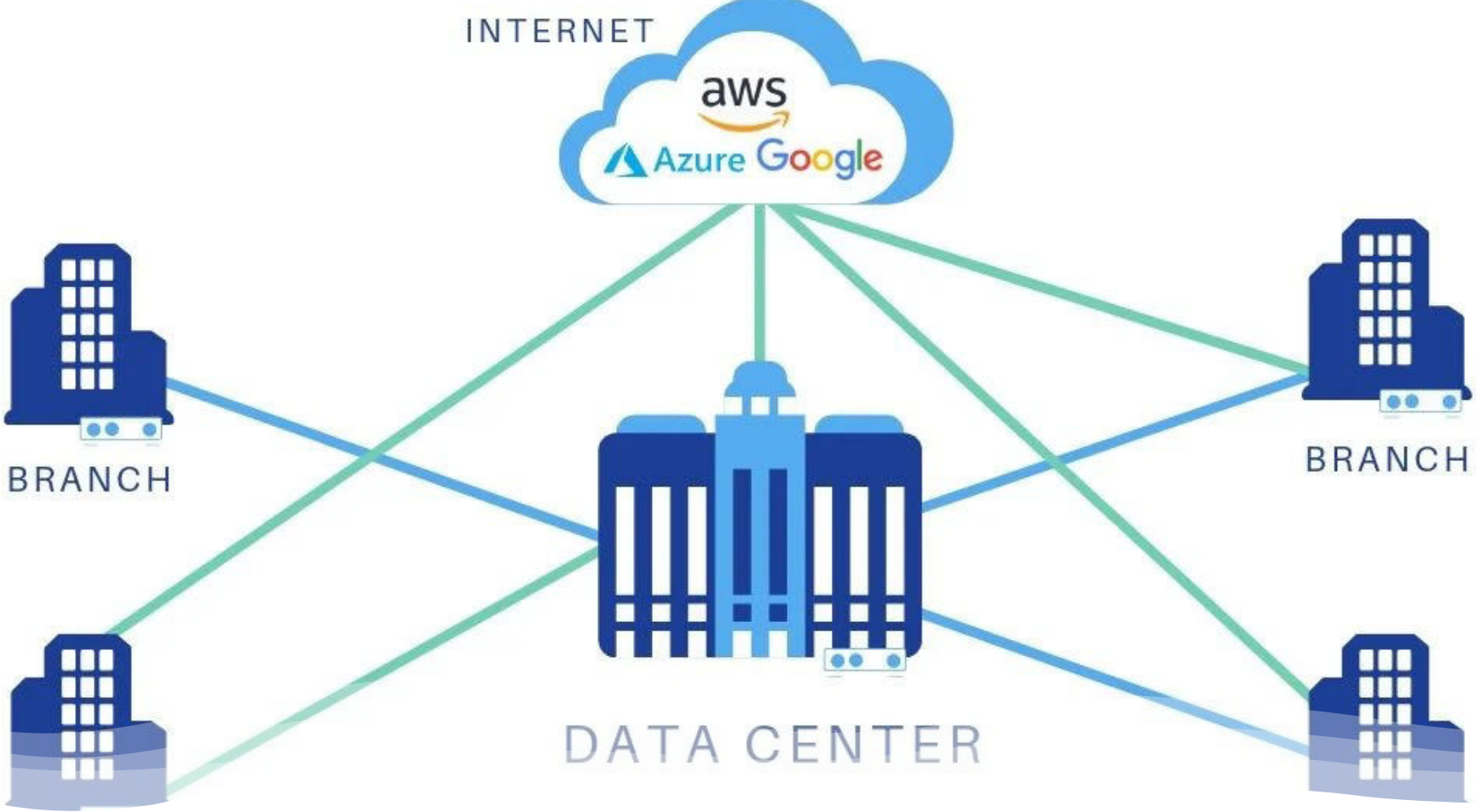
CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITÀ NGS	ANCESTRALITÀ Y	ANCESTRALITÀ mtDNA	CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITÀ NGS	ANCESTRALITÀ Y	ANCESTRALITÀ mtDNA	CODICE CAMPIONE	ANCESTRALITÀ NGS	ANCESTRALITÀ Y	ANCESTRALITÀ mtDNA
72 FAF	AFRICANA	64,86% AFRICANA	79% LATINO-AMERICANA	1 AS	75% Asia 15% Europa- 10% America	/	79% LATINO-AMERICANA	1 FEU	85% EUROPA – 15% MEDIO-ORIENTE	/	84% EUROPEA
73 FAF	AFRICANA	77,78% AFRICANA	93% AFRICANA	7 AS	ASIATICA	/	76% EUROPEA	2 FEU	35% EUROPA – 65& MEDIO-ORIENTE	/	76% EUROPEA
74 FAF	AFRICANA	100% AFRICANA	93% AFRICANA	8 AS	65% ASIA 5% EUROPA 30% AMERICA	/	59% ASIATICA	3 FEU	60% EUROPA – 35% MEDIO-ORIENTE – 5% AFRICA	/	76% EUROPEA
75 FAF	AFRICANA	100% AFRICANA	93% AFRICANA	12 AS	55% ASIA 40% EUROPA – 5% AMERICA	/	76% EUROPEA	4 FEU	65% EUROPA – 35% MEDIO-ORIENTE	/	70% EUROPEA
76 FAF	AFRICANA	93,75% AFRICANA	/	14 AS	55% ASIA 40% EUROPA – 5% AMERICA	/	/	5 FEU	100% EUROPA	/	70% EUROPEA
76 MAF	AFRICANA	98,28% AFRICANA	93% AFRICANA	16 AS	75% ASIA 15% EUROPA 10% AMERICA	/	70% EUROPEA	1 MEU	75% EUROPA – 25% MEDIO-ORIENTE	75% EUROPEA	76% EUROPEA
77 MAF	AFRICANA	100% AFRICANA	93% AFRICANA	17 AS	85% ASIA 5% EUROPA 10% AMERICA	/	79% LATINO-AMERICANA	2 MEU	65% EUROPA – 35% MEDIO-ORIENTE	84,09% EUROPEA	44% EUROPEA
78 MAF	AFRICANA	/	93% AFRICANA	18 AS	ASIATICA	90,70% ASIATICA	79% ASIATICA	3 MEU	60% EUROPA – 40% MEDIO-ORIENTE	93,33% EUROPEA	76% EUROPEA
79 MAF	AFRICANA	100% AFRICANA	93% AFRICANA	19 AS	45% ASIA 30% EUROPA 5% AFRICA 20% AMERICA	/	81% ASIATICA	4 MEU	30% EUROPA – 70% MEDIO-ORIENTE	50% EUROPEA	64% EUROPEA
80 MAF	AFRICANA	90,16% AFRICANA	93% AFRICANA	20 AS	70% ASIA 25% EUROPA 5% AMERICA	/	64% ASIATICA	5 MEU	65% EUROPA – 30% MEDIO-ORIENTE – 5% OCEANIA	44,44% EUROPEA	76% EUROPEA




Cost per Human Genome
$100,000,000
$10,000,000
$1,000,000
$100,000
$10,000
$1,000
$100
Moore's Law
NIH
National Human Genome
Research Institute
genome.gov/sequencingcosts
2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021


Civile Routine
Penale Routine
Civile casi complessi
Penale casi complessi


GTAACGCCATTGAATGCCCATCGG


INTERNET
aws
Azure Google
BRANCH
BRANCH
DATA CENTER

genes

MDPI

Article

NIPAT as Non-Invasive Prenatal Paternity Testing Using a Panel of 861 SNVs

Riccardo Giannico [1], Luca Forlani [1], Valentina Andrioletti [1], Ettore Cotroneo [1], Andrea Termine [2], Carlo Fabrizio [2], Raffaella Cascella [3,4], Luca Salvaderi [1], Pasquale Linarello [1], Debora Varrone [1], Laura Gigante [1] and Emiliano Giardina [3,5,*]

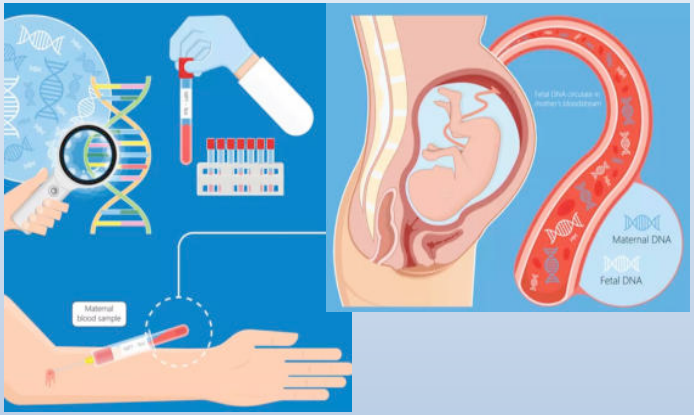
[1] Eurofins Genoma Group, 00138 Rome, Italy
[2] Data Science Unit, Santa Lucia Foundation IRCCS, 00179 Rome, Italy
[3] Department of Biomedicine and Prevention, Tor Vergata University, 00133 Rome, Italy
[4] Department of Biomedical Sciences, Catholic University Our Lady of Good Counsel, 1000 Tirana, Albania
[5] Genomic Medicine Laboratory-UILDM, Santa Lucia Foundation IRCCS, 00179 Rome, Italy
* Correspondence: emiliano.giardina@uniroma2.it

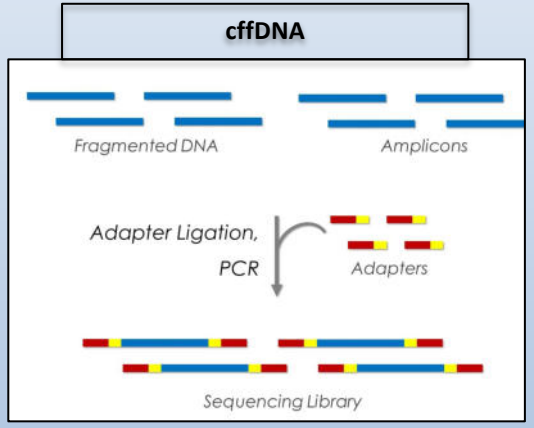
Abstract: In 1997, it was discovered that maternal plasma contains Cell-Free Fetal DNA (cffDNA). cffDNA has been investigated as a source of DNA for non-invasive prenatal testing for fetal pathologies, as well as for non-invasive paternity testing. While the advent of Next Generation Sequencing (NGS) led to the routine use of Non-Invasive Prenatal Screening (NIPT or NIPS), few data are available regarding the reliability and reproducibility of Non-Invasive Prenatal Paternity Testing (NIPPT or NIPAT). Here, we present a non-invasive prenatal paternity test (NIPAT) analyzing 861 Single Nucleotide Variants (SNV) from cffDNA through NGS technology. The test, validated on more than 900 meiosis samples, generated log(CPI)(Combined Paternity Index) values for designated fathers ranging from +34 to +85, whereas log(CPI) values calculated for unrelated individuals were below −150. This study suggests that NIPAT can be used with high accuracy in real cases.

TOR VERGATA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

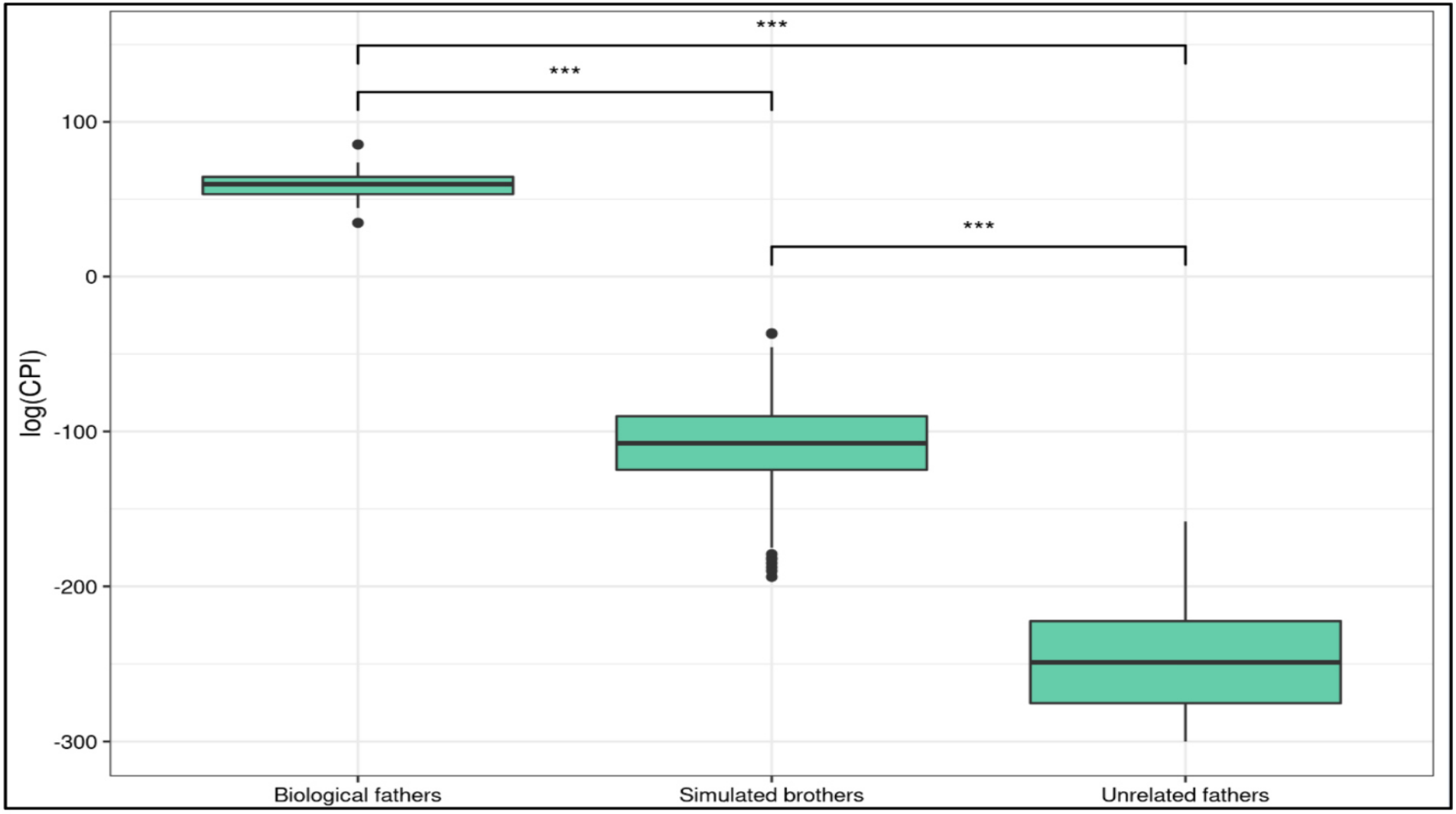
eurofins | Genoma

NIPAT: non-invasive prenatal paternity test



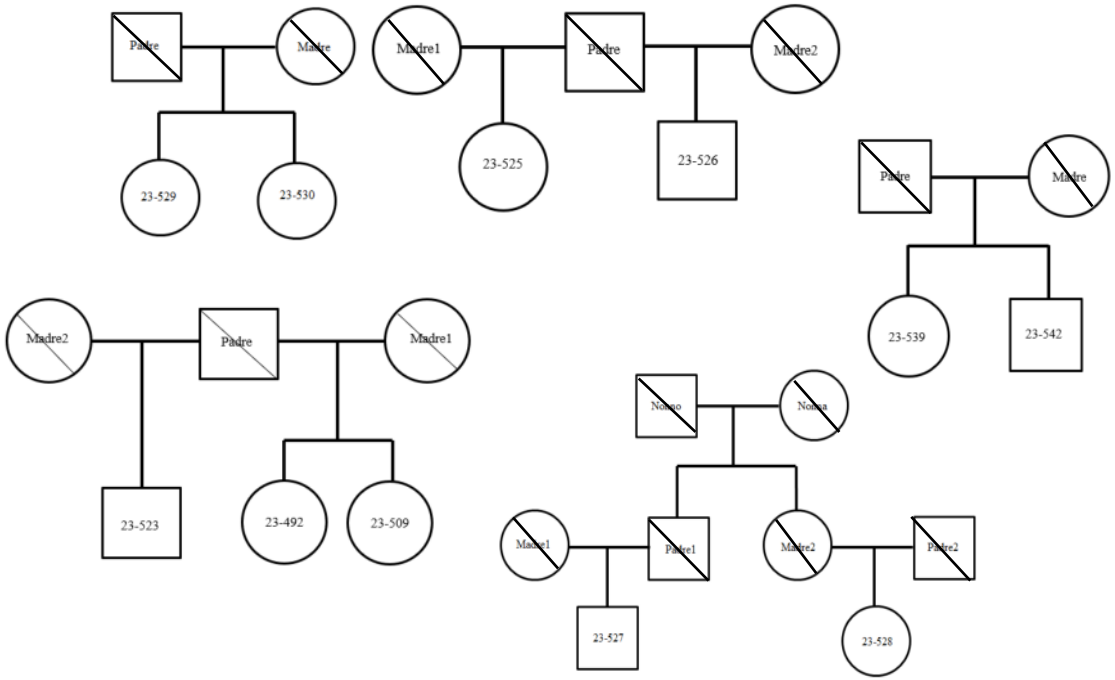


L’analisi NGS prevede lo studio di 861 marcatori biallalelici con una MAF (Minor Allele Frequency) del 50%


***
***
***
100
0
-100
-200
-300
log(CPI)
Biological fathers
Simulated brothers
Unrelated fathers

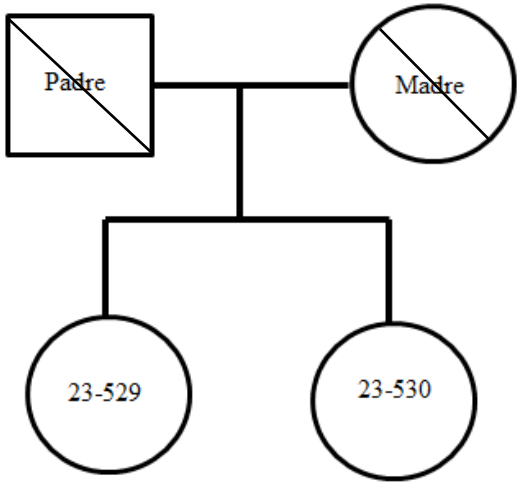
La nostra esperienza su casi complessi

CODICE CAMPIONE UNIVOCO
23-529
23-530
23-525
23-526
23-509
23-492
23-527
23-528



1° CASO

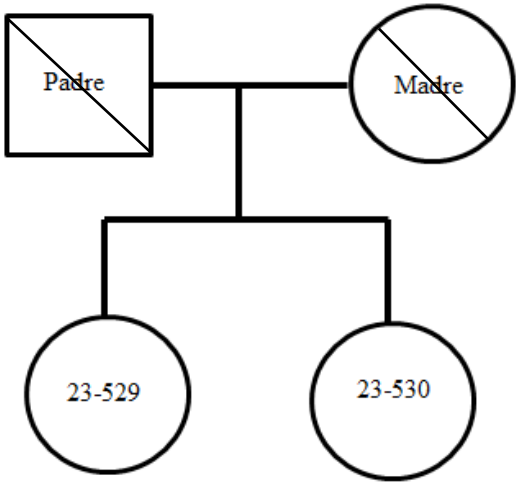
Quesito: 23-529 e 23-530 condividono entrambi i genitori?



LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
2,74e1	**96,47590434%**

1° CASO

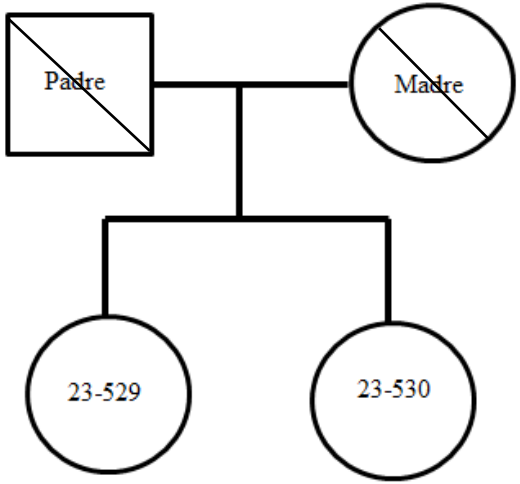
Quesito: 23-529 e 23-530 condividono entrambi i genitori?



LR (calcolato a partire da genotipi SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs)
8,93e35	**99,99999999%**

1° CASO

Quesito: 23-529 e 23-530 condividono entrambi i genitori?



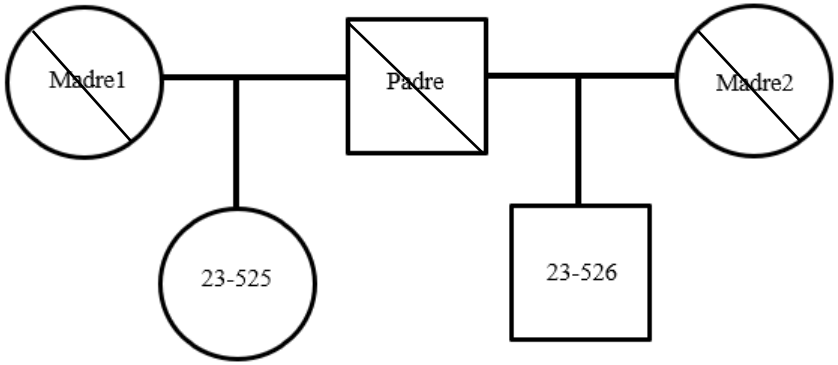
LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
2,74e1	96,47590434%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs)
8,93e35	99,99999999%

LR (calcolato a partire da genotipi STR + SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR + SNPs)
2,45e37	99,99999999%

2° CASO

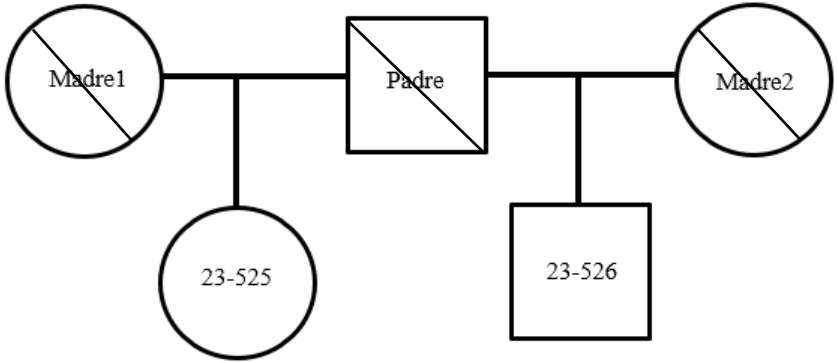
Quesito: 23-525 e 23-526 condividono il padre?



LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
4,84e1	**97,9763963%**

2° CASO

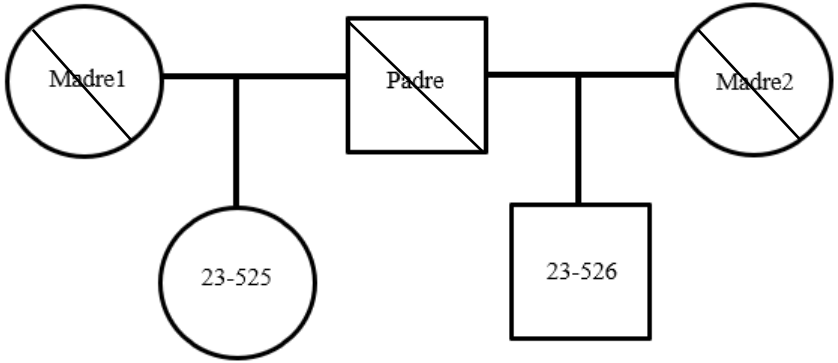
Quesito: 23-525 e 23-526 condividono il padre?



LR (calcolato a partire da genotipi SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs)
4,38e18	**99,99999999%**

2° CASO

Quesito: 23-525 e 23-526 condividono il padre?



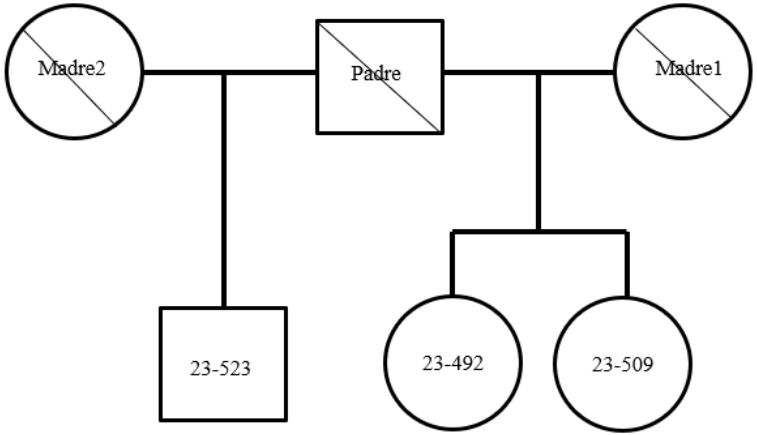
LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
4,84e1	97,9763963%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs)
4,38e18	99,99999999%

LR (calcolato a partire da genotipi STR + SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR + SNPs)
2,12e20	99,99999999%

3° CASO

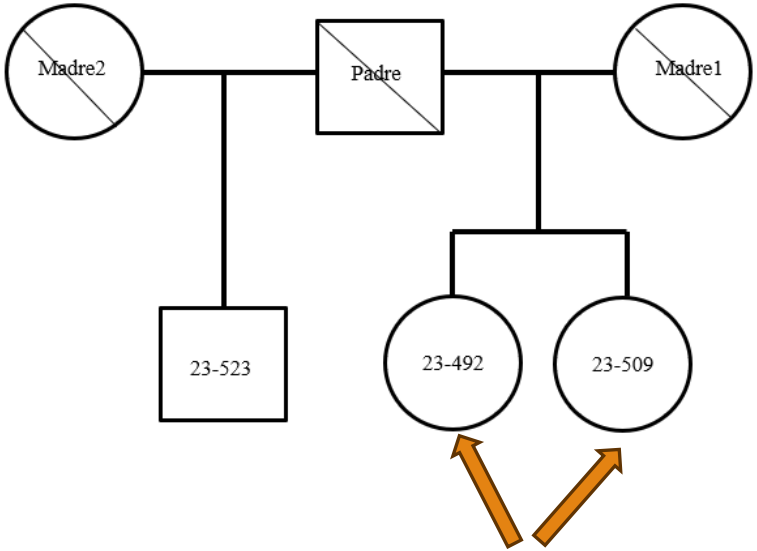
Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?



3° CASO

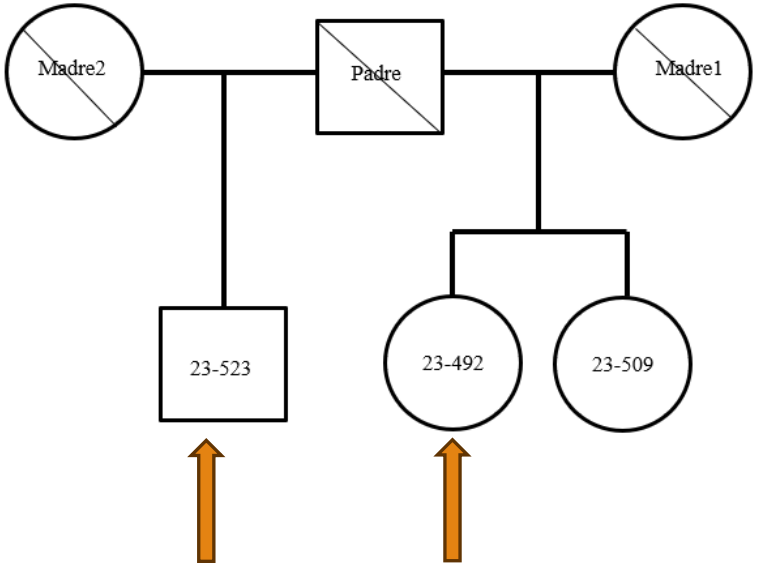
Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?

LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509
1,26e1	92,63878378%



3° CASO

Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?

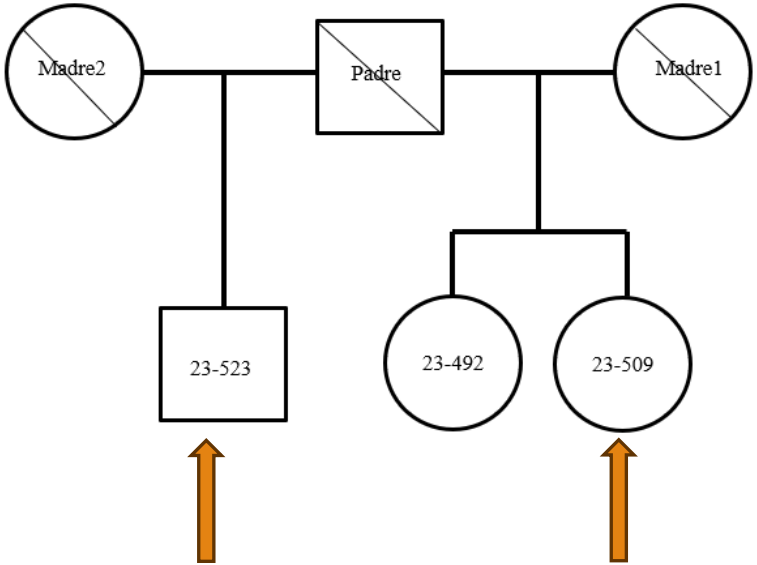


LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509
1,26e1	92,63878378%

LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-523
8,15	89,07544147%

3° CASO

Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?



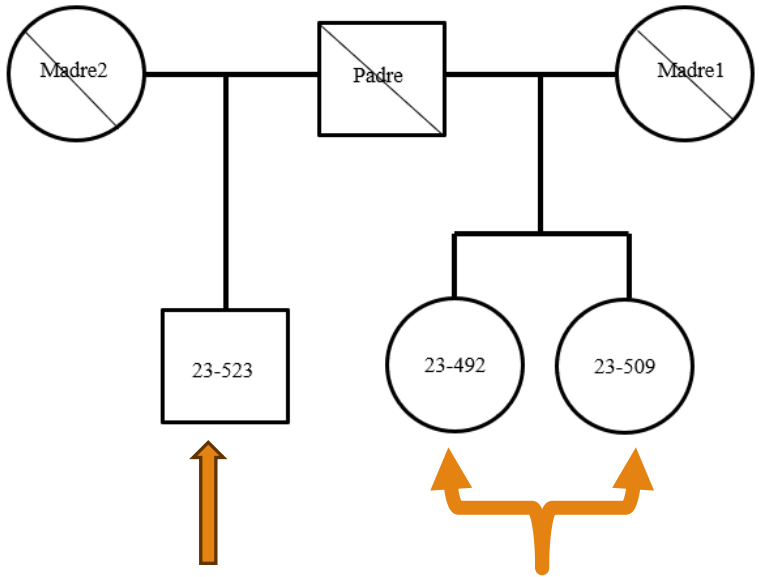
LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509
1,26e1	92,63878378%

LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-523
8,15	89,07544147%

LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-509 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-509 – 23-523
1,21e-1	10,77134298%

3° CASO

Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?



LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509
1,26e1	92,63878378%

LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-523
8,15	89,07544147%

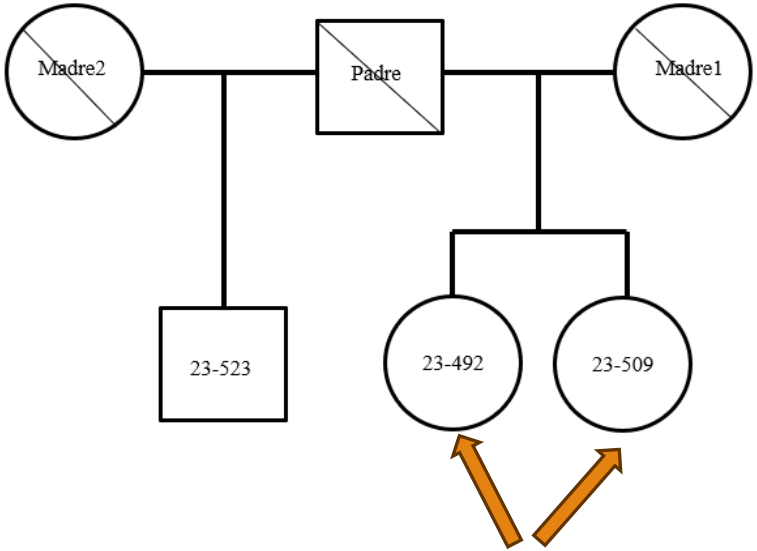
LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-509 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-509 – 23-523
1,21e-1	10,77134298%

LR (calcolato a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR) 23-492 – 23-509 – 23-523
2,45e1	96,07491637%

3° CASO

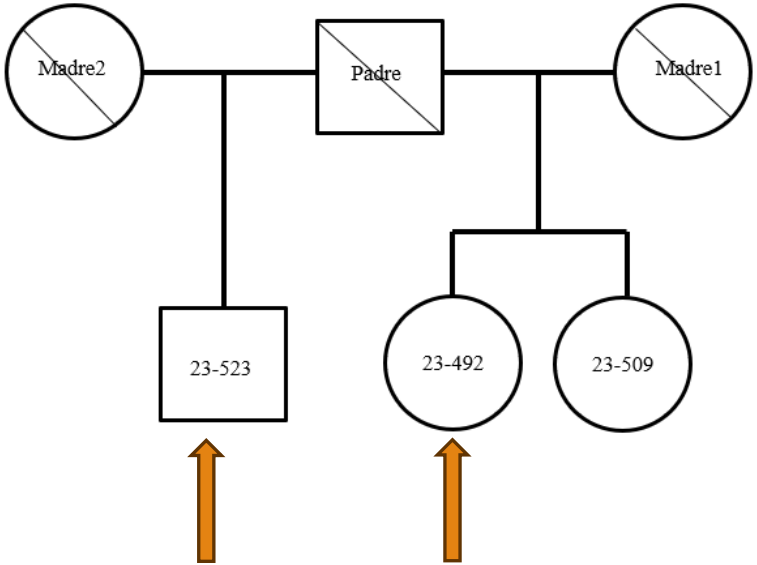
Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509
4,22e84	>99,99999999%



3° CASO

Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?

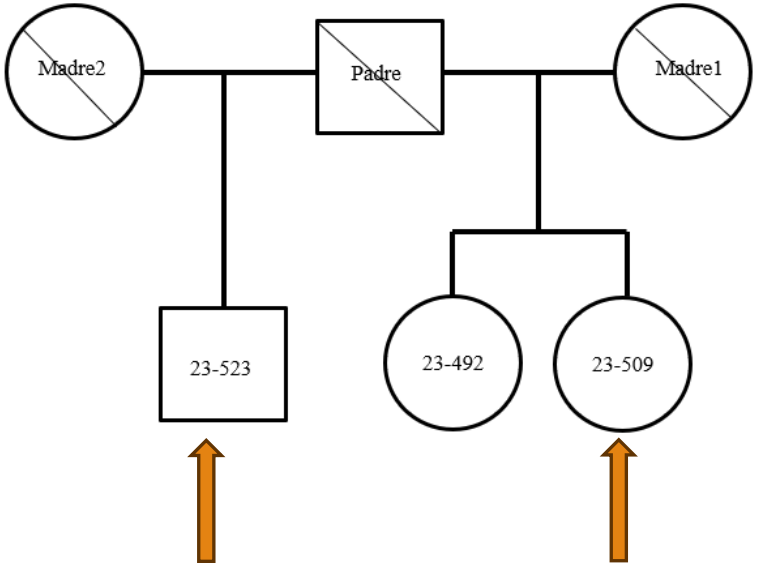


LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509
4,22e84	>99,99999999%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-523
1,25e7	99,999992%

3° CASO

Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?



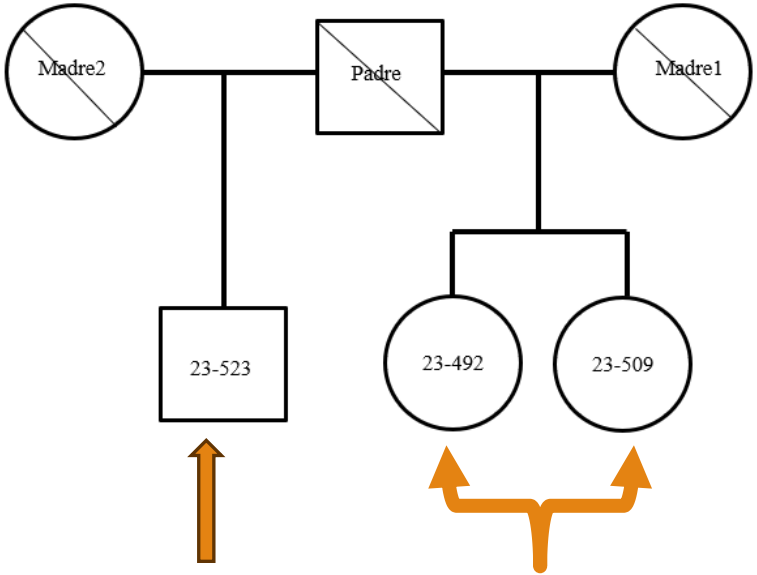
LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509
4,22e84	>99,99999999%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-523
1,25e7	99,999992%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-509 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-509 – 23-523
1,01e8	99,99999901%

3° CASO

Quesito: 23-523 condivide il padre con 23-492 e 23-509?



LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509
4,22e84	>99,99999999%

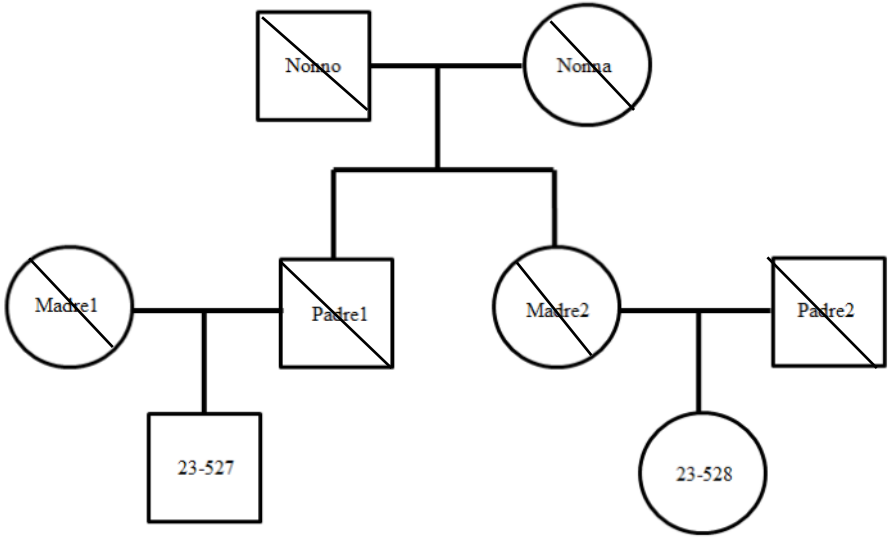
LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-523
1,25e7	99,999992%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-509 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-509 – 23-523
1,01e8	99,99999901%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509 – 23-523	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs) 23-492 – 23-509 – 23-523
4,60e10	99,99999999%

4° CASO

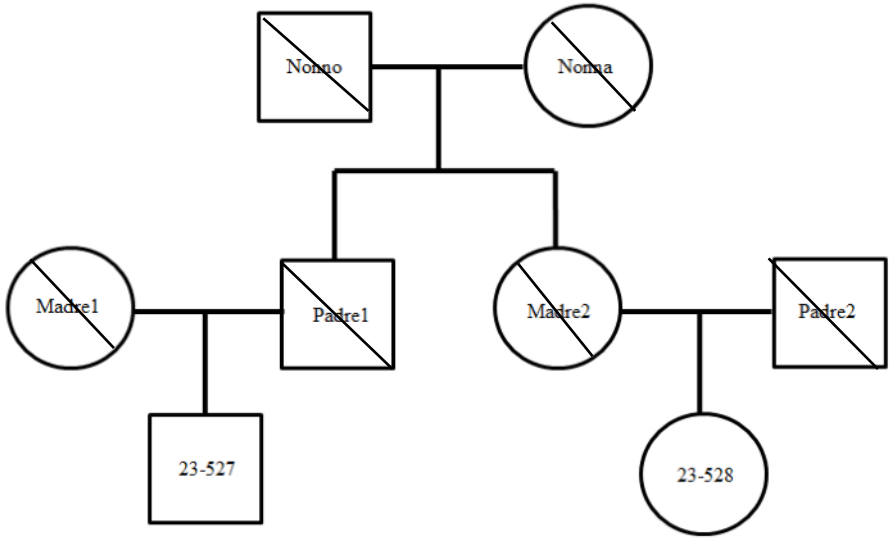
Quesito: 23-527 e 23-528 sono figli di due fratelli?



LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
2,28	69,51180351%

4° CASO

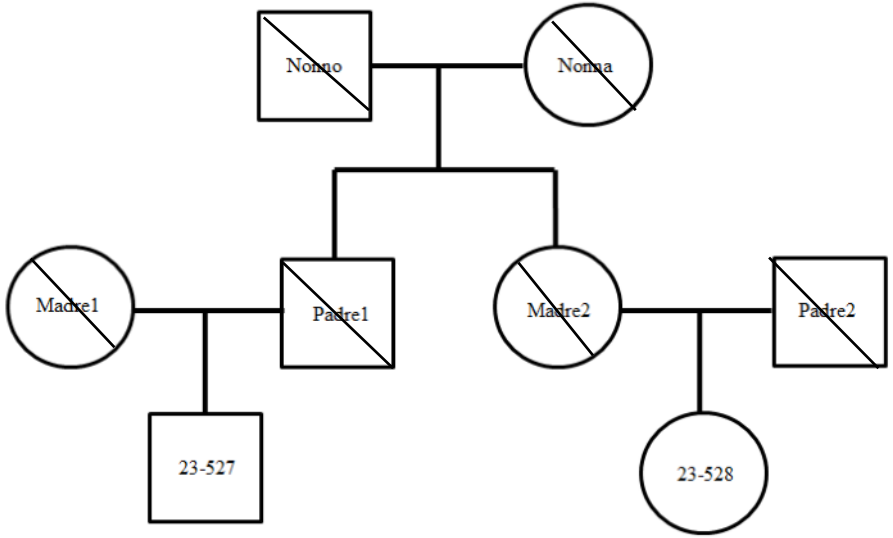
Quesito: il padre di 23-527 e la madre di 23-528 condividono entrambi i genitori?



LR (calcolato a partire da genotipi SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs)
8,22e8	**99,99999988%**

4° CASO

Quesito: il padre di 23-527 e la madre di 23-528 condividono entrambi i genitori?



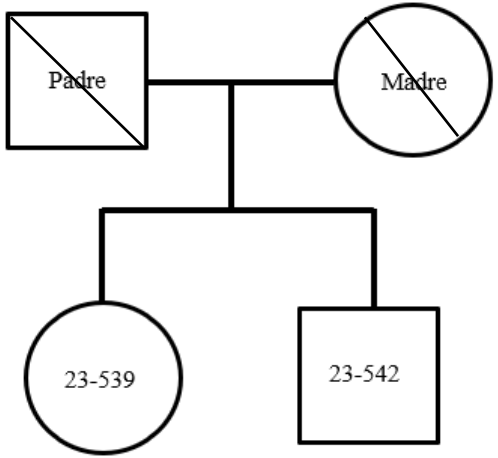
LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
2,28	69,51180351%

LR (calcolato a partire da genotipi SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi SNPs)
8,22e8	99,99999988%

LR (calcolato a partire da genotipi STR + SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR + SNPs)
1,86e12	99,99999999%

5° CASO

Quesito 1: 23-539 e 23-542 condividono entrambi i genitori?



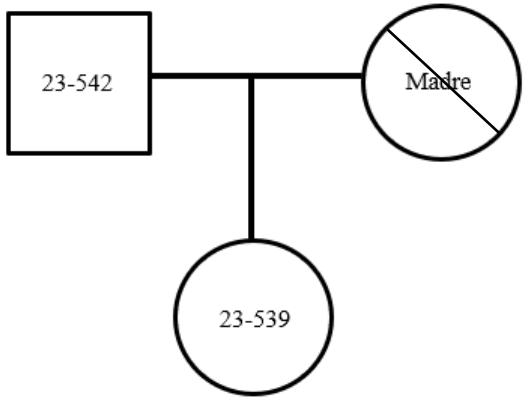
LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
9,89e10	**99,99999999%**

N.B. 23-539 e 23-542 sono emicompatibili, quindi…

Marcatore	23-539		23-542	
D3S1358	14	15	14	16
vWA	17	17	17	17
D16S539	9	14	9	14
CSF1PO	12	12	10	12
TPOX	8	8	8	11
Yindel			2	
AMEL	X	X	X	Y
D8S1179	11	15	11	13
D21S11	31	31.2	31	31.2
D18S51	14	15	15	16
DYS391			10	
D2S441	10	14	14	14
D19S433	13	14	13	14
TH01	6	9	6	9
FGA	20	24	20	20
D22S1045	11	11	11	14
D5S818	11	14	10	11
D13S317	11	11	11	12
D7S820	11	12	11	11
SE33	18	32.2	18	32.2
D10S1248	13	14	13	14
D1S1656	15	17.3	12	17.3
D12S391	18	24	18	24
D2S1338	16	18	16	19

5° CASO

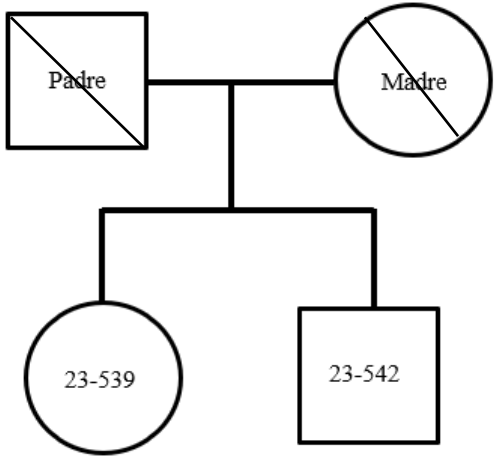
Quesito 2: 23-539 è figlia biologica di 23-542?



LR (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
3,39e10	**99,99999999%**

5° CASO

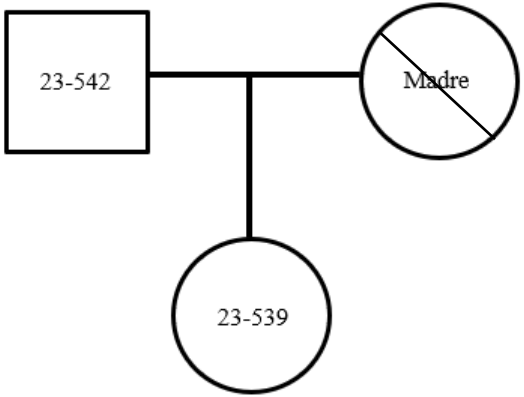
Quesito 1: Quesito: 23-539 e 23-542 condividono entrambi i genitori?



LR (calcolato a partire da genotipi STR + SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR + SNPs)
3,50e102	**99,99999999%**

5° CASO

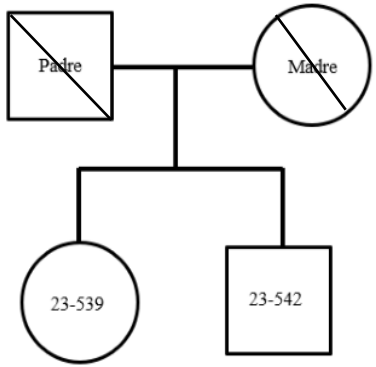
Quesito 2: 23-539 è figlia biologica di 23-542?

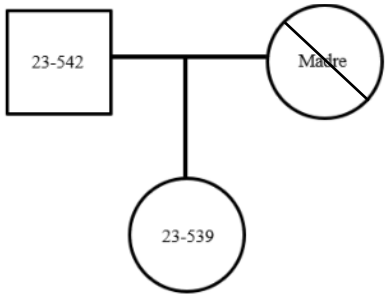


LR (calcolato a partire da genotipi STR + SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR + SNPs)
0	/

5° CASO

Quesito: 23-539 e 23-542 condividono entrambi i genitori? / 23-539 è figlia biologica di 23-542?



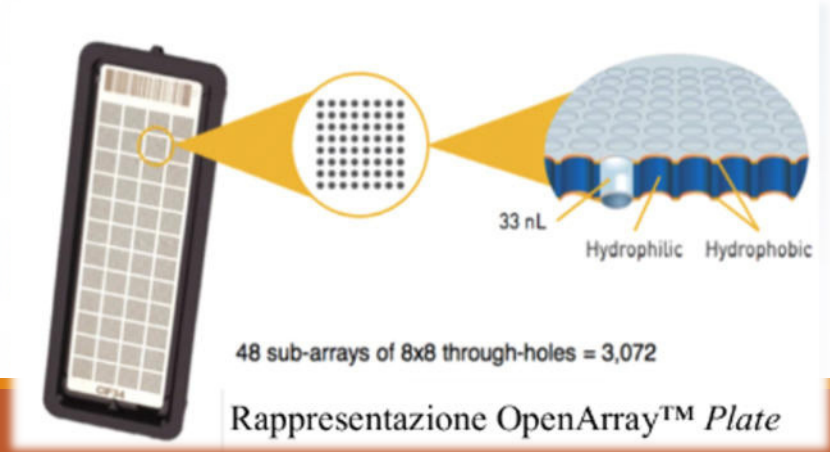


LR piena fratellanza/paternità (calcolato a partire da genotipi STR)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR)
2,92	74,48692874%

LR piena fratellanza/paternità (calcolato a partire da genotipi STR + SNPs)	Probabilità (calcolata a partire da genotipi STR + SNPs)
0	/

TECNOLOGIA OPENARRAY®

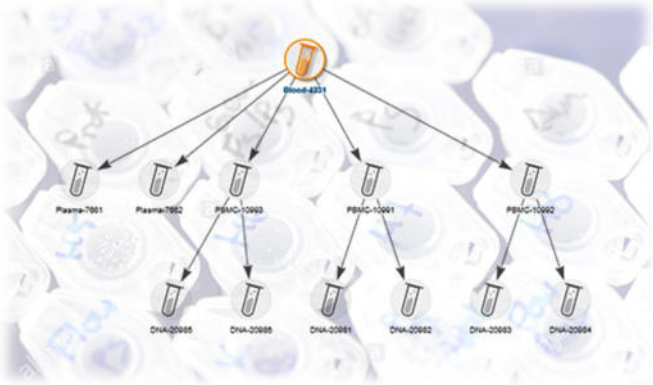
UN SISTEMA DI REAL-TIME PCR PER LA GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI CHE SFRUTTA LA CHIMICA DELLE SONDE TAQMAN



Rappresentazione OpenArray™ *Plate*

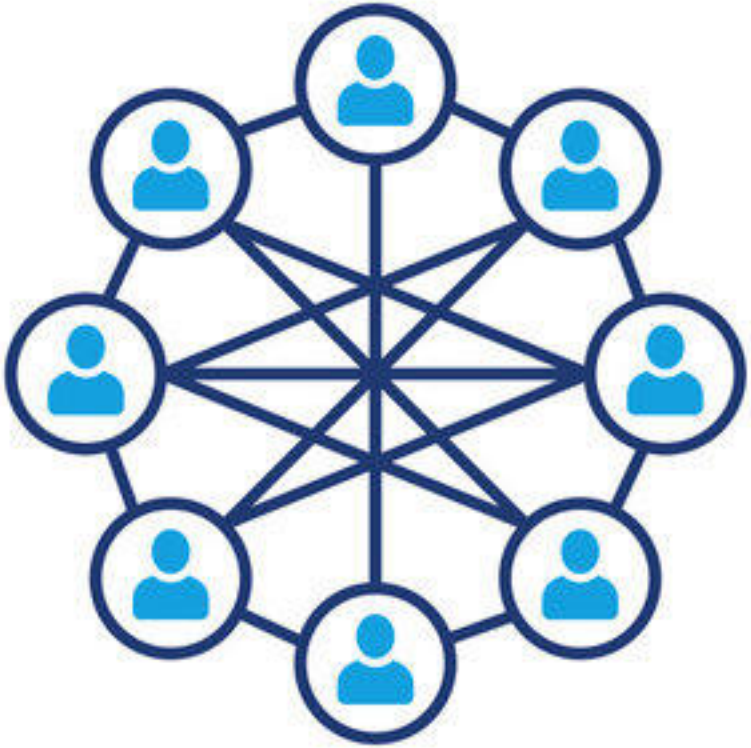
SELEZIONE DEGLI SNPs

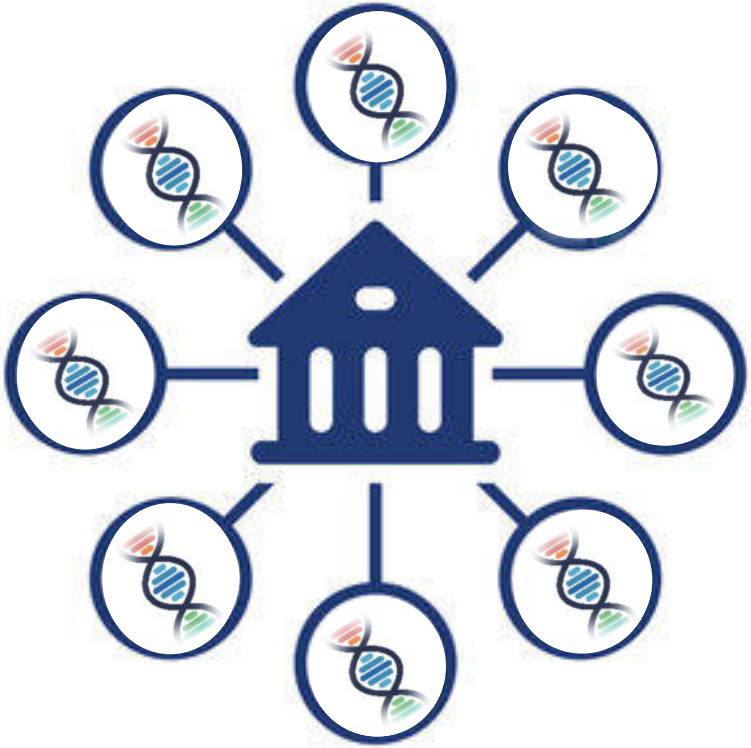
SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN PANNELLO COSTITUITO DA 60 SNPs PER LA TRACCIABILITA' DEI CAMPIONI BIOLOGICI



- *Minor Allele frequency* (MAF) >40%;
- Localizzazione esonica;
- Frequenze alleliche e genotipiche simili nelle varie popolazioni

RMP=9,92818*10^{-12}





RINGRAZIAMENTI

TOR VERGATA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

DOTT.SSA LAURA MANZO
DOTT. GIULIO PULERI
DOTT. SSA ADRIANA NAPOLETANO
DOTT.SSA VALENTINA GUADAGNO

eurofins | Genoma

DOTT. PASQUALE LINARELLO
DOTT. LUCA SALVADERI
DOTT. RICCARDO GIANNICO
DOTT. LUCA FORLANI
DOTT. FABIO DALLA POZZA
DOTT.SSA ROBERTA TARALLO

Il flusso informatico nel NGS

Dr. Paolo Vatta M.S.S.E.
Reparto PAN
Dipartimento Malattie Infettive
Istituto Superiore di Sanità

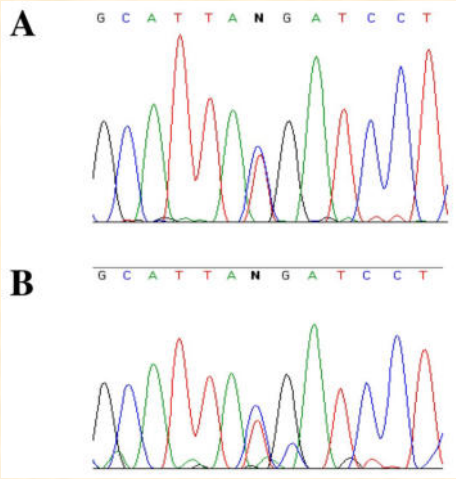
Struttura intervento

- Cos’è il Sequenziamento NGS
- Descrizione metodica NGS, generale
- Descrizione sistemi diversi (breve confronto)
- Output ottenuti da macchina (fasta, fastq) a BAM (de novo, o referenziato)
- descrizione SAM/BAM
- Descrizione analisi su SAM/BAM (Samtools, ecc)
- Variant calling (VCF) analisi delle variazioni fra campioni

Cos’è Next Generation Sequencing NGS?

- Metodi alternativi al classico sequenziamento «Sanger»
- Tutti basati sul concetto di base di frammentare casualmente il DNA in piccoli frammenti e loro «lettura»

1st gen «Sanger»

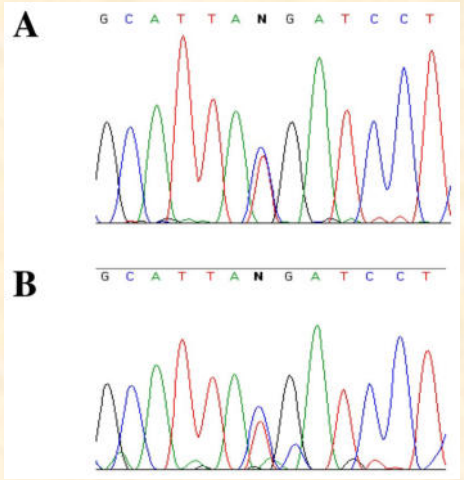


NGS

Cos’è Next Generation Sequencing NGS?

- Nel NGS siccome abbiamo un dato di tipo grezzo, c’è un incremento nelle necessità analitiche/bioinformatiche rispetto al Sanger

1st gen «Sanger»



NGS

Strumentazione per NGS può variare ma tutti producono **STESSE** sequenze fasta

Illumina HiSeq

Pacific Biosciences Revio

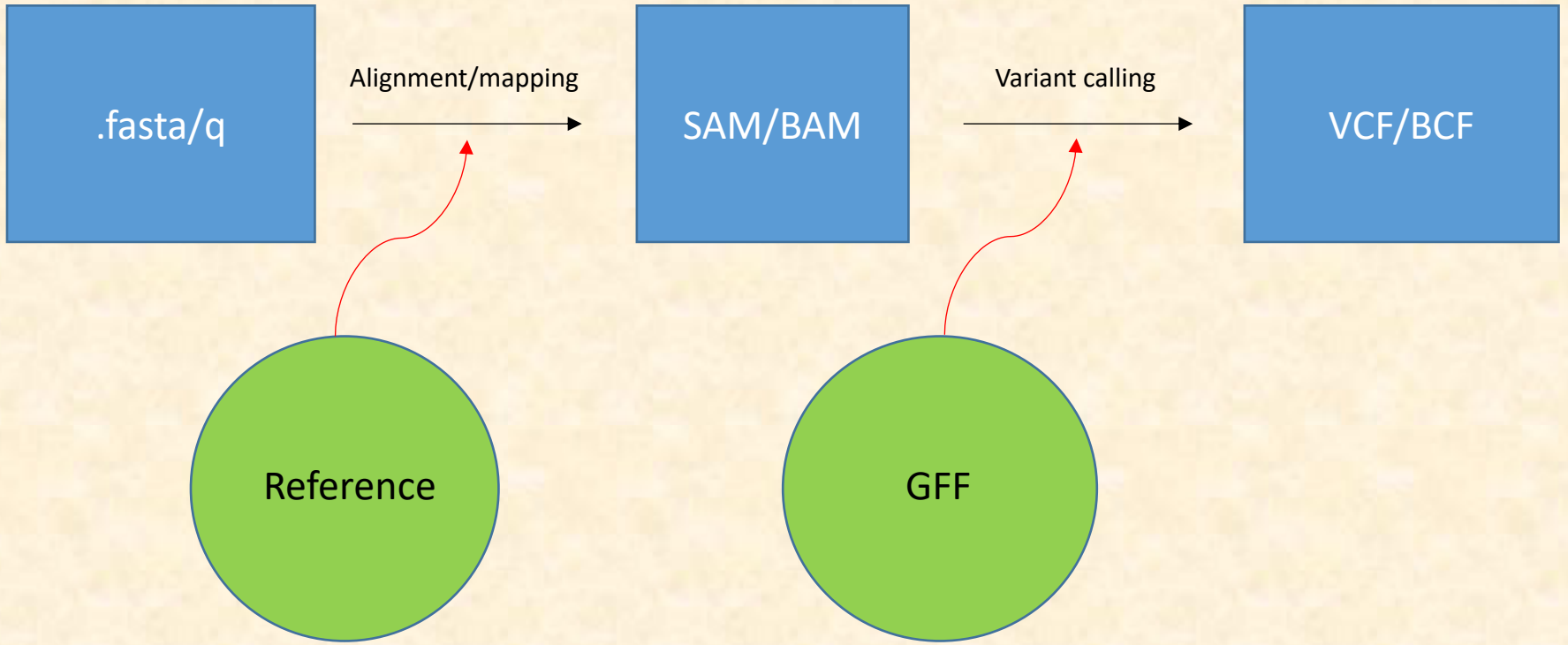
Ion Torrent

```
>yneN
TTAATGCCTCTTCTCATTTCTTCTGCTGTCATCCGCACAGCAGAAGAATTCCTCATTGAC
TATTATTTCGCAATTTGCTCACATGGATTAAATTAAACTACATACTATAAGATATAAACT
TCTGCCTACAGCTGTAAGAAACTCCGCTCAGTACTGAAGCACCAGTCCTATTTCCTCTTT
TCTCCAGCCTGTTATATTAAGCATACTGATTAACGATTTTTAACGTTATCCGCTAAATAA
ACATATTTGAAATGCATGCGACCACACAGTGAAAAACAAAATCACGCAAAGAGACAACTATA
A
>yegR
ACTAACGGCTGCCACCGATAAATTTCAAAAAAGAGCATATACCTAATATTCAACTAAACA
GTGGCATCTTCAATATAATATATTAAAGCCCCCATGGAGTTACCCTGAAGGGCCTCAATG
TCCGTAATTCCTACTTATGTAGGAAATGTTGTACAGAACATTTATTATAATCCTATTCAA
TTATAATAATCATGCCATTATTATATTTAAACACTAGAGAGTGTCGTTGGTATTTAATGG
GGGAAGGTGAGATGAAAAAGATAGCTGCTATATCATTAATTAGTATTTTTATTATGTCTG
G
>emrK
AAATCAGGGATTGTACCGATGATTTATAGTTTCAAGTTGGCACTATAAGTCTTCTTACTA
ATCCTACAGGCGTAAGAATTGTATTGCAAAAGCCACGGTTTAGTCCTCTGTTGTTTTTTT
TGCACCTCATTTAAATTAGGCCTCCAACGTTCCTGGGATAATGTGCAACACATGCACTGT
GTTTGATATGAAGAATGAATGCTCTTTTCATTCAATTCATAAATTTCATCTATGAGAAAT
GAGAGATAATAGTGGAACAGATTAATTCAAATAAAAAACATTCTAACAGAAGAAAATACT
T
>evgA
AATACAATTCTTACGCCTGTAGGATTAGTAAGAAGACTTATAGTGCCAACTTGAAACTAT
AAATCATCGGTACAATCCCTGATTTTATTGTTGACATTTCATTTATGCCGACTATTTATA
TGGTATACTTGTCGAATTATCTTAAAGGAAGCTCAGATTTTCTTATTTTTATTGAGAAAA
TGAGATGACGCCTTATGTCTGTATTACTACAGGGAGAAGGGAGATGCTTCATTGCAAAGG
GAATAATCTATGAACGCAATAATTATTGATGACCATCCTCTTGCTATCGCAGCAATTCGT
>yfdX
TGGCTGTATTTACATTTAATTAATCAGTATTTACATCGATATAATAAATGACATCTCTTT
GTGGTATATAAGAATAGTTCTCTGCGACAGGAAGCATATTCCTACAATTGTAAGACTAAA
ATACTTCTTGCGATAATAACTACAACTGTAAGATAACCCTTTCAAAATGACCGTTGCTCT
CTGATTTCTCATTTCATGCTCACCCAATATGATGGCGGCGTTTTCTAAAACTGTTAAAGA
ATGAGGTAAGTATGAAACGTTTAATTATGGCCACGATGGTCACAGCAATTCTGGCATCTT
C
```

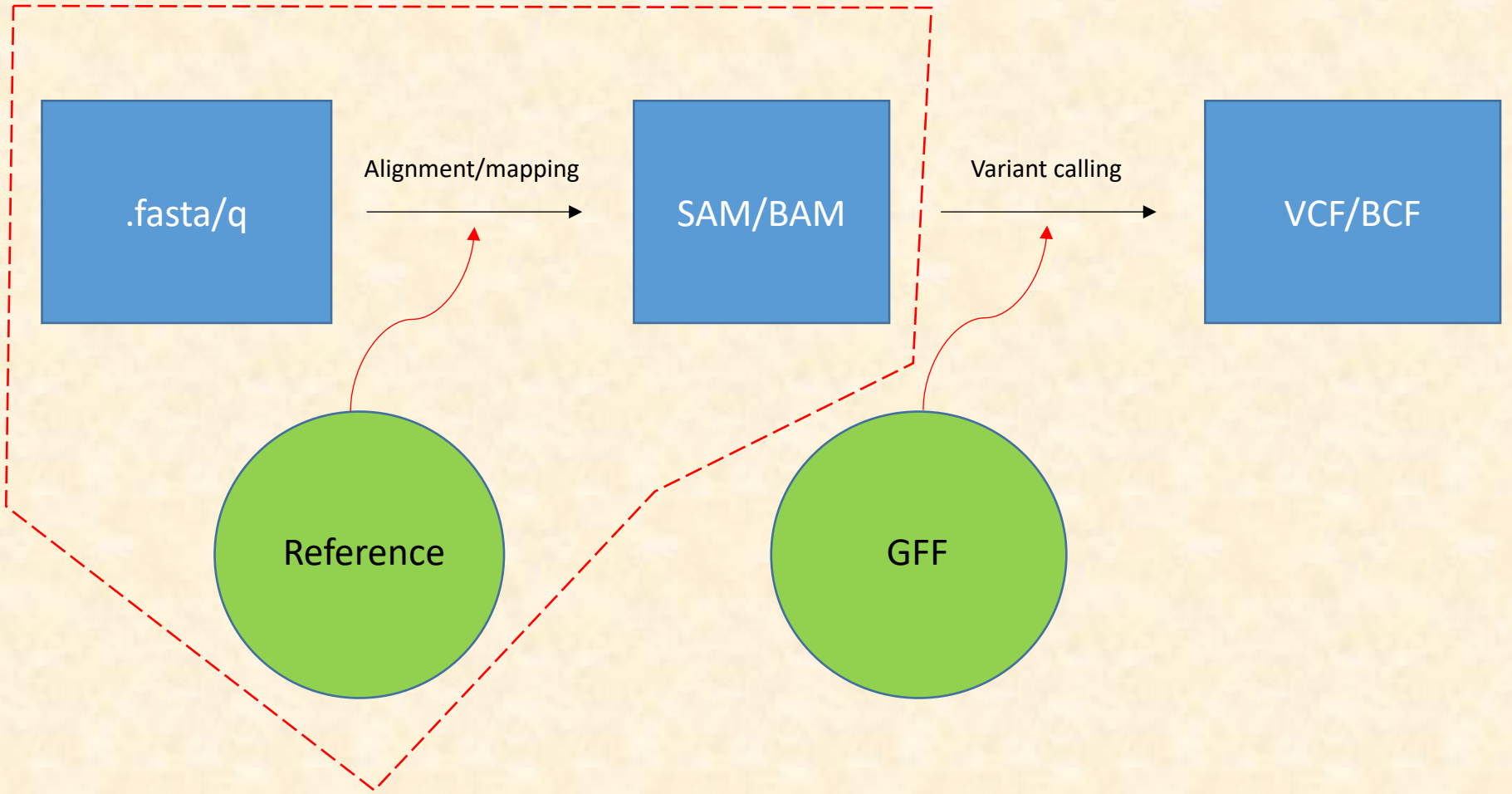
Come estrarre significato biologico dai dati NGS?

>yneN
TTAATGCCTCTTCTCATTTCTTCTGCTGTCATCCGCACAGCAGAAGAATTCCTCATTGAC
TATTATTTCGCAATTTGCTCACATGGATTAAATTAAACTACATACTATAAGATATAAACT
TCTGCCTACAGCTGTAAGAAACTCCGCTCAGTACTGAAGCACCAGTCCTATTTCCTCTTT
TCTCCAGCCTGTTATATTAAGCATACTGATTAACGATTTTTAACGTTATCCGCTAAATAA
ACATATTTGAAATGCATGCGACCACAGTGAAAAACAAAATCACGCAAAGAGACAACTATA
A
>yegR
ACTAACGGCTGCCACCGATAAATTTCAAAAAAGAGCATATACCTAATATTCAACTAAACA
GTGGCATCTTCAATATAATATATTAAAGCCCCCATGGAGTTACCCTGAAGGGCCTCAATG
TCCGTAATTCCTACTTATGTAGGAAATGTTGTACAGAACATTTATTATAATCCTATTCAA
TTATAATAATCATGCCATTATTATATTTAAACACTAGAGAGTGTCGTTGGTATTTAATGG
GGGAAGGTGAGATGAAAAAGATAGCTGCTATATCATTAATTAGTATTTTTATTATGTCTG
G
>emrK
AAATCAGGGATTGTACCGATGATTTATAGTTTCAAGTTGGCACTATAAGTCTTCTTACTA
ATCCTACAGGCGTAAGAATTGTATTGCAAAAGCCACGGTTTAGTCCTCTGTTGTTTTTTT
TGCACCTCATTTAAATTAGGCCTCCAACGTTCCTGGGATAATGTGCAACACATGCACTGT
GTTTGATATGAAGAATGAATGCTCTTTTCATTCAATTCATAAATTTCATCTATGAGAAAT
GAGAGATAATAGTGGAACAGATTAATTCAAATAAAAAACATTCTAACAGAAGAAAATACT
T
>evgA
AATACAATTCTTACGCCTGTAGGATTAGTAAGAAGACTTATAGTGCCAACTTGAAACTAT
AAATCATCGGTACAATCCCTGATTTTATTGTTGACATTTCATTTATGCCGACTATTTATA
TGGTATACTTGTCGAATTATCTTAAAGGAAGCTCAGATTTTCTTATTTTTATTGAGAAAA
TGAGATGACGCCTTATGTCTGTATTACTACAGGGAGAAGGGAGATGCTTCATTGCAAAGG
GAATAATCTATGAACGCAATAATTATTGATGACCATCCTCTTGCTATCGCAGCAATTCGT
>yfdX
TGGCTGTATTTACATTTAATTAATCAGTATTTACATCGATATAATAAATGACATCTCTTT
GTGGTATATAAGAATAGTTCTCTGCGACAGGAAGCATATTCCTACAATTGTAAGACTAAA
ATACTTCTTGCGATAATAACTACAACTGTAAGATAACCCTTTCAAAATGACCGTTGCTCT
CTGATTTCTCATTTCATGCTCACCCAATATGATGGCGGCGTTTTCTAAAACTGTTAAAGA
ATGAGGTAAGTATGAAACGTTTAATTATGGCCACGATGGTCACAGCAATTCTGGCATCTT
C

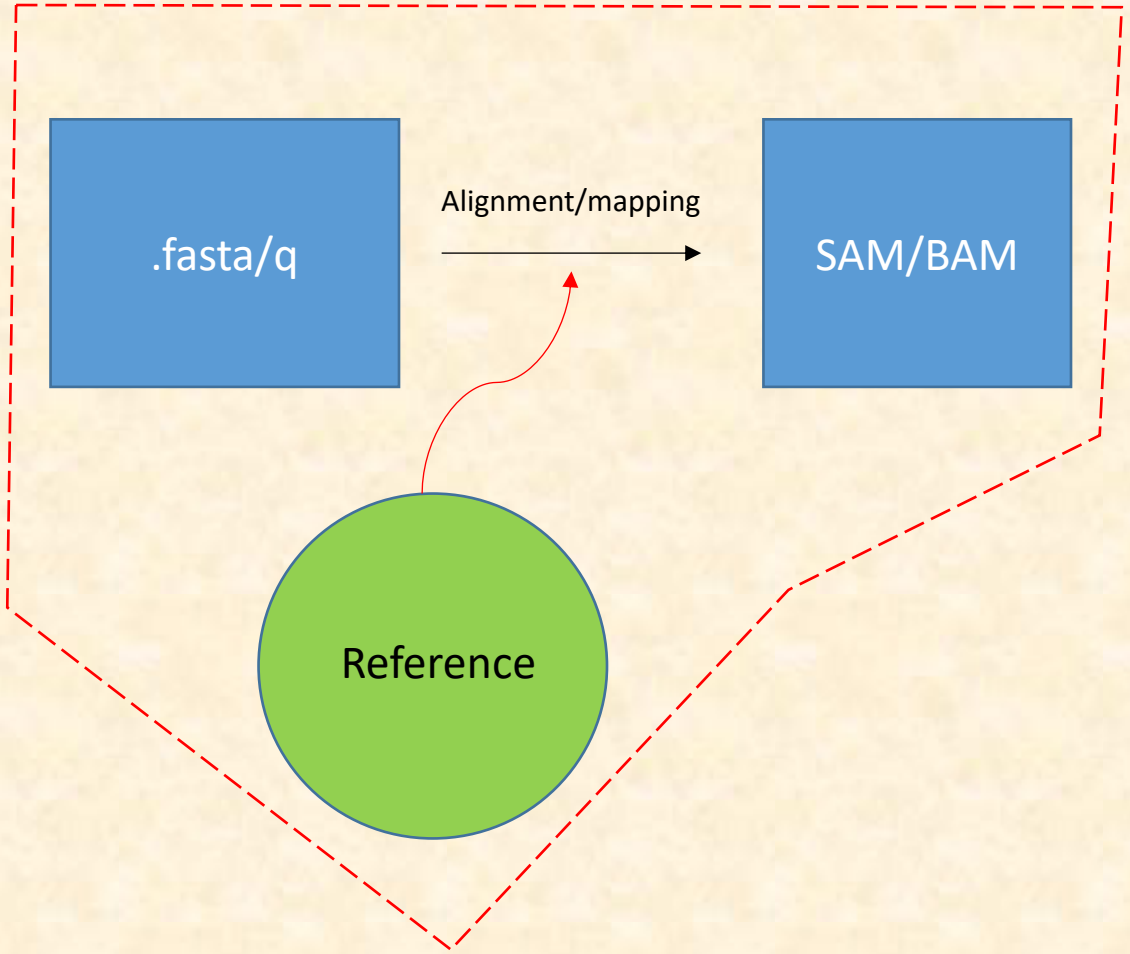
Schema analisi

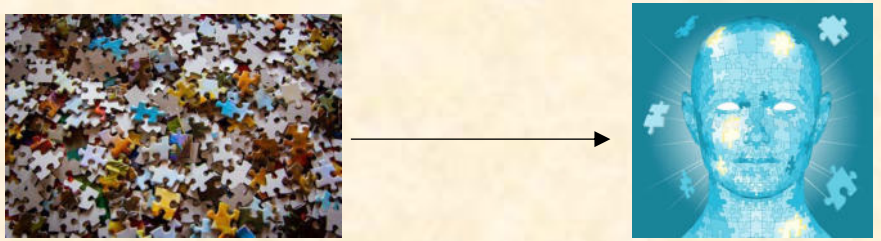


Allineamento/mappatura



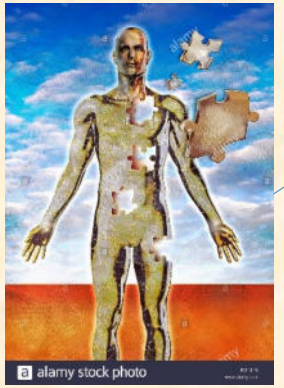
Allineamento e mappaggio (SAM) equivale alla ricostruzione dell'immagine





Algoritmi allineatori e mappatori

15 milioni



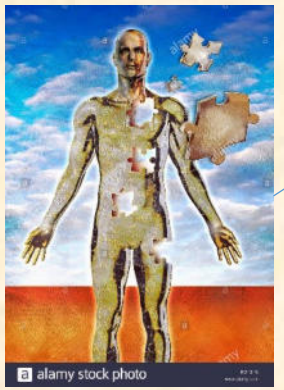
BLAST

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(0.1 sec per seq)

Algoritmi allineatori e mappatori

15 milioni



BLAST

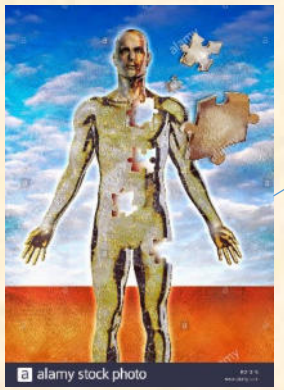
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(0.1 sec per seq)

17 giorni circa!!

Algoritmi allineatori e mappatori

15 milioni



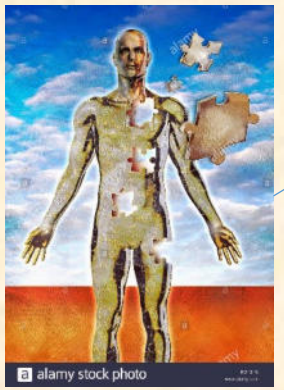
BLAST

(0.1 s[illegible] seq)

17 giorni circa!!

Algoritmi allineatori e mappatori

15 milioni

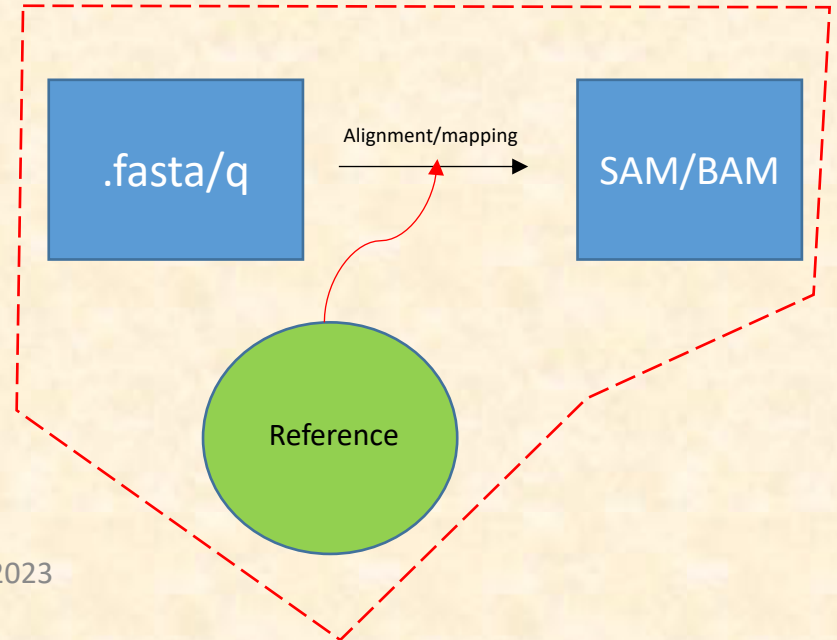


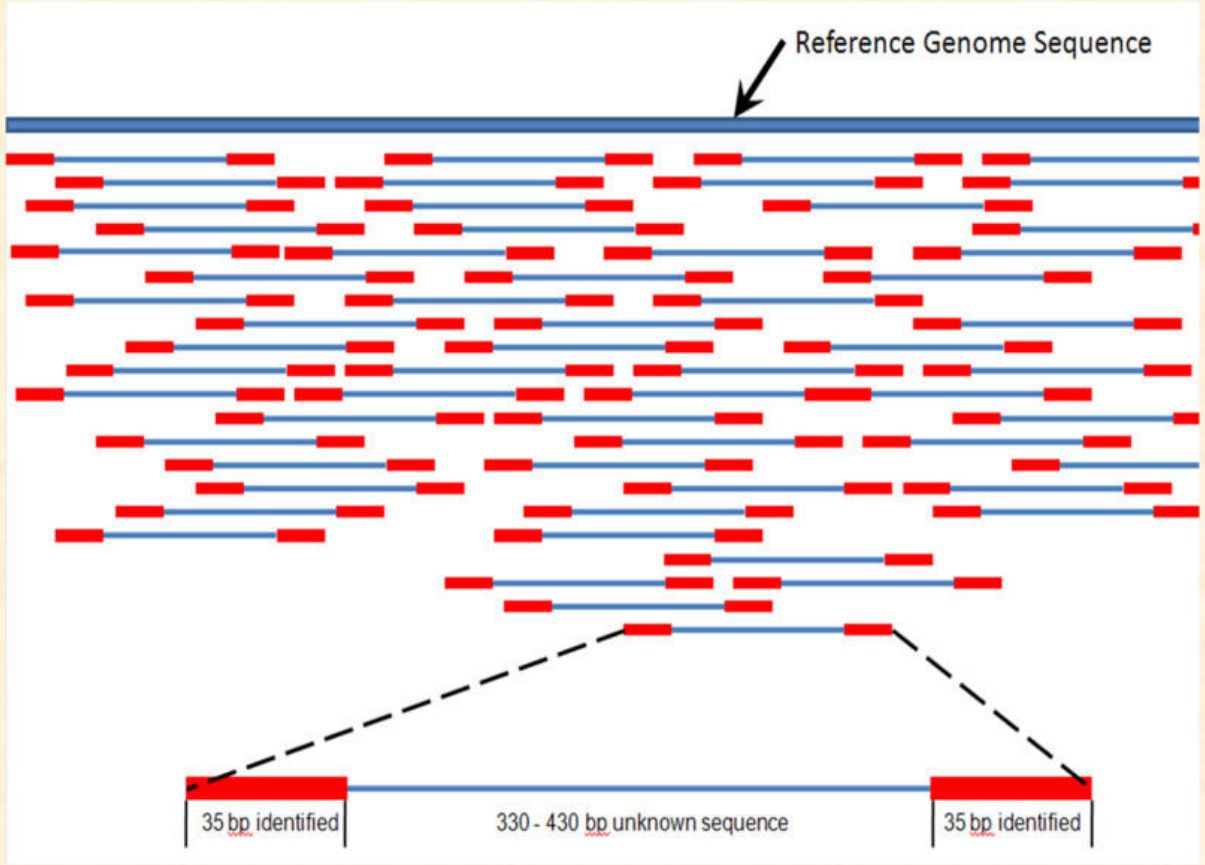
BWA-BowTie-ARACNE ecc

«FM-Index» based on the Burroughs-Wheeler Transform

60 minuti o meno

Risultati da allineatori e mappatori → SAM





Formato SAM arricchisce i dati NGS e dà senso a dove si trovano i nostri reads rispetto ad una referenza

```
>yneN
TTAATGCCTCTTCTCATTTCTTCTGCTGTCATCCGCACAGCAGAAGAATTCCTCATTGAC
TATTATTTCGCAATTTGCTCACATGGATTAAATTAAACTACATACTATAAGATATAAACT
TCTGCCTACAGCTGTAAGAAACTCCGCTCAGTACTGAAGCACCAGTCCTATTTCCTCTTT
TCTCCAGCCTGTTATATTAAGCATACTGATTAACGATTTTTAACGTTATCCGCTAAATAA
ACATATTTGAAATGCATGCGACCACAGTGAAAAACAAAATCACGCAAAGAGACAACTATA
A
>yegR
ACTAACGGCTGCCACCGATAAATTTCAAAAAAGAGCATATACCTAATATTCAACTAAACA
GTGGCATCTTCAATATAATATATTAAAGCCCCCATGGAGTTACCCTGAAGGGCCTCAATG
TCCGTAATTCCTACTTATGTAGGAAATGTTGTACAGAACATTTATTATAATCCTATTCAA
TTATAATAATCATGCCATTATTATATTTAAACACTAGAGAGTGTCGTTGGTATTTAATGG
GGGAAGGTGAGATGAAAAAGATAGCTGCTATATCATTAATTAGTATTTTTATTATGTCTG
G
>emrK
AAATCAGGGATTGTACCGATGATTTATAGTTTCAAGTTGGCACTATAAGTCTTCTTACTA
ATCCTACAGGCGTAAGAATTGTATTGCAAAAGCCACGGTTTAGTCCTCTGTTGTTTTTTT
TGCACCTCATTTAAATTAGGCCTCCAACGTTCCTGGGATAATGTGCAACACATGCACTGT
GTTTGATATGAAGAATGAATGCTCTTTTCATTCAATTCATAAATTTCATCTATGAGAAAT
GAGAGATAATAGTGGAACAGATTAATTCAAATAAAAAACATTCTAACAGAAGAAAATACT
T
>evgA
AATACAATTCTTACGCCTGTAGGATTAGTAAGAAGACTTATAGTGCCAACTTGAAACTAT
AAATCATCGGTACAATCCCTGATTTTATTGTTGACATTTCATTTATGCCGACTATTTATA
TGGTATACTTGTCGAATTATCTTAAAGGAAGCTCAGATTTTCTTATTTTTATTGAGAAAA
TGAGATGACGCCTTATGTCTGTATTACTACAGGGAGAAGGGAGATGCTTCATTGCAAAGG
GAATAATCTATGAACGCAATAATTATTGATGACCATCCTCTTGCTATCGCAGCAATTCGT
>yfdX
TGGCTGTATTTACATTTAATTAATCAGTATTTACATCGATATAATAAATGACATCTCTTT
GTGGTATATAAGAATAGTTCTCTGCGACAGGAAGCATATTCCTACAATTGTAAGACTAAA
ATACTTCTTGCGATAATAACTACAACTGTAAGATAACCCTTTCAAAATGACCGTTGCTCT
CTGATTTCTCATTTCATGCTCACCCAATATGATGGCGGCGTTTTCTAAAACTGTTAAAGA
ATGAGGTAAGTATGAAACGTTTAATTATGGCCACGATGGTCACAGCAATTCTGGCATCTT
C
```

```
@HD VN:1.6 SO:coordinate
@SQ SN:ref LN:45
r001   99 ref  7 30 8M2I4M1D3M = 37  39 TTAGATAAAGGATACTG *
r002    0 ref  9 30 3S6M1P1I4M *  0   0 AAAAGATAAGGATA    *
r003    0 ref  9 30 5S6M       *  0   0 GCCTAAGCTAA       * SA:Z:ref,29,-,6H5M,17,0;
r004    0 ref 16 30 6M14N5M    *  0   0 ATAGCTTCAGC       *
r003 2064 ref 29 17 6H5M       *  0   0 TAGGC             * SA:Z:ref,9,+,5S6M,30,1;
r001  147 ref 37 30 9M         =  7 -39 CAGCGGCAT         * NM:i:1
```

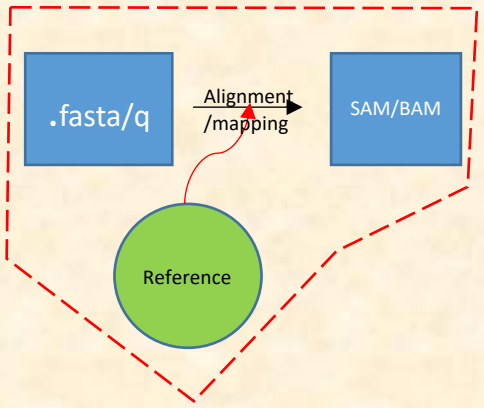
Formato SAM arricchisce i dati NGS e dà senso a dove si trovano i nostri reads rispetto ad una referenza

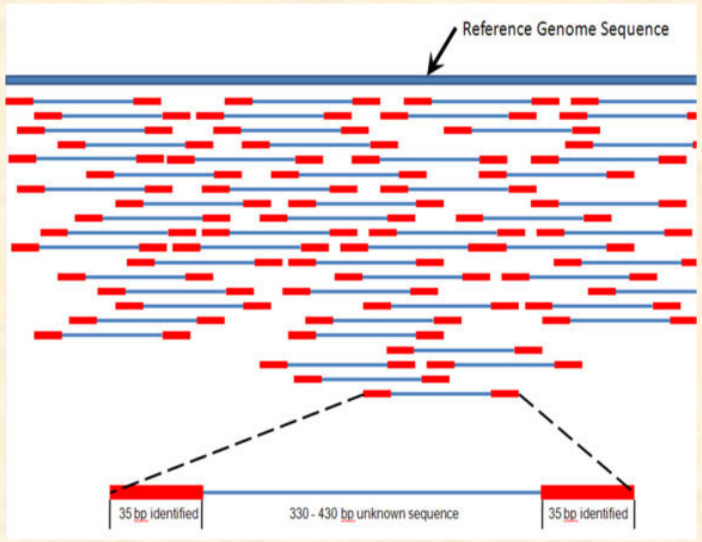
```
>yneN
TTAATGCCTCTTCTCATTTCTTCTGCTGTCATCCGCACAGCAGAAGAATTCCTCATTGAC
TATTATTTCGCAATTTGCTCACATGGATTAAATTAAACTACATACTATAAGATATAAACT
TCTGCCTACAGCTGTAAGAAACTCCGCTCAGTACTGAAGCACCAGTCCTATTTCCTCTTT
TCTCCAGCCTGTTATATTAAGCATACTGATTAACGATTTTTAACGTTATCCGCTAAATAA
ACATATTTGAAATGCATGCGACCACAGTGAAAAACAAAATCACGCAAAGAGACAACTATA
A
>yegR
ACTAACGGCTGCCACCGATAAATTTCAAAAAAGAGCATATACCTAATATTCAACTAAACA
GTGGCATCTTCAATATAATATATTAAAGCCCCCATGGAGTTACCCTGAAGGGCCTCAATG
TCCGTAATTCCTACTTATGTAGGAAATGTTGTACAGAACATTTATTATAATCCTATTCAA
TTATAATAATCATGCCATTATTATATTTAAACACTAGAGAGTGTCGTTGGTATTTAATGG
GGGAAGGTGAGATGAAAAAGATAGCTGCTATATCATTAATTAGTATTTTTATTATGTCTG
G
>emrK
AAATCAGGGATTGTACCGATGATTTATAGTTTCAAGTTGGCACTATAAGTCTTCTTACTA
ATCCTACAGGCGTAAGAATTGTATTGCAAAAGCCACGGTTTAGTCCTCTGTTGTTTTTTT
TGCACCTCATTTAAATTAGGCCTCCAACGTTCCTGGGATAATGTGCAACACATGCACTGT
GTTTGATATGAAGAATGAATGCTCTTTTCATTCAATTCATAAATTTCATCTATGAGAAAT
GAGAGATAATAGTGGAACAGATTAATTCAAATAAAAAACATTCTAACAGAAGAAAATACT
T
>evgA
AATACAATTCTTACGCCTGTAGGATTAGTAAGAAGACTTATAGTGCCAACTTGAAACTAT
AAATCATCGGTACAATCCCTGATTTTATTGTTGACATTTCATTTATGCCGACTATTTATA
TGGTATACTTGTCGAATTATCTTAAAGGAAGCTCAGATTTTCTTATTTTTATTGAGAAAA
TGAGATGACGCCTTATGTCTGTATTACTACAGGGAGAAGGGAGATGCTTCATTGCAAAGG
GAATAATCTATGAACGCAATAATTATTGATGACCATCCTCTTGCTATCGCAGCAATTCGT
>yfdX
TGGCTGTATTTACATTTAATTAATCAGTATTTACATCGATATAATAAATGACATCTCTTT
GTGGTATATAAGAATAGTTCTCTGCGACAGGAAGCATATTCCTACAATTGTAAGACTAAA
ATACTTCTTGCGATAATAACTACAACTGTAAGATAACCCTTTCAAAATGACCGTTGCTCT
CTGATTTCTCATTTCATGCTCACCCAATATGATGGCGGCGTTTTCTAAAACTGTTAAAGA
ATGAGGTAAGTATGAAACGTTTAATTATGGCCACGATGGTCACAGCAATTCTGGCATCTT
C
```

```
@HD VN:1.6 SO:coordinate
@SQ SN:ref LN:45
r001   99 ref  7 30 8M2I4M1D3M = 37  39 TTAGATAAAGGATACTG *
r002    0 ref  9 30 3S6M1P1I4M *  0   0 AAAAGATAAGGATA    *
r003    0 ref  9 30 5S6M       *  0   0 GCCTAAGCTAA       * SA:Z:ref,29,-,6H5M,17,0;
r004    0 ref 16 30 6M14N5M    *  0   0 ATAGCTTCAGC       *
r003 2064 ref 29 17 6H5M       *  0   0 TAGGC             * SA:Z:ref,9,+,5S6M,30,1;
r001  147 ref 37 30 9M         =  7 -39 CAGCGGCAT         * NM:i:1
```

Ma noi siamo interessati spesso nei punti, magari pochi o piccoli, dove il nostro campione differisce da quello generico (o da altri generici)

Risultati da allineatori e mappatori → SAM





SAM/BAM

```
@HD VN:1.6 SO:coordinate
@SQ SN:ref LN:45
r001    99 ref  7 30 8M2I4M1D3M = 37   39 TTAGATAAAGGATACTG *
r002     0 ref  9 30 3S6M1P1I4M *  0    0 AAAAGATAAGGATA     *
r003     0 ref  9 30 5S6M       *  0    0 GCCTAAGCTAA        * SA:Z:ref,29,-,6H5M,17,0;
r004     0 ref 16 30 6M14N5M    *  0    0 ATAGCTTCAGC        *
r003  2064 ref 29 17 6H5M       *  0    0 TAGGC              * SA:Z:ref,9,+,5S6M,30,1;
r001   147 ref 37 30 9M         =  7  -39 CAGCGGCAT          * NM:i:1
```

?

SAMtools - BAMtools

- BCFtools è una collezione di “utilità” che permettono di manipolare, ordinare, estrarre interogare, trovare, classificare.
- “fare domande” ai dati SAM/BAM

SAMtools provides the following commands, each invoked as "`samtools` *`some_command`*".

view

The `view` command filters SAM or BAM formatted data. Using options and arguments it understands what data to select (possibly all of it) and passes only that data through. Input is usually a sam or bam file specified as an argument, but could be sam or bam data piped from any other command. Possible uses include extracting a subset of data into a new file, converting between BAM and SAM formats, and just looking at the raw file contents. The order of extracted reads is preserved.

sort

The `sort` command sorts a BAM file based on its position in the reference, as determined by its alignment. The element + coordinate in the reference that the first matched base in the read aligns to is used as the key to order it by. [TODO: verify]. The sorted output is dumped to a new file by default, although it can be directed to stdout (using the -o option). As sorting is memory intensive and BAM files can be large, this command supports a sectioning mode (with the -m options) to use at most a given amount of memory and generate multiple output file. These files can then be merged to produce a complete sorted BAM file [TODO - investigate the details of this more carefully].

index

The `index` command creates a new index file that allows fast look-up of data in a (sorted) SAM or BAM. Like an index on a database, the generated `*.sam.sai` or `*.bam.bai` file allows programs that can read it to more efficiently work with the data in the associated files.

tview

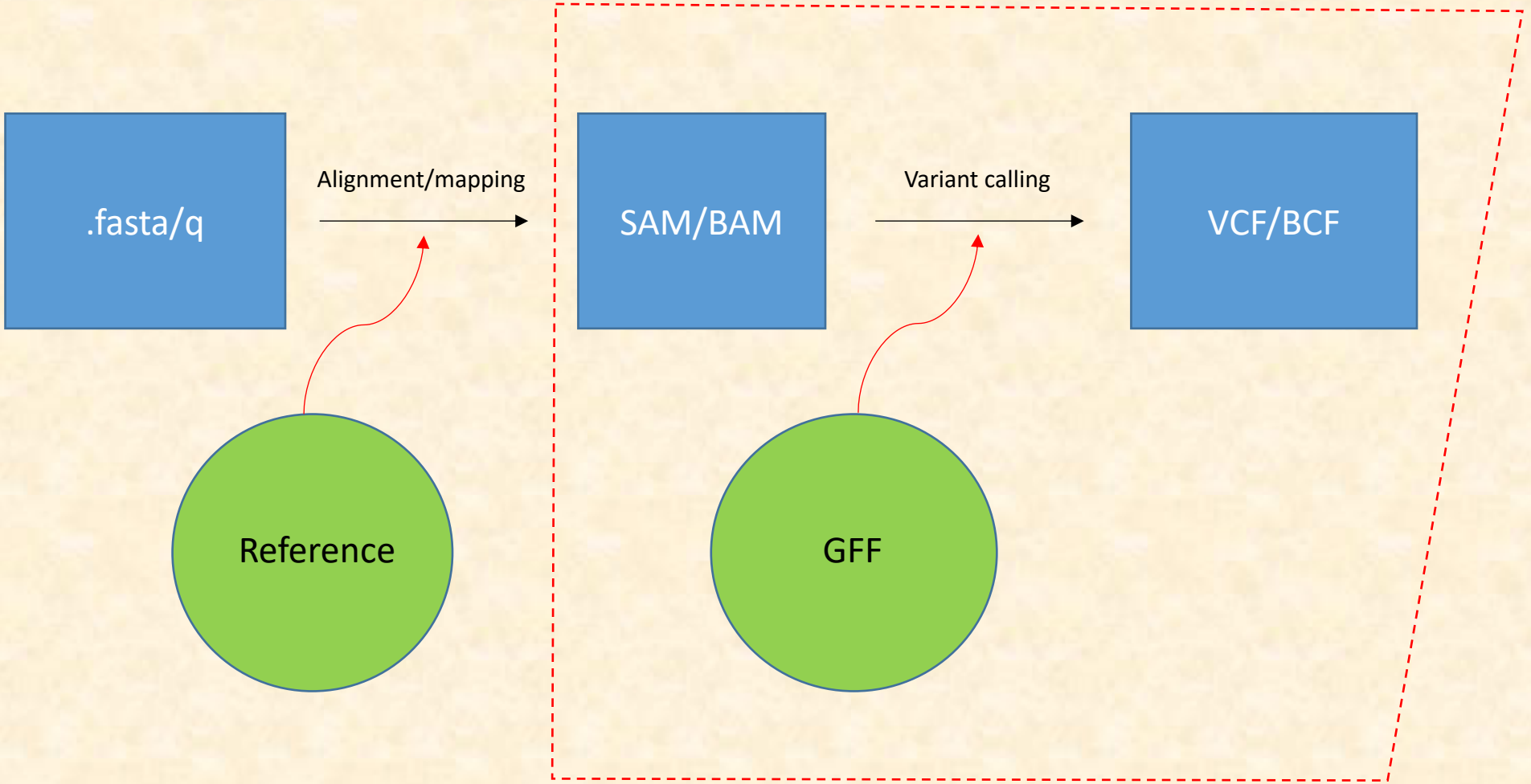
The `tview` command starts an interactive ascii-based viewer that can be used to visualize how reads are aligned to specified small regions of the reference genome. Compared to a graphics based viewer like IGV,[6] it has few features. Within the view, it is possible to jumping to different positions along reference elements (using 'g') and display help information ('?').

mpileup

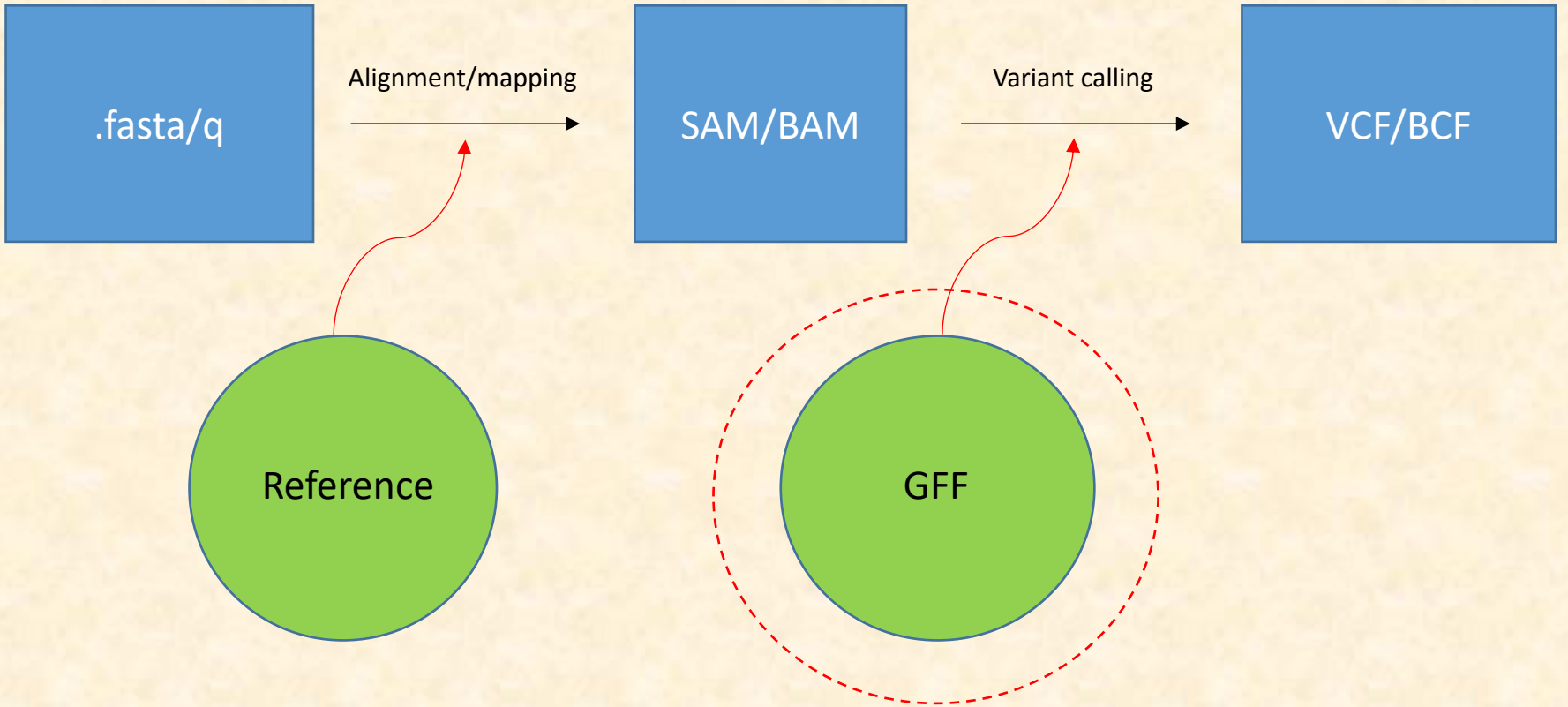
The `mpileup` command produces a pileup format (or BCF) file giving, for each genomic coordinate, the overlapping read bases and indels at that position in the input BAM files(s). This can be used for SNP calling for example.

flagstat

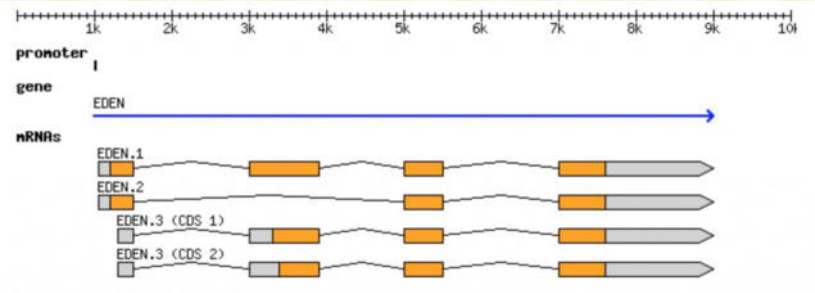
Chiamata varianti (SNP, InDel, ecc)



Chiamata varianti



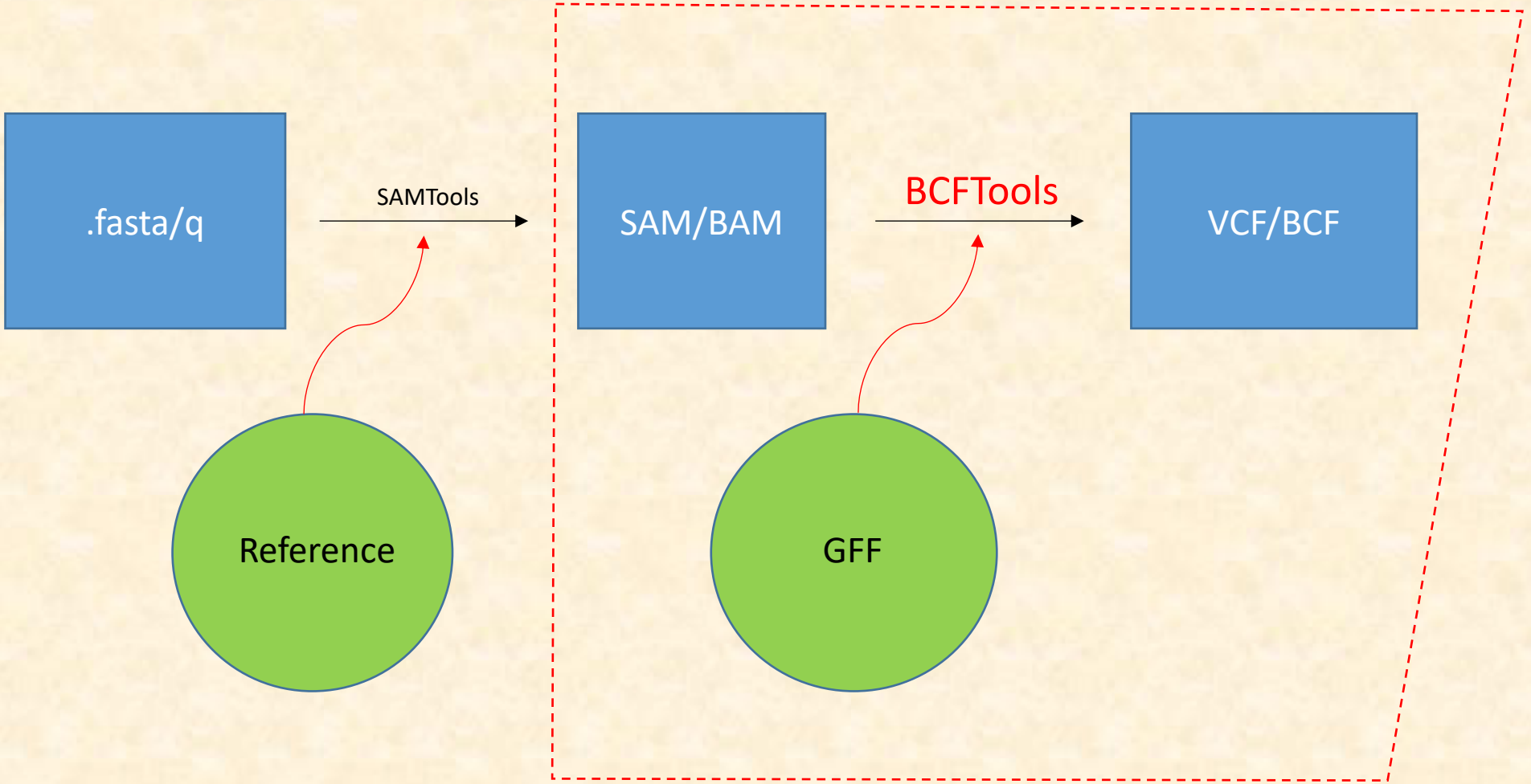
GFF General Feature Format




```
0  ##gff-version 3.2.1
1  ##sequence-region ctg123 1 1497228
2  ctg123 . gene            1000  9000  .  +  .  ID=gene00001;Name=EDEN
3  ctg123 . TF_binding_site 1000  1012  .  +  .  ID=tfbs00001;Parent=gene00001
4  ctg123 . mRNA            1050  9000  .  +  .  ID=mRNA00001;Parent=gene00001;Name=EDEN.1
5  ctg123 . mRNA            1050  9000  .  +  .  ID=mRNA00002;Parent=gene00001;Name=EDEN.2
6  ctg123 . mRNA            1300  9000  .  +  .  ID=mRNA00003;Parent=gene00001;Name=EDEN.3
7  ctg123 . exon            1300  1500  .  +  .  ID=exon00001;Parent=mRNA00003
8  ctg123 . exon            1050  1500  .  +  .  ID=exon00002;Parent=mRNA00001,mRNA00002
9  ctg123 . exon            3000  3902  .  +  .  ID=exon00003;Parent=mRNA00001,mRNA00003
10 ctg123 . exon            5000  5500  .  +  .  ID=exon00004;Parent=mRNA00001,mRNA00002,mRNA00003
11 ctg123 . exon            7000  9000  .  +  .  ID=exon00005;Parent=mRNA00001,mRNA00002,mRNA00003
12 ctg123 . CDS             1201  1500  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
13 ctg123 . CDS             3000  3902  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
14 ctg123 . CDS             5000  5500  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
15 ctg123 . CDS             7000  7600  .  +  0  ID=cds00001;Parent=mRNA00001;Name=edenprotein.1
16 ctg123 . CDS             1201  1500  .  +  0  ID=cds00002;Parent=mRNA00002;Name=edenprotein.2
17 ctg123 . CDS             5000  5500  .  +  0  ID=cds00002;Parent=mRNA00002;Name=edenprotein.2
18 ctg123 . CDS             7000  7600  .  +  0  ID=cds00002;Parent=mRNA00002;Name=edenprotein.2
19 ctg123 . CDS             3301  3902  .  +  0  ID=cds00003;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.3
20 ctg123 . CDS             5000  5500  .  +  1  ID=cds00003;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.3
21 ctg123 . CDS             7000  7600  .  +  1  ID=cds00003;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.3
22 ctg123 . CDS             3391  3902  .  +  0  ID=cds00004;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.4
23 ctg123 . CDS             5000  5500  .  +  1  ID=cds00004;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.4
24 ctg123 . CDS             7000  7600  .  +  1  ID=cds00004;Parent=mRNA00003;Name=edenprotein.4
```

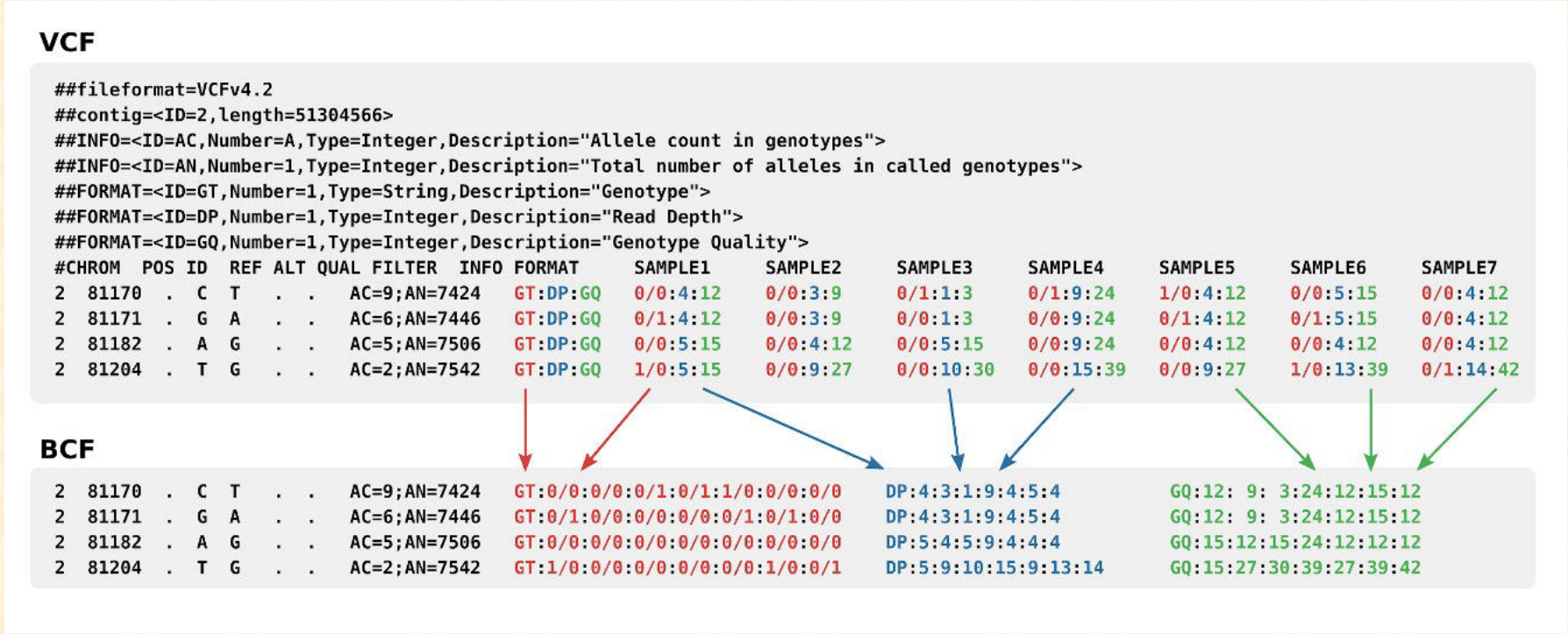
1. Sequence ID
2. Source
3. Feature Type
4. Feature Start
5. Feature End
6. Score
7. Strand
8. Phase
9. Attributes

Chiamata varianti (SNP, InDel, ecc)



VCF/BCF

- **Variant Call Format** (**VCF**) specifica come codifichiamo le differenze tra il nostro campione ed una referenza

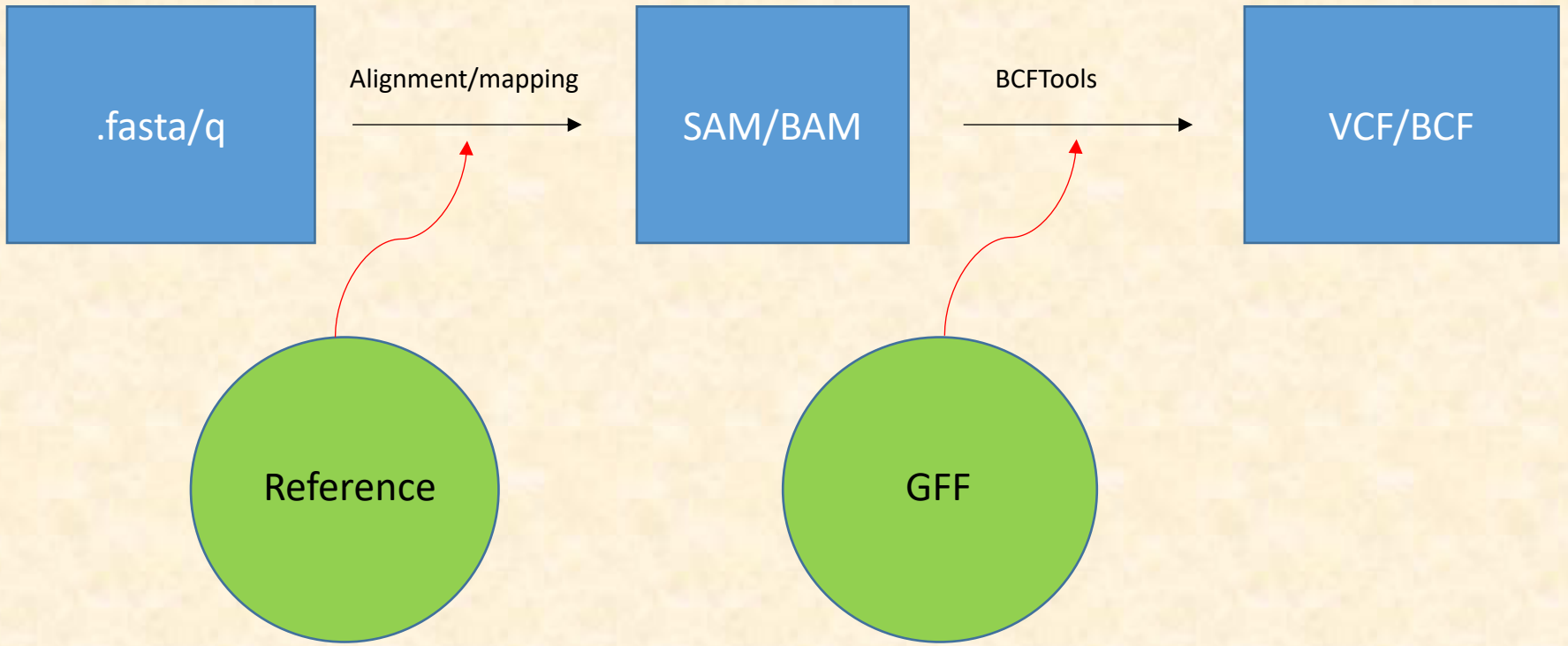


BCFTools

- BCFtools è una collezione di “utilità” che permettono di manipolare le variant calls nel format Variant Call Format (VCF).

- **annotate** .. edit VCF files, add or remove annotations
- **call** .. SNP/indel calling (former "view")
- **cnv** .. Copy Number Variation caller
- **concat** .. concatenate VCF/BCF files from the same set of samples
- **consensus** .. create consensus sequence by applying VCF variants
- **convert** .. convert VCF/BCF to other formats and back
- **csq** .. haplotype aware consequence caller
- **filter** .. filter VCF/BCF files using fixed thresholds
- **gtcheck** .. check sample concordance, detect sample swaps and contamination
- **index** .. index VCF/BCF
- **isec** .. intersections of VCF/BCF files
- **merge** .. merge VCF/BCF files files from non-overlapping sample sets
- **mpileup** .. multi-way pileup producing genotype likelihoods
- **norm** .. normalize indels
- **plugin** .. run user-defined plugin
- **polysomy** .. detect contaminations and whole-chromosome aberrations
- **query** .. transform VCF/BCF into user-defined formats
- **reheader** .. modify VCF/BCF header, change sample names
- **roh** .. identify runs of homo/auto-zygosity
- **sort** .. sort VCF/BCF files
- **stats** .. produce VCF/BCF stats (former vcfcheck)
- **view** .. subset, filter and convert VCF and BCF files

Riassunto generale



Grazie per la vostra attenzione

DNA phenotyping

Complex traits for complex problems

Serena Aneli

10th November 2023

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche
Medicina Legale
Sezione di Genetica Forense

29° CONGRESSO GEFI
La genetica forense al servizio della persona fragile

FORENSIC DNA PHENOTYPING (FDP)

what

"Forensic DNA Phenotyping (FDP) refers to the prediction of a person's externally visible characteristics (EVCs) regarding ***appearance***, *biogeographic ancestry* and *age* from DNA extracted from human biological samples collected at crime scenes

when

FDP is applied in criminal cases where no match in forensic STR-profiling is found, because the sample donor is unknown to the investigative authorities and thus its STR-profile is unavailable for comparative matching

why

FDP aims to provide investigative leads to help find unknown perpetrators of crime by reducing the number of potential suspects to a group of people that match the EVC information predicted from the crime scene DNA.

how

Because current FDP tools cannot deliver appearance on the individual-specific level, which also is unlikely to become possible in the foreseeable future, FDP applications are always followed by forensic STR-profiling for final individual identification."

Kayser M., Branicki W., Parson W, Phillips C., FSIG, 2023

FIELD APPLICATION OF FDP

appearance

ancestry

age

"Because appearance, ancestry and age by themselves describe a person's EVCs, and since some appearance traits depend on certain biogeographic ancestries and/or a certain age range, the combination of all three FDP components is the most informative way to find unknown perpetrators with the help of DNA.

Therefore, it is recommended to combine DNA-based appearance, ancestry and age prediction in forensic practice, provided the legal situation allows."

Legal situation

ethical implications

Kayser M., Branicki W., Parson W, Phillips C., FSIG, 2023

THE WORKFLOW

predictive model

interpretation

genetic markers

typing technology

THE WORKFLOW

predictive model

interpretation

genetic markers

typing technology

THE WORKFLOW

predictive model

interpretation

genetic markers

typing technology

THE WORKFLOW

predictive model

interpretation

genetic markers

typing technology

THE WORKFLOW

predictive model

interpretation

genetic markers

typing technology

HOW MANY GENES ARE AT WORK?

MENDELIAN TRAIT

Mendelian genetics put forward the concept of dominant and recessive traits, where the **phenotypes are controlled by single genes**. These traits are known as monogenic or Mendelian traits (es. cystic fibrosis, *cleft chin, cheek dimples, hitchhiker's thumb* etc.).

COMPLEX TRAIT

There are features or traits in human genetics which **are controlled by multiple genes** and whose inheritance does not follow the rules of Mendelian genetics. Such traits are known as complex traits (es. autism, cardiac disease, cancer, diabetes, Alzheimer's disease, and asthma, *eye and hair color*). Complex traits are believed to result from **gene-gene** and **gene-environment interactions**, genetic heterogeneity, and potentially other yet unknown reasons.

LINKAGE ANALYSIS IN PEDIGREES

GWAS
(EWAS for methylation loci)

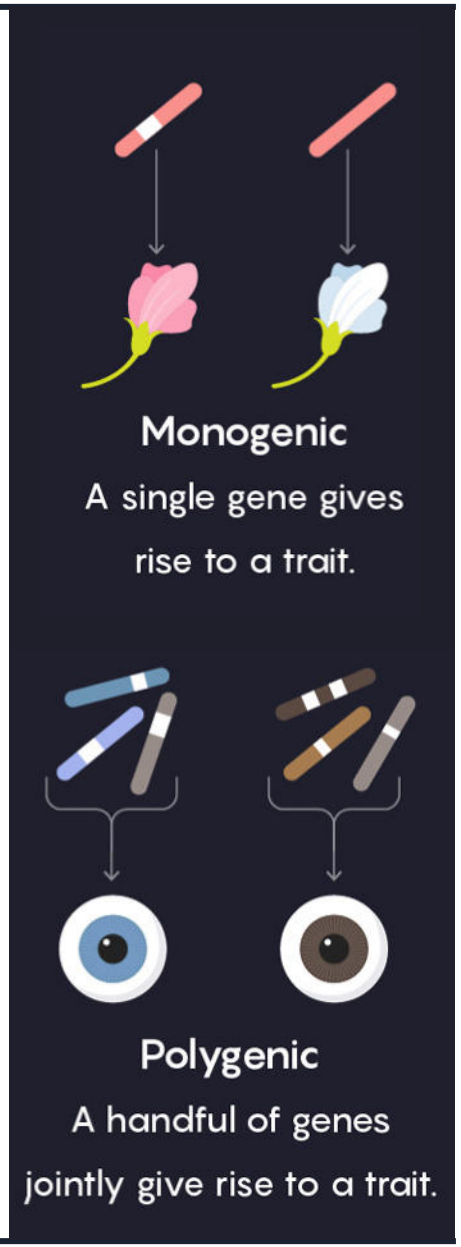


Image credit to Lucy Reading-Ikkanda/Quanta Magazine

HOW MANY GENES ARE AT WORK?

MENDELIAN TRAIT

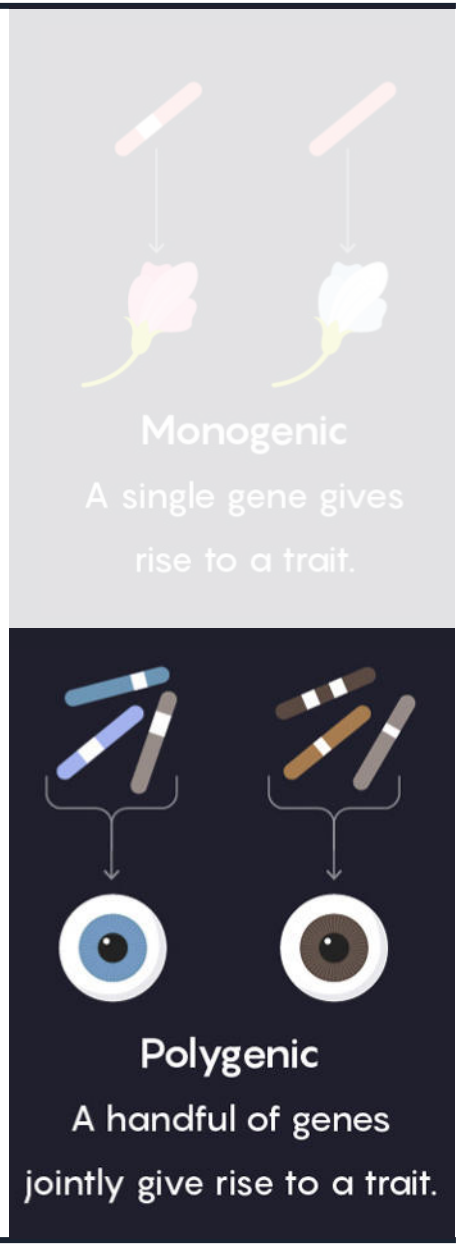
Mendelian genetics put forward the concept of dominant and recessive traits, where the **phenotypes are controlled by single genes**. These traits are known as monogenic or Mendelian traits (es. cystic fibrosis, *cleft chin, cheek dimples, face freckles, hitchhiker's thumb* etc.).

COMPLEX TRAIT

There are features or traits in human genetics which **are controlled by multiple genes** and whose inheritance does not follow the rules of Mendelian genetics. Such traits are known as complex traits (es. autism, cardiac disease, cancer, diabetes, Alzheimer's disease, and asthma, *eye and hair color*). Complex traits are believed to result from **gene-gene** and **gene-environment interactions**, genetic heterogeneity, and potentially other yet unknown reasons.

LINKAGE ANALYSIS IN PEDIGREES

GWAS
(EWAS for methylation loci)



DECONSTRUCTING GENO-PHENO ASSOCIATIONS

a. collection of DNA and phenotypic information from a group of individuals

b. genotyping of each individual using available SNP arrays or sequencing strategies;

c. quality control;

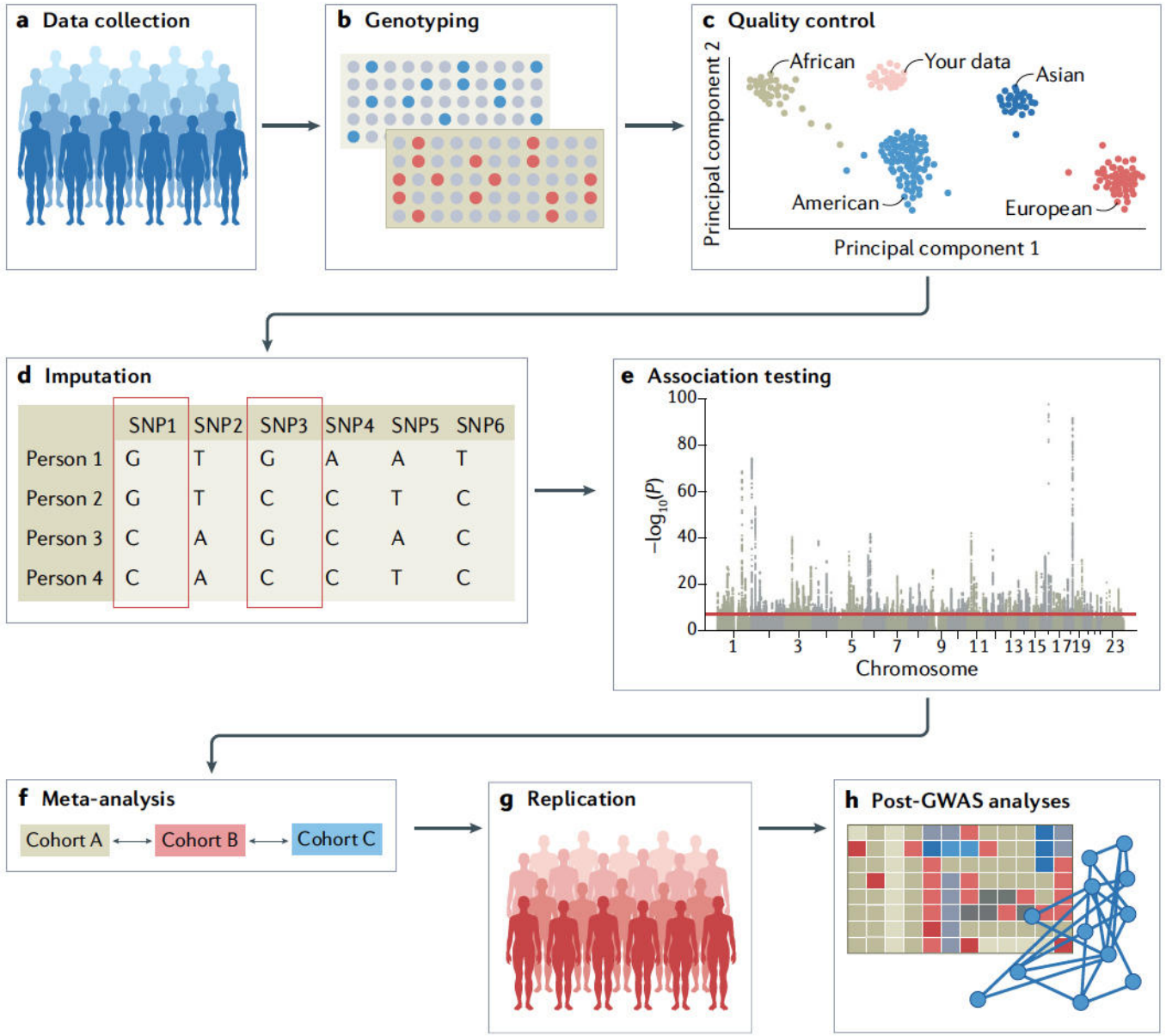
d. imputation of untyped variants using haplotype phasing and reference populations;

e. conducting the statistical test for association;

f. conducting a meta- analysis (optional);

g. seeking an independent replication;

h. interpreting the results by conducting multiple post- GWAS analyses



Uffelmann E. et al., Nat. Rev. METHODS PRIMERS, 2021

DECONSTRUCTING GENO-PHENO ASSOCIATIONS

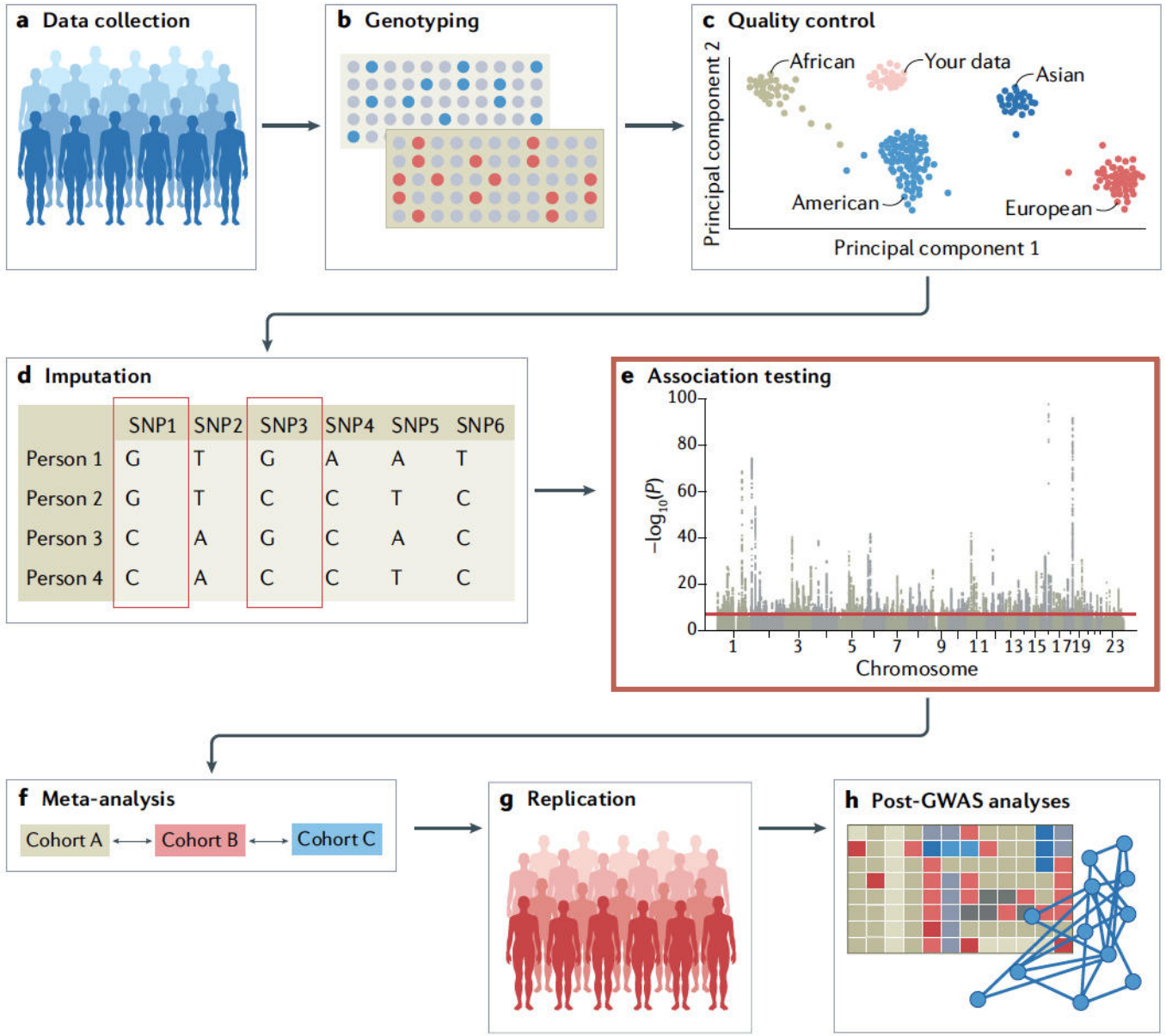
e. conducting the statistical test for association

1 – linear or logistic regression models are used to test for associations depending on whether the phenotype is continuous or binary.

$$Y = \beta_s X_s + Q + g + e$$

where X_s is a vector of genotype values for all individuals at SNP s, β_s is the **SNP effect size**

2 – stringent multiple-testing threshold to avoid false positives ($P < 5 \times 10^{-8}$)



Uffelmann E. et al., Nat. Rev. METHODS PRIMERS, 2021

THE WORKFLOW

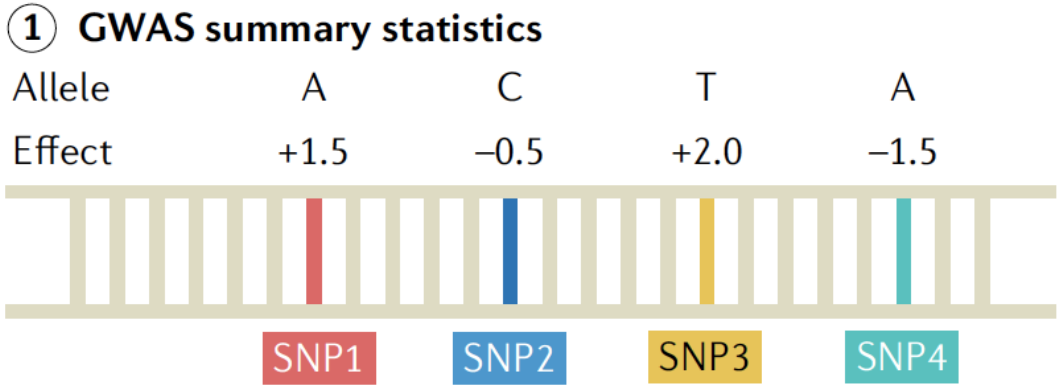
predictive model

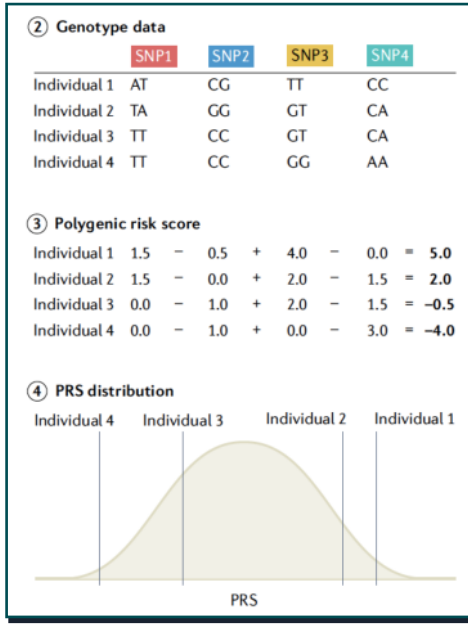
interpretation

genetic markers

typing technology

PREDICTING TRAITS FROM ASSOCIATED VARIANTS

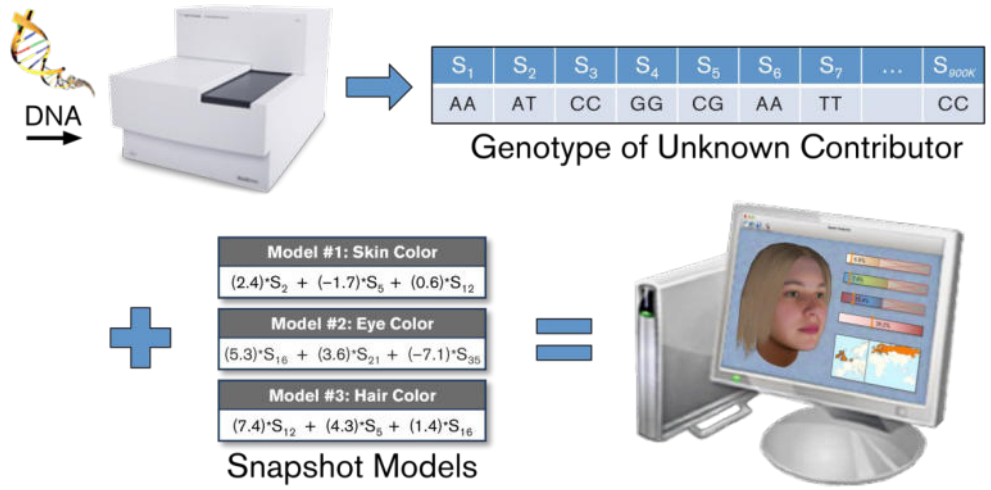




Polygenic Risk Scores

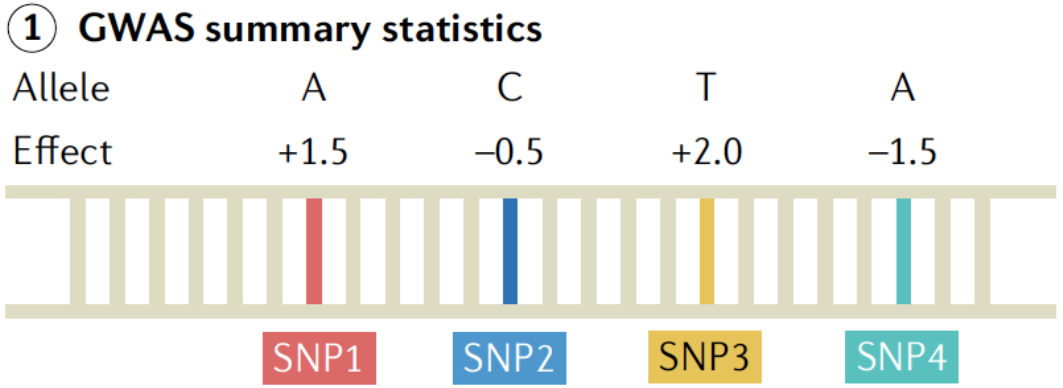
sum of risk alleles corresponding to a phenotype of interest in each individual, weighted by the effect size estimated in the GWAS

Predictive (regression) models



Uffelmann E. et al., Nat. Rev. METHODS PRIMERS, 2021

PREDICTING TRAITS FROM ASSOCIATED VARIANTS

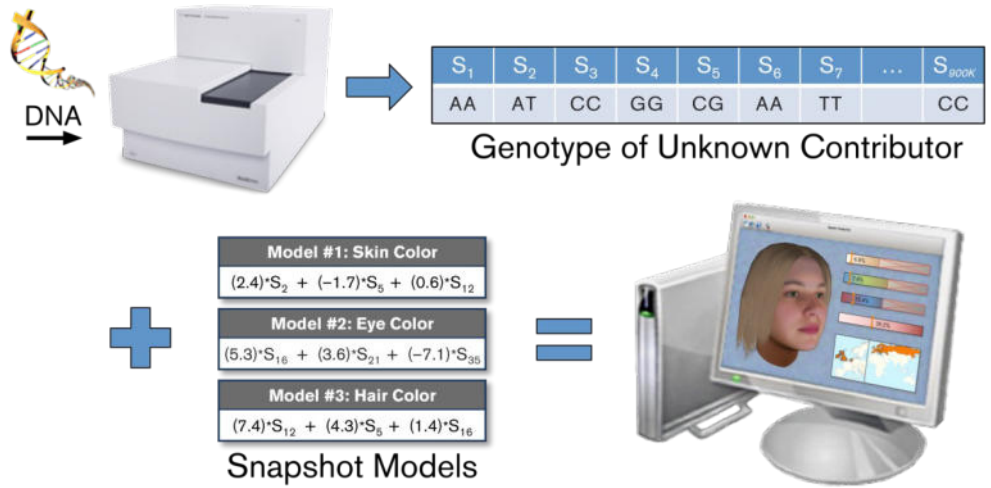


In both cases, using the same dataset for discovery and prediction may lead to inflated results.

Polygenic Risk Scores

sum of risk alleles corresponding to a phenotype of interest in each individual, weighted by the effect size estimated in the GWAS

Predictive (regression) models



Uffelmann E. et al., Nat. Rev. METHODS PRIMERS, 2021

THE WORKFLOW

predictive model

interpretation

genetic markers

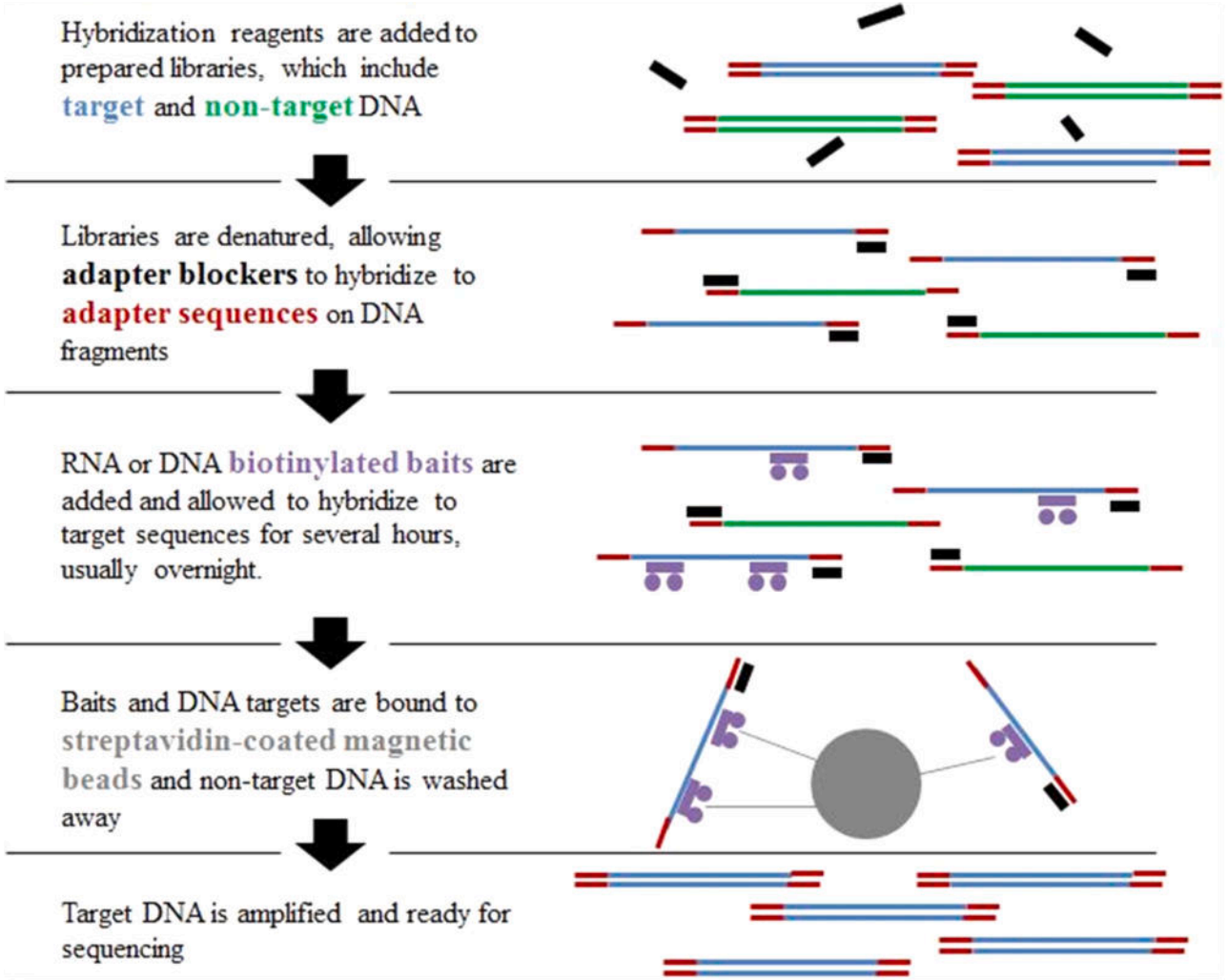
typing technology

TARGETED MPS TECHNOLOGIES

MPS forensic kits: high throughput sequencing method which has maximizes the amount of information that can be gleaned while minimizing the DNA input required.

Despite forensic validation, these assays may be unsuitable for forensic samples with degraded DNA (tipically made of fragments on average as small as 70bp).

Fragments with reduced fragment length (up to 30-35 bp) can be assayed using ***hybridization capture*** and MPS.



Gorden M. E., Sturk-Andreaggi K., Marshall C., FSIG, 2021

THE WORKFLOW

predictive model

interpretation

genetic markers

typing technology

SOME CAVEATS

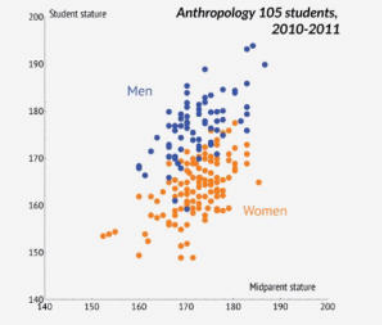
related

confounders

Genetic architecture of the trait

The power of a GWAS to identify a trait affecting SNP depends on the fraction of trait variation explained by the SNP.

HERITABILITY

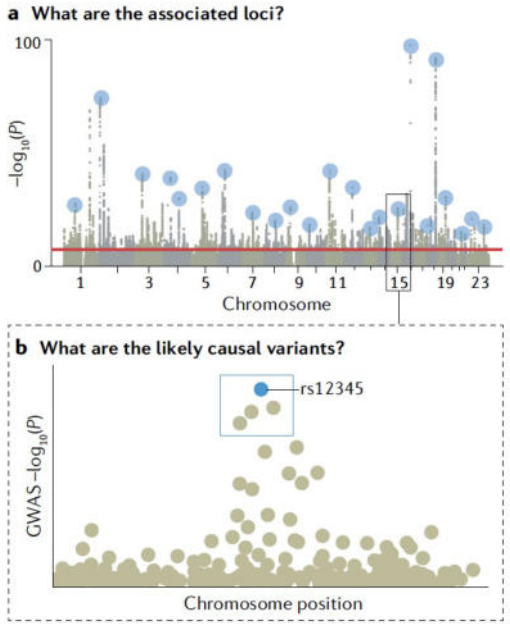


Non-additive genetic influences which include the interaction between alleles at different loci.

EPISTASIS

Associated and causal variants

As a result of local LD, GWAS usually does not directly identify the specific causal variant, but only localizes its approximate genomic position.

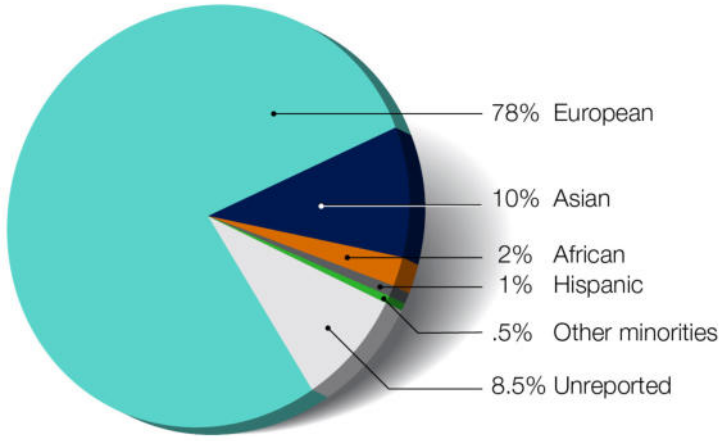


Population diversity

Environment

In GWAS, it is widely acknowledged that associations can be biased by population stratification, primarily association between ancestry and environment effects.

A remaining challenge is the issue of ascertainment bias, which occurs when study samples differ systematically from the population. Most sample sets are biased toward individuals of European ancestry as well as toward individuals with higher social economic status and greater health, along with other unknown biases.

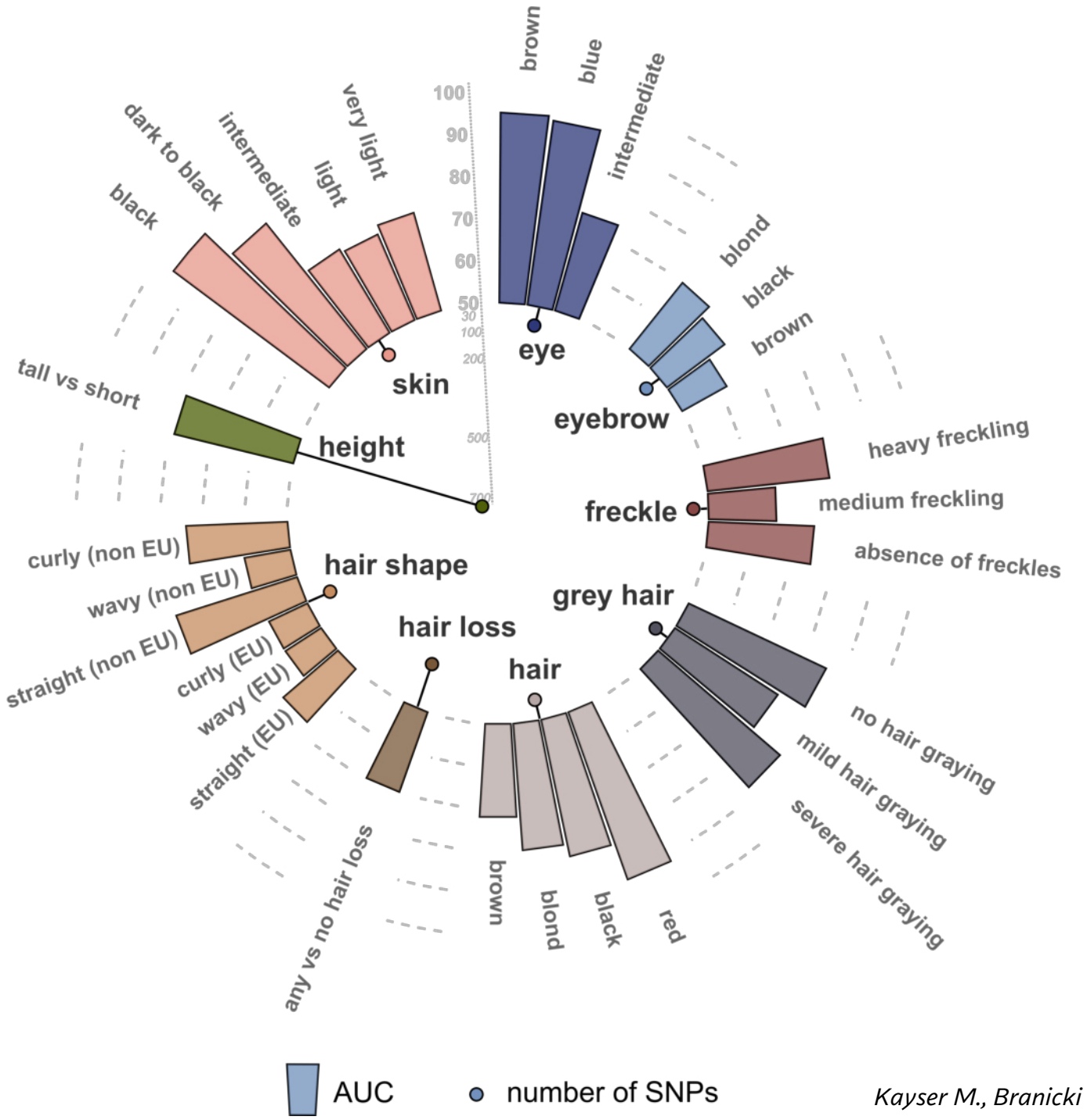


While not necessarily introducing false positives, these ascertainment biases limit the portability of GWAS findings.

EUROPEAN-CENTRIC STUDIES

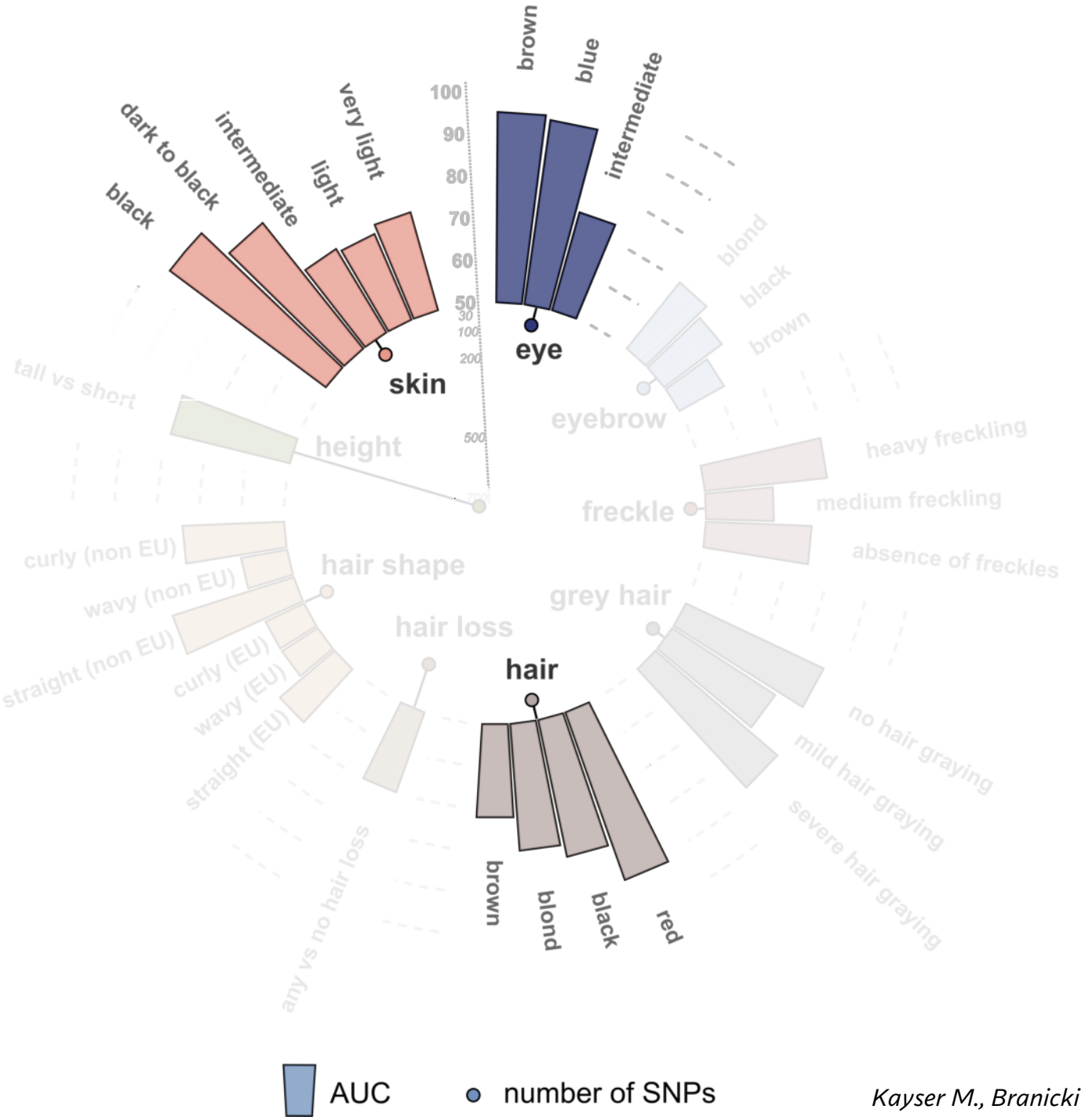
Young A. I. et al., Science, 2019; Uffelmann E. et al., Nat. Rev. METHODS PRIMERS, 2021

SOME EXAMPLES



Kayser M., Branicki W., Parson W, Phillips C., FSIG, 2023

SOME EXAMPLES



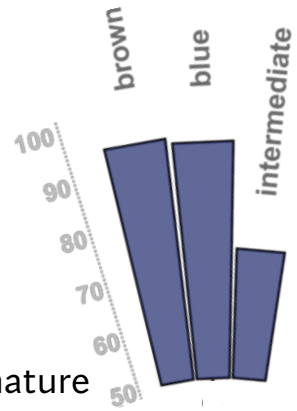
Kayser M., Branicki W., Parson W, Phillips C., FSIG, 2023

THE MOST “SIMPLE”: PIGMENTATION

EYE

TOOLS

Updated IrisPlex
- ***24 SNPs***
- https://hirisplex.erasmusmc.nl



TECHNOLOGY

- SNaPshot assay
- ForenSeq DNA Signature Prep kit (Verogen)

WHAT’S NEW

Largest GWAS: *Simcoe et al., SciAdv, 2021* found 61 (50 new) independent associations in 195K Europeans explaining 53% of eye color variation.

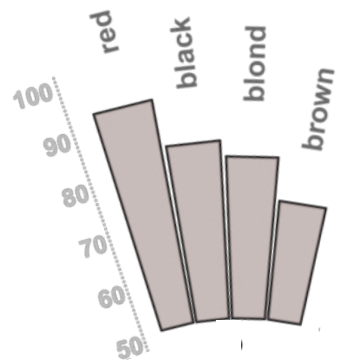
ISSUES

- Eurocentric perspective, even though the largest variation is in Europe (or Eurasia?)
- Continuous measurements?

HAIR

TOOLS

Updated HIrisPlex
- ***24 SNPs***
- https://hirisplex.erasmusmc.nl



TECHNOLOGY

- SNaPshot assay
- ForenSeq DNA Signature Prep kit (Verogen)

WHAT’S NEW

GWAS: *Hisy et al., Nat. Genet, 2018* found 124 (111 new) associations in 300K Europeans. The prediction was slightly better (with 14-fold more SNPs).

ISSUES

- Eurocentric perspective, even though the largest variation is in Europe, is that so?)
- Continuous measurements?

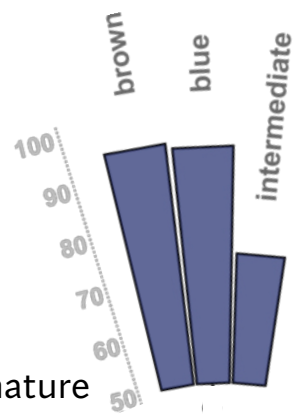
Kayser M., Branicki W., Parson W, Phillips C., FSIG, 2023; Pospiech et al., Genes, 2022

THE MOST "SIMPLE": PIGMENTATION

EYE

TOOLS

Updated IrisPlex
- ***24 SNPs***
- https://hirisplex.erasmusmc.nl



TECHNOLOGY

- SNaPshot assay
- ForenSeq DNA Signature Prep kit (Verogen)

WHAT'S NEW

Largest GWAS: *Simcoe et al., SciAdv, 2021* found 61 (50 new) independent associations in 195K Europeans explaining 53% of eye color variation.

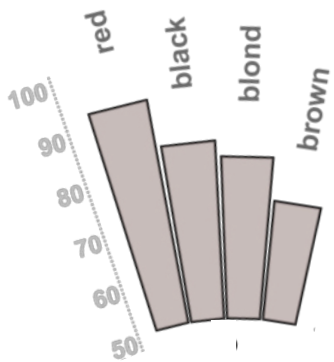
ISSUES

- Eurocentric perspective, even though the largest variation is in Europe (or Eurasia?)
- Continuous measurements?

HAIR

TOOLS

Updated HIrisPlex
- ***24 SNPs***
- https://hirisplex.erasmusmc.nl



TECHNOLOGY

- SNaPshot assay
- ForenSeq DNA Signature Prep kit (Verogen)

WHAT'S NEW

GWAS: *Hisy et al., Nat. Genet, 2018* found 124 (111 new) associations in 300K Europeans. The prediction was slightly better (with 14-fold more SNPs).

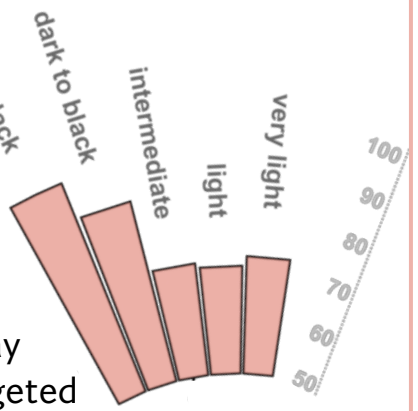
ISSUES

- Eurocentric perspective, even though the largest variation is in Europe, is that so?)
- Continuous measurements?

SKIN

TOOLS

HIrisPlex-S
- ***41 SNPs***
- https://hirisplex.erasmusmc.nl



TECHNOLOGY

- SNaPshot assay
- 5 different targeted MPS platforms (e.g., VISAGE-ET-AA)

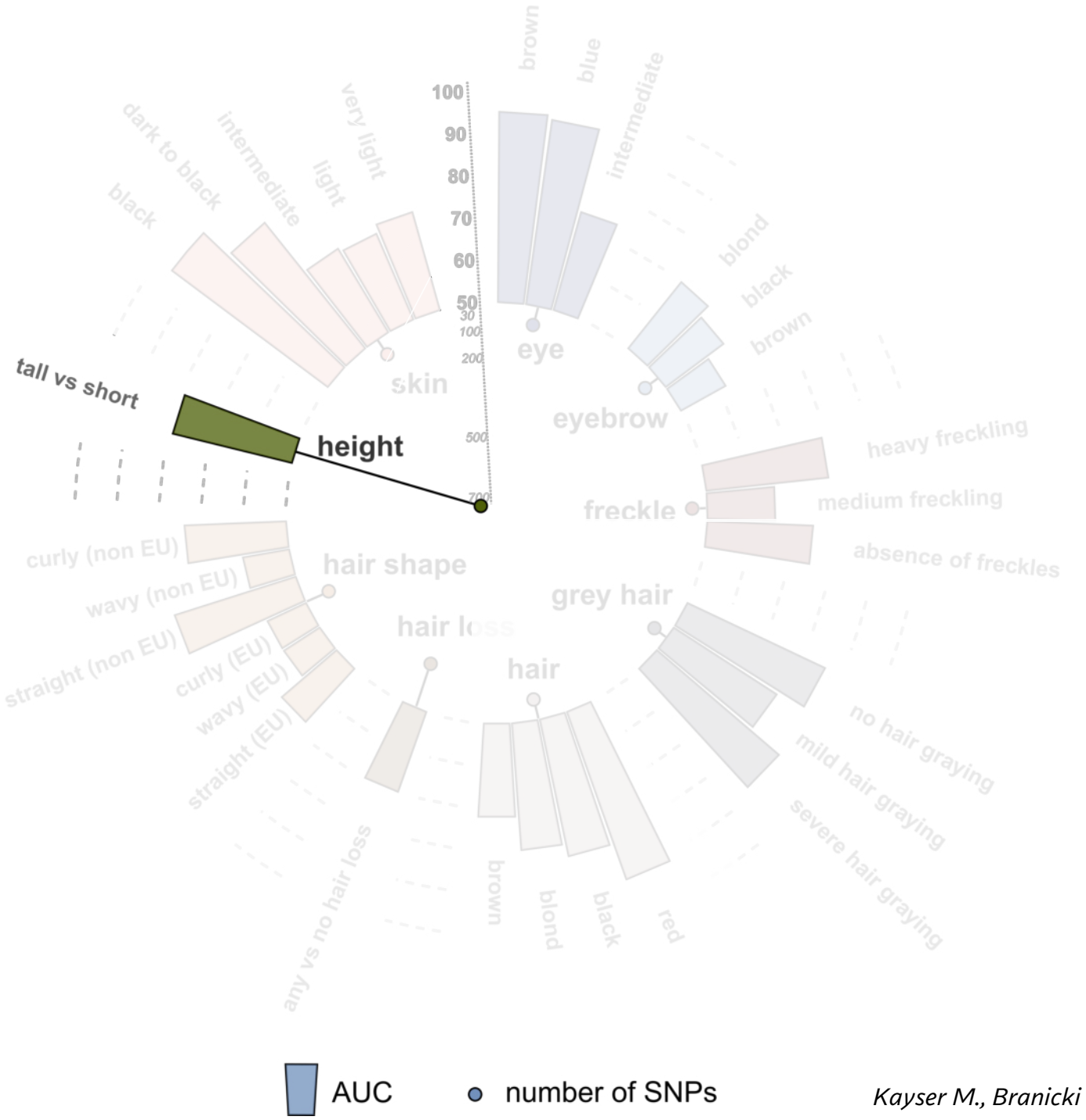
WHAT'S NEW

GWAS: *Martin et al, Cell, 2017* in ~500 KhoeSan (quantitative measures) found that pigmentation in Africans is far more polygenic than light skin in Eurasians.

ISSUES

- Africa harbors the greatest range of pigmentation globally!
- Careful with self-reported data.
- More complex than previously assumed

Kayser M., Branicki W., Parson W, Phillips C., FSIG, 2023; Pospiech et al., Genes, 2022; Feng et al., Hum Mol Genet., 2021



Kayser M., Branicki W., Parson W, Phillips C., FSIG, 2023

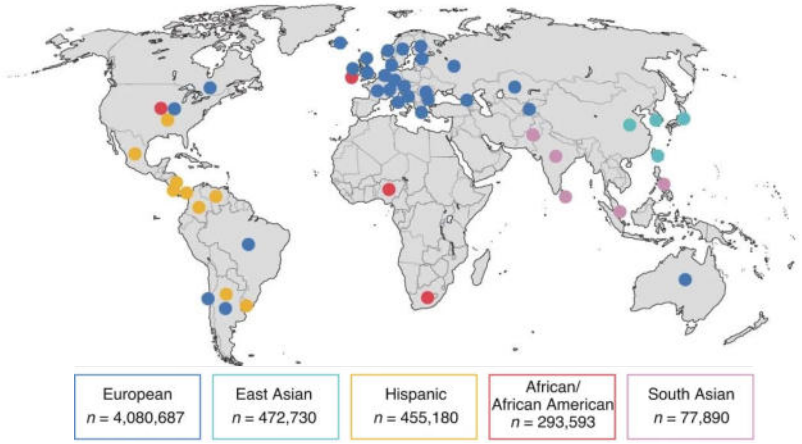
THE MOST "COMPLEX": HEIGHT

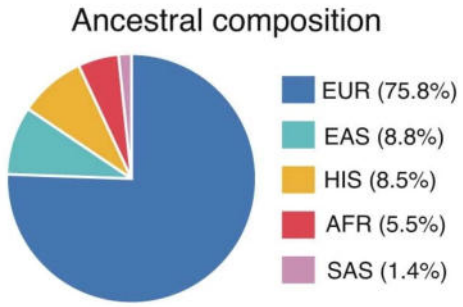
Variants from early GWAS could explain only 5% of the variation in height between people

MISSING HERITABILITY

In contrast to pigmentation, the genetic architecture of height is **highly polygenic**. The heritability of this trait is dominated by a **large number of alleles with small effect sizes**.

A **2022** GWAS study of 5.4 million individuals of diverse ancestries found 12,111 independent SNPs that are significantly associated with height which account for nearly all of the common SNP-based heritability, accounting for 40% (45%) of phenotypic variance in populations of European ancestry but only around 10–20% (14–24%) in populations of other ancestries.





Geographical mapping and ancestries composition of 281 studies meta-analysed in the study.

SNPs sets for height inference

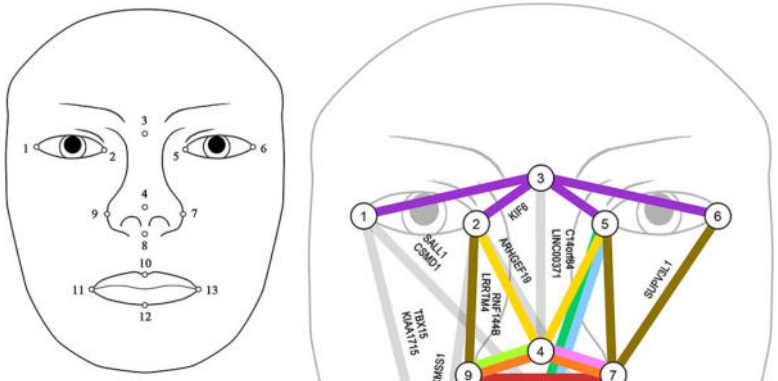
F. Liu, et al., FSIG, **2019**: AUC of 0.79 for tall vs non-tall using 689 SNPs. No value for predicting continuous height (R^2 = 0.21).

Yengo L. et al., Nature, 2022

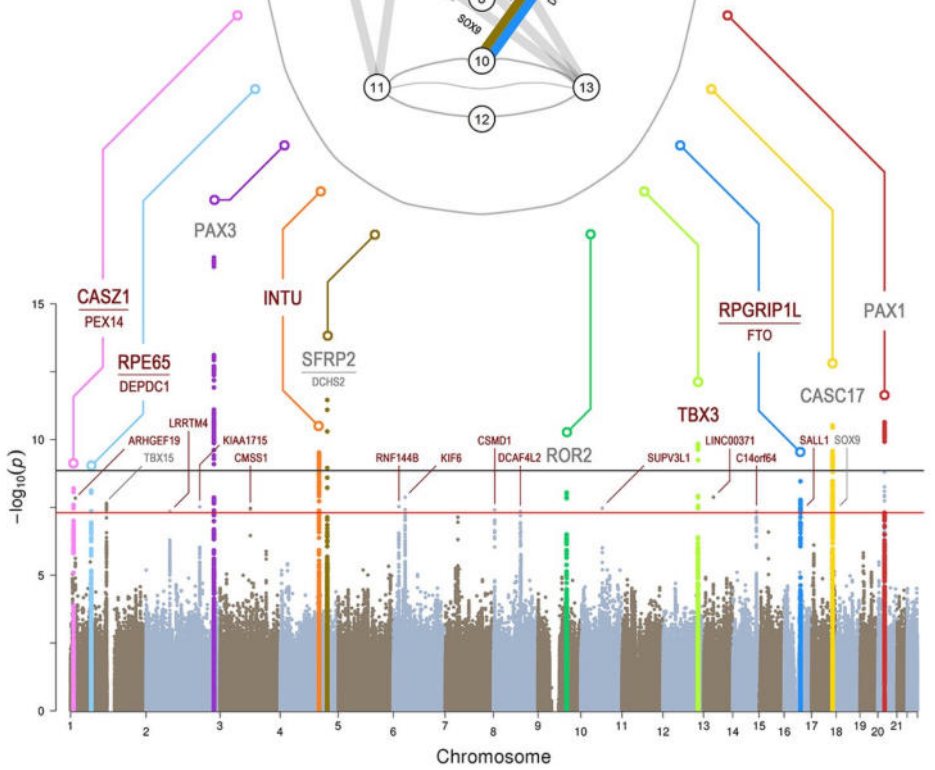
THE MOST FASCINATING: HUMAN FACE

Xiong et al., eLife 2019: GWAS on > 10K Europeans using 3D images found 24 genetic loci.

31 leading SNPs individually explain less than 1%, and together explain up to 4.62%, of the variance for individual phenotypes.

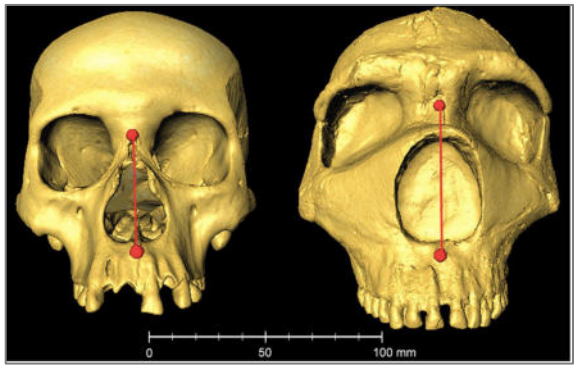


No	Abbreviation	Name
1	ExR	Right Exocanthion
2	EnR	Right Endocanthion
3	N	Nasion
4	Prn	Pronasale
5	EnL	Left Endocanthion
6	ExL	Left Exocanthion
7	AlL	Left Alare
8	Sn	Subnasale
9	AlR	Right Alare
10	Ls	Labiale superius
11	ChR	Right Cheilion
12	Li	Labiale inferius
13	ChL	Left Cheilion



WHAT'S NEW:

A 2023 GWAS on >6000 Latin Americans found 42 regions, among which a Neanderthal introgressed region increasing nasal height (Li et al., Comm Biol, 2023).



ISSUES:

- Super low proportion of phenotypic variance explained by known associations.
- Different ways of measuring faces
- Strong effect size of sex, age and BMI
- Eurocentric perspective

Xiong et al., eLife 2019; White et al., Nat Genet, 2020; Selleri L., Nat Rev Genet, 2023; Li et al., Comm Biol, 2023

FINAL CONSIDERATIONS

Genetic markers

Sufficiently large and ancestry diverse geno-pheno databases

EVCs informations are often lacking due to the medical-centric perspective of such databases. Moreover, to avoid discrimination, EVCs are not even collected.

The genetic architecture of complex traits is population-dependent, so more studies on non-European populations are strongly advocated.

Data set	Ancestry
UK Biobank	Predominantly white British
BioBank Japan	Japanese
China Kadoorie Biobank	Chinese
Genes & Health	British South Asian
H3Africa	Various African ancestries
BioMe	Multiple ancestries (based in New York)
TOPMed	Multiple ancestries (USA)
Million Veteran Programme	Multiple ancestries (USA)
‘All of Us’ initiative	Multiple ancestries (USA)
23andMe	Multiple ancestries (USA)

What about variants informing also on health?

FINAL CONSIDERATIONS

Genetic markers	Sufficiently large and ancestry diverse geno-pheno databases
Predictive model	Sufficiently large, ancestry diverse and INDEPENDENT discovery and validation databases
Typing technology	SNP capture may become essential to the confirmation of investigative leads
Interpretation	**AGE** **ANCESTRY**

29° CONGRESSO GEFI
La genetica forense al servizio della persona fragile

Thank you for your attention

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Laboratorio di Scienze Criminalistiche Carlo Torre

Prof. Carlo Robino
Dr. Serena Aneli
Dr. Elena Chierto

RACCOMANDAZIONI IN TEMA DI REPERTAMENTO DI TRACCE BIOLOGICHE PER LE ANALISI DI GENETICA FORENSE NEL PERCORSO CLINICO-ASSISTENZIALE IN CASO DI VIOLENZA SESSUALE E/O MALTRATTAMENTO

Aggiornamento 2023 a cura del gruppo di lavoro GeFI

Coordinatrice: Prof.ssa Susi Pelotti

Membri: Direttivo GeFI, Prof.ssa Sarah Gino, Prof. Andrea Piccinini, Dott.ssa Alessandra Larosa, Dott. Andrea Berti

III Convegno Gruppi e Società Affiliate SIMLA

28-30 settembre 2023

Santa Margherita di Pula (CA)

REVISIONE DELLE

Linee guida per la repertazione di tracce biologiche per le analisi di genetica forense nel percorso assistenziale delle vittime di violenza sessuale e/o maltrattamento

(Allegato C del DPCM del 24,11,2017; G.U. 30,01,2018)

SIMLA

Ge.F.I. - Genetisti Forensi Italiani

Le raccomandazioni contenute nel documento rappresentano i "requisiti minimi" che potranno essere implementati nelle procedure delle singole realtà sanitarie.

A - sul corpo della vittima

- Almeno due tamponi nella medesima area
- Non devono contenere terreno
- Per inumidire i tamponi utilizzare una/due gocce di soluzione fisiologica sterile
- Per decontaminare oggetti non monouso (es. forbici, pinze, ect) lavare con ipoclorito di sodio ed asciugare bene dopo ogni prelievo

B - sugli indumenti

- le tracce presenti sugli indumenti non sempre sono visibili ad occhio nudo. Tutti gli indumenti, pertanto, devono essere repertati.

- Devono essere repertati anche eventuali assorbenti, pannolini o quanto a contatto con le regioni intime.

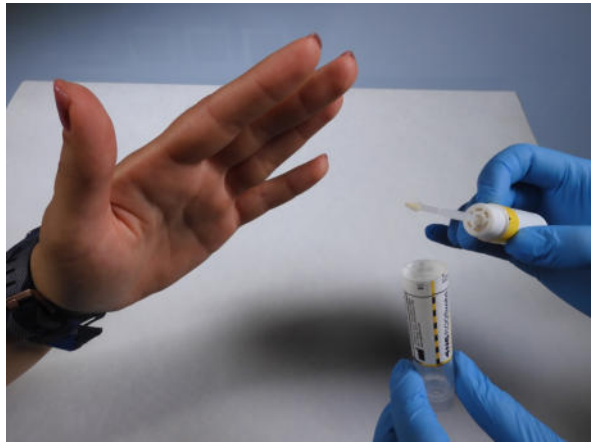
Tabella 1. Tabella riassuntiva relativa al repertamento di campioni sul corpo della persona assistita (punto A)

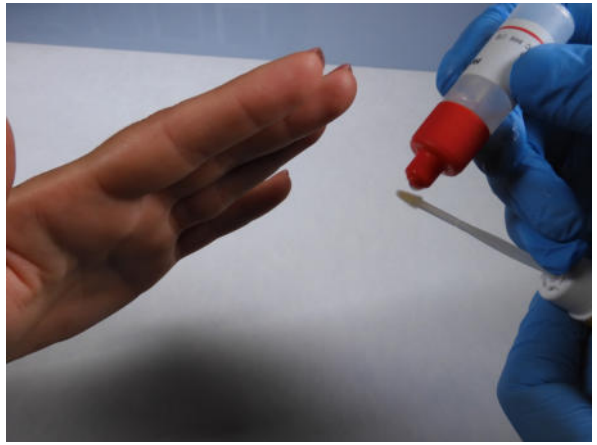
Sede	Massimo intervallo dalla violenza[1]	Modalità di prelievo				Modalità di conservazione dei prelievi
		Quanti?	Di che tipo?	Come?	Dove?	
Cavità orale	48 h (2 gg)	2	Tamponi[2] asciutti	Uno dopo l'altro, siglati cronologicamente	Strofinare negli spazi tra i denti e nel vestibolo buccale inferiore, ruotando il tampone sul proprio asse	- Riporre i prelievi ciascuno nella propria custodia / contenitore, che andrà siglata con l'identificativo del caso, del reperto e la data del prelievo. - Riporre i prelievi effettuati per ogni distretto corporeo in una busta distinta, siglata con l'identificativo del caso, sigillata e controfirmata. - Riporre tutte le buste relative ad un caso specifico in un'unica busta di adeguate dimensioni anch'essa recante l'identificativo del caso, sigillata e controfirmata. - Congelare la busta a -20°C (NB in caso di indisponibilità di congelatore a -20°C, è possibile stoccare momentaneamente per un tempo non superiore alle 24 h in frigorifero a 4-8°).
Cute (inclusa cute periorale, cute inter-femorale, scroto)	- 48 h (2 gg), ma fino a 168 h (7gg) in aree non lavate	2	Tamponi[2] Inumiditi[3]	Contemporaneamente	Strofinare sulla superficie di riferito/visibile contatto, ruotando i tamponi sul proprio asse. NB in caso di morsi o ferite i prelievi precedono la medicazione, salvo vi siano esigenze cliniche	
Genitali esterni	- 168 h (7 gg) se riferita eiaculazione sui genitali esterni o rapporto vaginale - 72 h (3 gg) se riferito rapporto anale - 48 h (2 gg) se riferito rapporto digitale o contatto cutaneo	2	Tamponi[2] inumiditi[3]	Uno dopo l'altro, siglati cronologicamente	Strofinare sulla superficie interna delle grandi e piccole labbra, ruotando il tampone sul proprio asse. NB eseguire prima di tamponi vaginali e cervicali	
Cavità vaginale	- 168 h (7 gg) se riferita eiaculazione sui genitali esterni o rapporto vaginale - 72h (3 gg) se riferito rapporto anale - 48h (2 gg) se riferito rapporto digitale o contatto cutaneo	2	Tamponi[2] asciutti[3]	Uno dopo l'altro, siglati cronologicamente	Strofinare ripetutamente sulle pareti del terzo prossimale del canale vaginale, ruotando il tampone sul proprio asse. NB eseguire prima di tamponi cervicali	
Cervice	- 168 h (7 gg) se riferita eiaculazione sui genitali esterni o rapporto vaginale - 72h (3 gg) se riferito rapporto anale	2	Tamponi[2] asciutti[3]	Uno dopo l'altro, siglati cronologicamente	Con l'ausilio di speculum, strofinare nel canale cervicale, ruotando il tampone sul proprio asse	

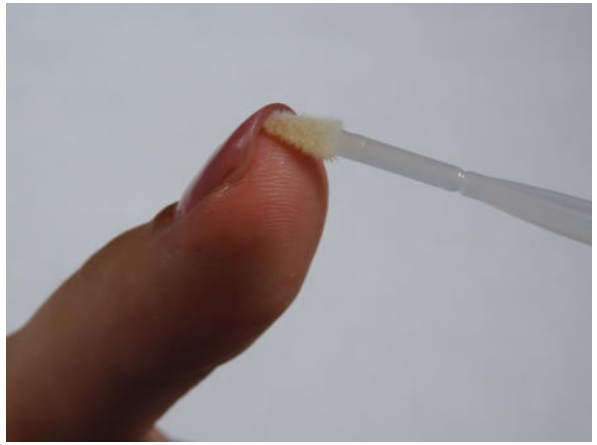
Tabella 2. Tabella riassuntiva relativa al repertamento di indumenti ed altro materiale di interesse (punti B, C, D)

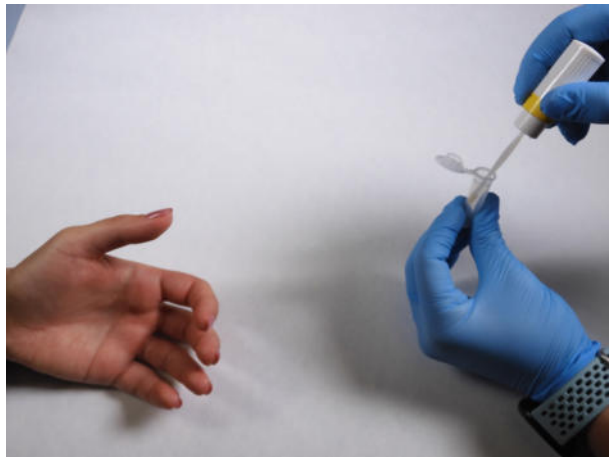
Sede	Massimo intervallo dalla violenza[1]	Modalità di prelievo
Indumenti (se indossati al momento del fatto e sulla base del racconto)	- Illimitatamente	Far spogliare la vittima su telo sterile o lenzuolo di carta. Fare asciugare all'aria gli indumenti umidi o bagnati e conservarli singolarmente in buste di carta o scatole di cartone (una per indumento, siglata con l'identificativo del caso, sigillata e controfirmata) a temperatura ambiente. Se è impossibile asciugare gli indumenti, riporli singolarmente in buste o contenitori di plastica (una per indumento, siglata con l'identificativo del caso, sigillata e controfirmata) e congelare quanto prima a -20°C (è possibile stoccare momentaneamente per un tempo non superiore alle 24 h in frigorifero a 4-8°).
Oggetti (fazzoletti, condom, speculum etc..)	- Illimitatamente, se recanti tracce evidenti o verosimili	Porre in contenitori sterili di dimensioni adeguate (ad es. falcon monouso, barattoli, etc.) e conservare in congelatore a -20°C. In caso di condom si precisa di chiuderne l'estremità (ad es. mediante nodo) per evitare la fuoriuscita di eventuale liquido seminale (NB dopo questa operazione è obbligatorio cambiare i guanti).
IVG, aborto spontaneo, parto	//	Procedere al repertamento di materiale abortivo/placenta/funicolo fetale (IVG, aborto spontaneo) e sangue neonatale (parto). Materiale abortivo/placenta/funicolo devono essere riposti singolarmente in contenitori sterili di dimensioni adeguate, evitando sangue in eccesso, senza liquido conservante (ad es. formalina o soluzione fisiologica) e congelati a -20°C. Prelevare in caso di parto alcune gocce di sangue neonatale da apporre su carta bibula (es. Guthrie card), da far essiccare e conservare a temperatura ambiente.

Nota: [1] Anche in caso di rapporti protetti.









Ci sono fac-simile di: 1) consenso/dissenso; 2) scheda repertamento; 3) scheda catena custodia.

E’ stata chiesta la loro ricezione al posto dell’allegato C del DPCM del 24,11,2017;

Traduzione in inglese per valutazione da parte di un board dell’ISGF;

SINTESI ATTIVITA' PRESIDENTE

- Partecipazione inaugurazione Laboratorio Centrale per la Banca Dati del DNA "Grazia De Carli", Roma, 30 marzo 2023;

- Partecipazione (da remoto) al Workshop itinerante "Certificazione e qualità del dato scientifico nella aule di giustizia'', Messina, 27 aprile 2023;

- Partecipazione al 3° Convegno Intergruppi SIMLA, Pula (CA), 28-30 settembre 2023;

AZIENDA OSPEDALIERA SANTA MARIA TERNI

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA
DIP. MEDICINA E CHIRURGIA

ESERCIZI COLLABORATIVI Ge.F.I

Dott.ssa Eugenia Carnevali

XXIX Congresso Ge.F.I.
LA GENETICA FORENSE AL SERVIZIO
DELLA PERSONA FRAGILE
Messina, 09-11 Novembre 2023

“ INTRODUZIONE DELLE FREQUENZE ITALIANE SU PIATTAFORMA ONLINE STRidER ”
Prof.ssa Luciana Caenazzo UniPD

“A Ge.F.I. COLLABORATIVE STUDY ON THE REPRODUCIBILITY AND ACCURACY OF A DNA-METHYLATION-BASED AGE-PREDICTIVE ASSAY FOR IMPLEMENTATION IN ROUTINE FORENSIC CASEWORK”
Prof. Silvano Presciuttini UniPI

STRidER

STRs for identity ENFSI Reference database, v2/R2

Welcome to STRidER!

STRidER (**STR**s for **Id**entity **E**NFSI **R**eference Database) is the expanded and enhanced version of the ENFSI STRbASE (2004-2016). This curated online high quality STR allele frequency population database enables scientifically reliable **STR genotype probability estimates** and provides **quality control** of autosomal STR data. A suite of software tools has been developed at the Institute of Legal Medicine, Medical University of Innsbruck to scrutinize STR population data and thus increase the quality of datasets to ensure reliable allele frequency estimates. STRidER acts as **frequency database and software platform** for the development of novel tools for STR data QC and other forensic analyses.

Forensic Science International

Volume 156, Issues 2–3, 27 January 2006, Pages 266-268

Announcement of population data

Validation of a large Italian Database of 15 STR loci

Silvano Presciuttini [a 1], Nicoletta Cerri [b 2], Stefania Turrina [c 2],

Forensic Science International: Genetics 7 (2013) e15–e18

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsig

Forensic Population Genetics—Short Communication

The 2011 GeFI collaborative exercise. Concordance study, proficiency testing and Italian population data on the new ENFSI/EDNAP loci D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045

DATABASE ITALIANO con 30/32 STRs su piattaforma online STRidER

ELENCO STRs

- D3S1358,
- D1S1656,
- D2S441,
- D10S1248,
- D13S317,
- D16S539,
- D18S51,
- D2S1338,
- CSF1PO,
- TH01,
- VWA,
- D21S11,
- D7S820,
- D5S818
- TPOX,
- D8S1179,
- D12S391,
- D19S433,
- FGA,
- D22S1045,
- SE33
- D2S1360,
- D3S1744,
- D4S2366,
- D5S2500,
- D6S474,
- D7S1517,
- D8S1132,
- D10S2325,
- D21S205

HDPlex Qiagen

- Penta D
- Penta E

Opzionali

LABORATORI PARTECIPANTI

- Bologna
- Brescia
- Caserta
- Modena
- Napoli
- Novara
- Padova
- Pisa
- Roma Tor Vergata
- Terni
- Torino

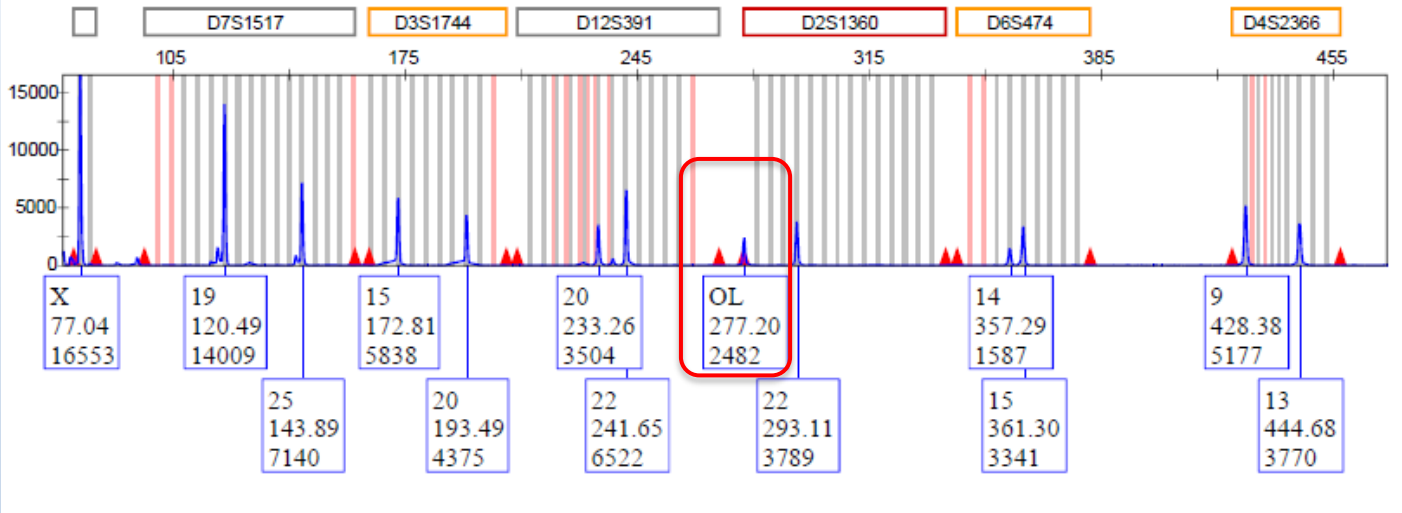
Richieste STRidER

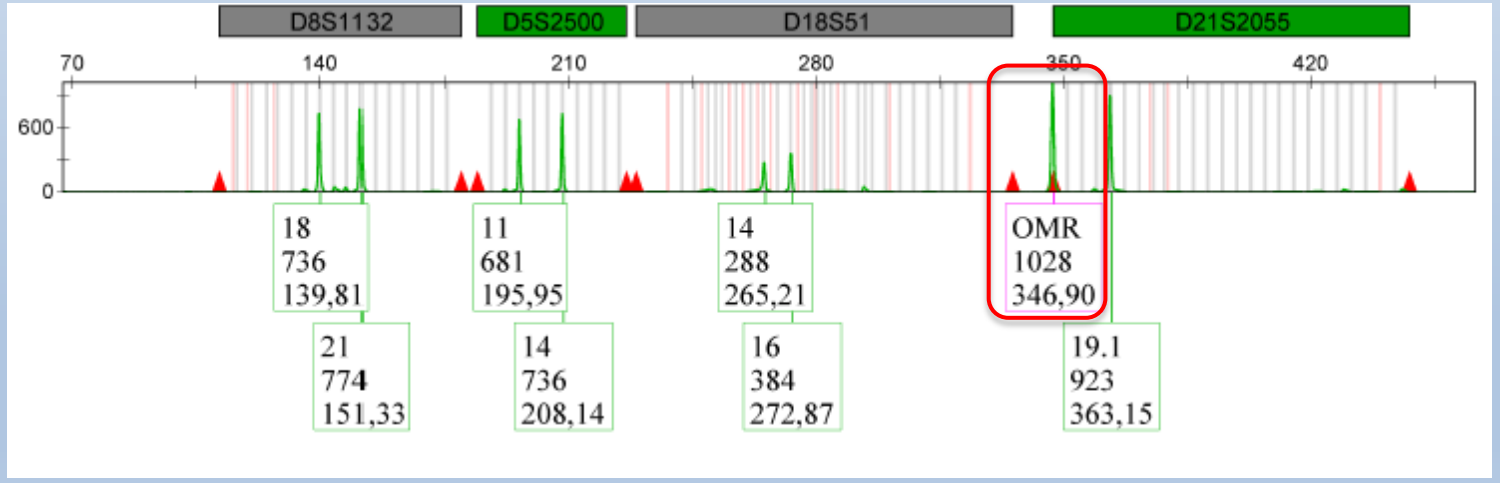
- **Informed consent:**
  We can only accept data where every individual has signed informed consent.
  We need to see the blank forms (no individual data or signatures) that have been signed, in your case all the blank forms from the different labs, plus a written confirmation that all individuals have signed.
- **Ethical approval:**
  We can only accept data where ethical approval has been granted.
  We need the names of the institutions and reference numbers, covering all samples.
- **Data:**
  We can only accept unshuffled data (original genotypes) for which raw data (electropherograms) are available and can be sent on request.
- **High quality Data – QC control**

Errori riscontrati e raccomandazioni

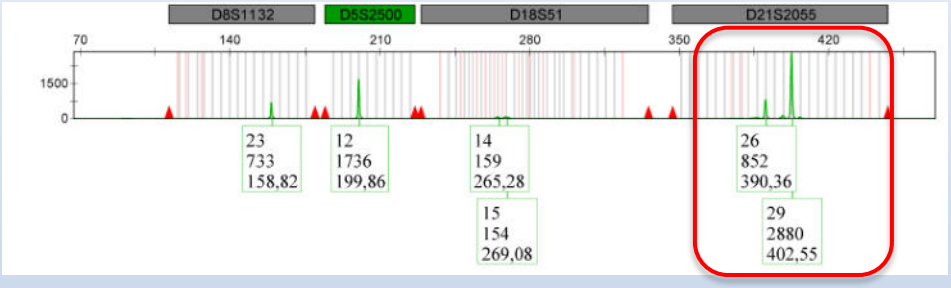
- **non-ascending allele pairs**. Alleles have to be reported in ascending manner (e.g, 9|12 and not 12|9);
- **incomplete genotypes**. Only complete genotypes are accepted for databasing (2 alleles per locus for all loci);
- **unclear allele name(s).** Only numbers can be used (OL OMR)
- t**ri-allelic genotype** will not be considered for frequency calculations. It woudl be easiest to delete the entire genotype as described in [https://www.isfg.org/Publication;Bodner2016]
- please use "." and not "," for incomplete alleles (16.3 not 16,3)
- **unobserved or very uncommon alleles** (allele combinations) in the dataset require inspection.
- **electropherograms (EPGs) of the complete submitted genotypes**.
- Please also include **allelic ladders** (one per sample, that has run on the same plate with the sample), **allele calls and base lengths for all peaks** (for samples and ladders) in the pdfs/screenshots and send the **EPG for the internal length standard**
- **please cross-check your submission with the electropherograms**
- **High quality data -** correct typing is not enough.

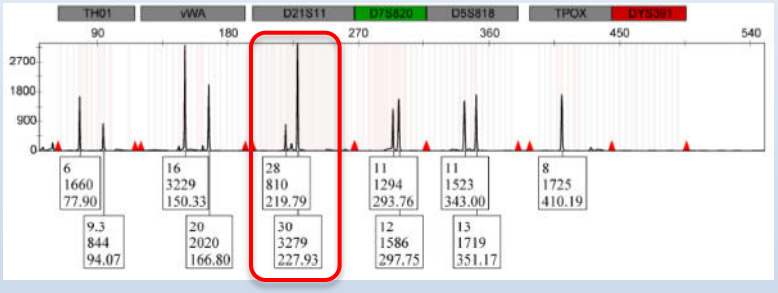
OMR(outside marker range) e OL (off ladder)

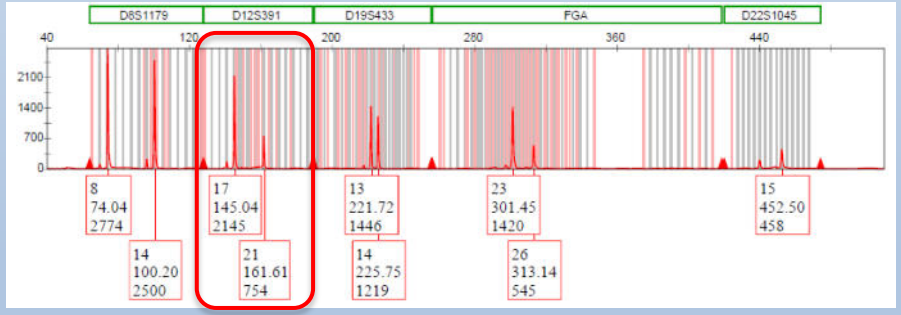


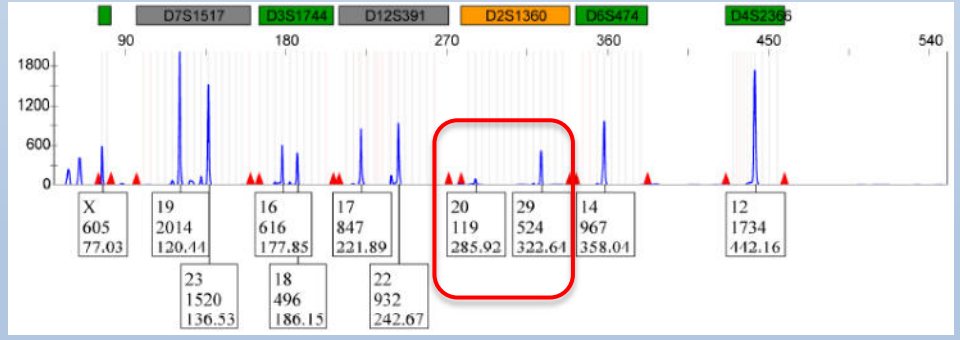


POOR SISTER ALLELE BALANCE





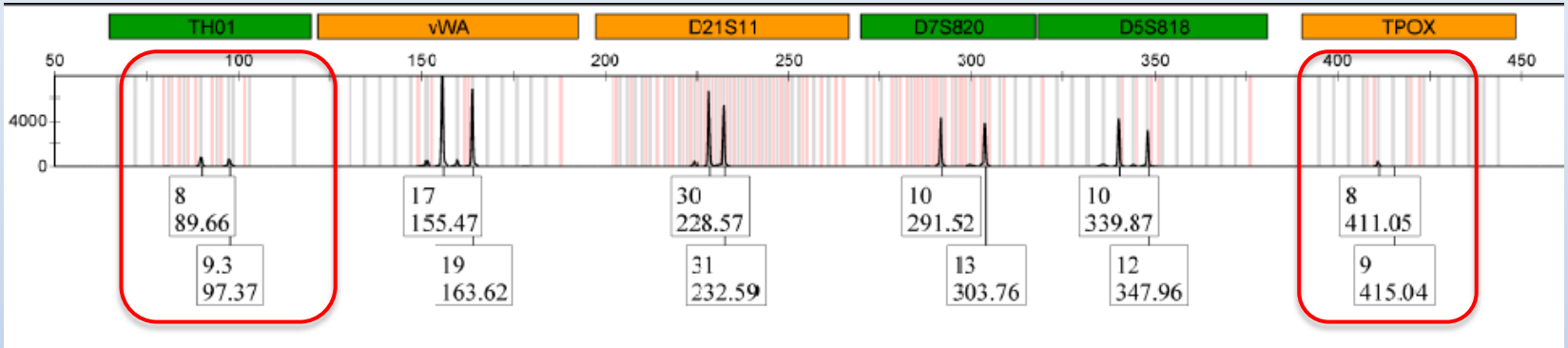


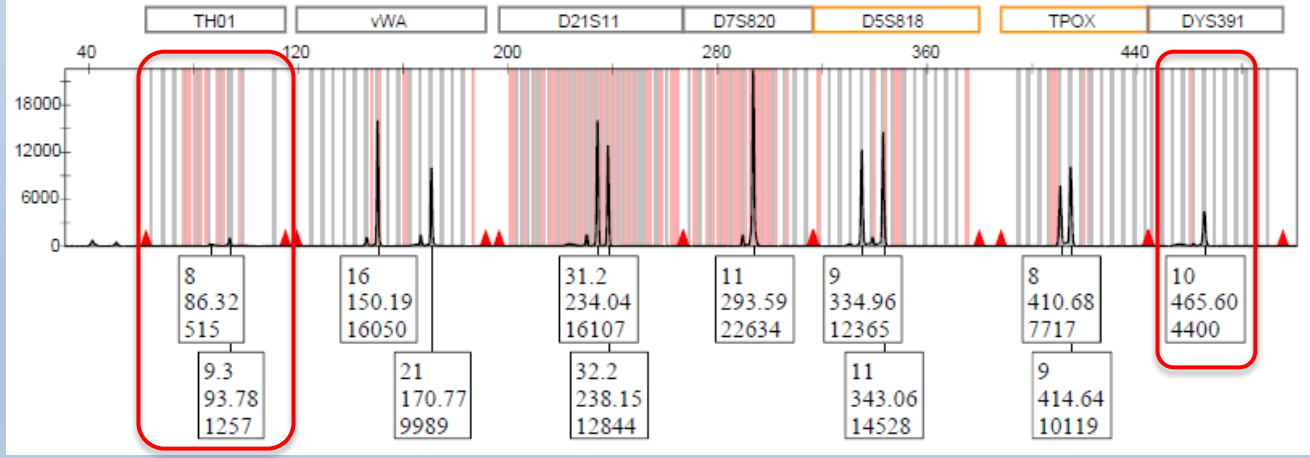


SPLIT PEAKS

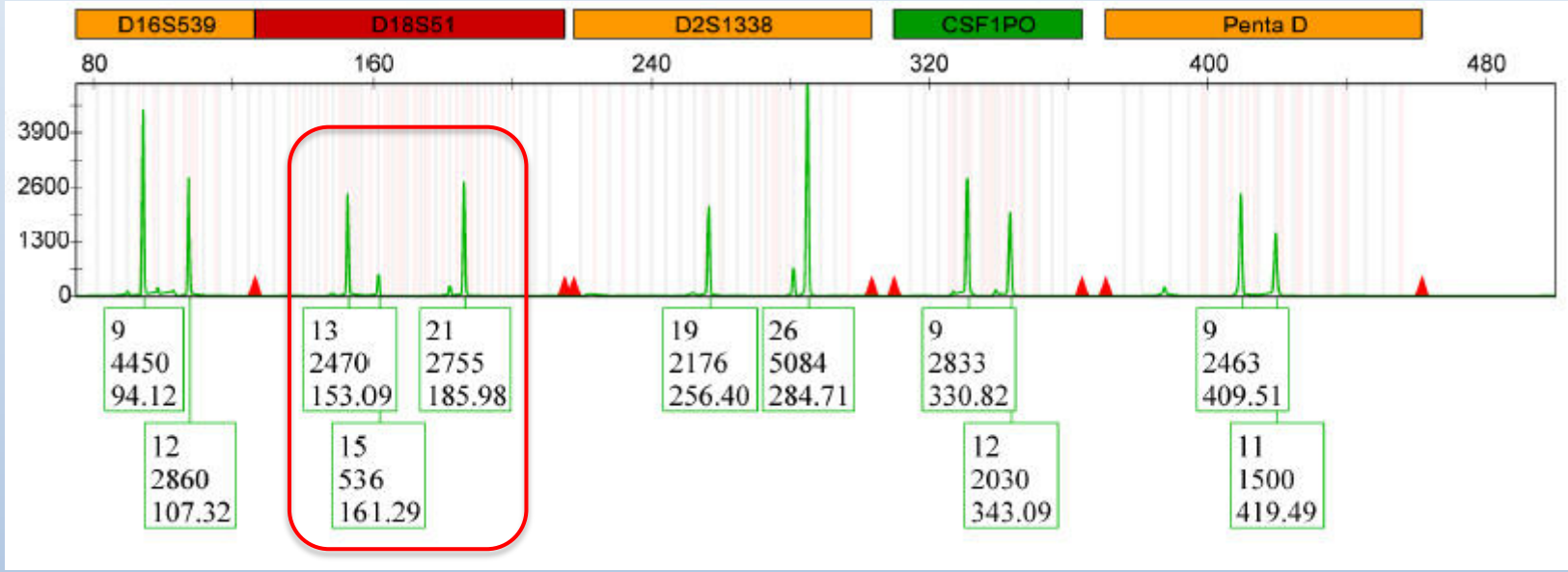
AM
D3S1358
D1S1656
D2S441
D10S1248
D13S317
Penta E
80
160
240
320
400
480
12000
8000
4000
0
X 6951 79.84
Y 4772 86.07
15 6281 122.55
17 5089 130.98
15 12547 181.92
11 4353 223.92
14 3670 236.28
15 4943 283.45
16 8885 287.41
10 5818 325.29
12 8277 333.54
8 3518 382.28
13 2237 406.61
D7S1517
D3S1744
D12S391
D2S1360
D6S474
D4S2366
90
180
270
360
450
540
18000
12000
6000
0
X 17073 77.17
23 3985 135.78
25 4292 143.66
17 3409 181.66
18 2667 185.75
20 7173 234.87
22 5741 243.11
22 5434 294.07
27 5444 314.19
14 5531 357.27
16 5189 365.23
13 9568 446.07
D8S1132
D5S2500
D18S51
D21S2055
19 18157 143.18
12 8287 199.33
14 11514 207.43
16 4741 269.63
18 4600 277.23
25 5774 385.41
26 4454 393.49

IMBALANCED STR PROFILE

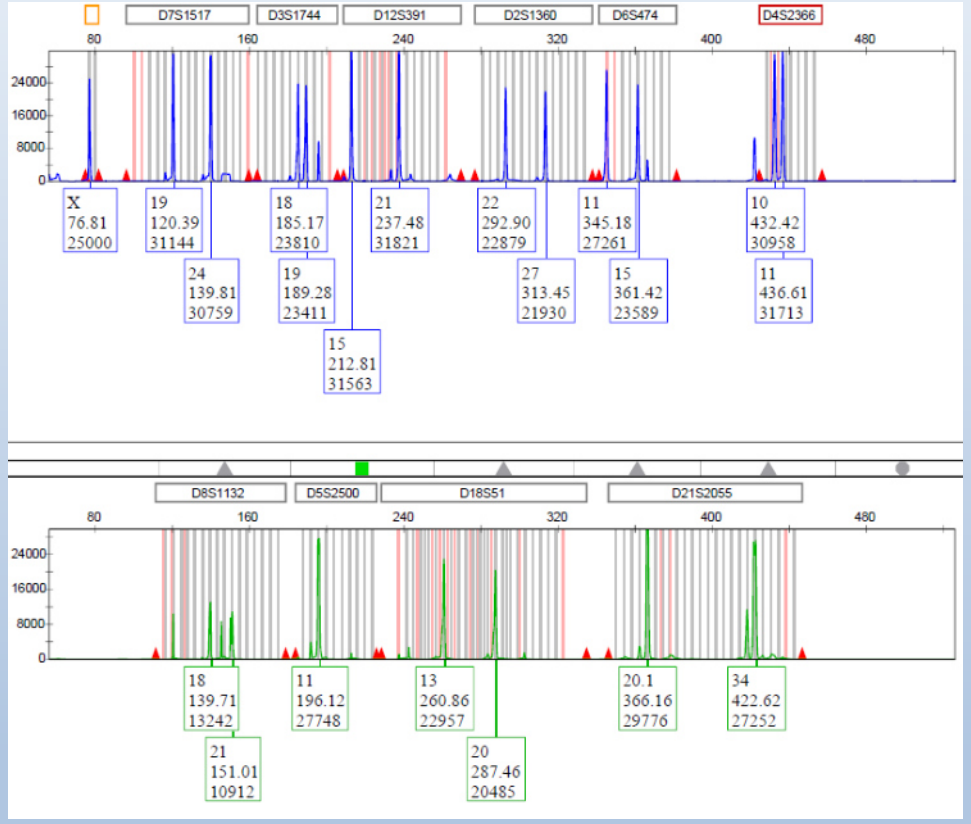




TRI ALLELIC PATTERN



NOISY STR PROFILE



Forensic Science International: Genetics 30 (2017) 148–151

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

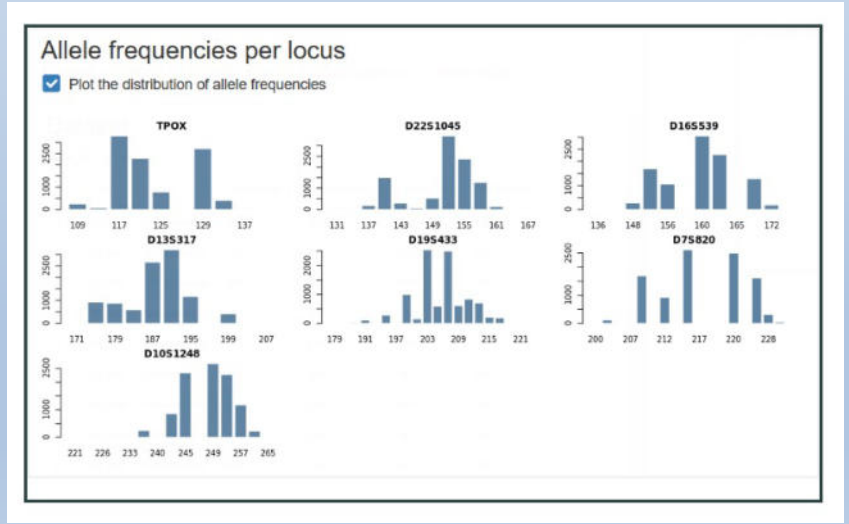
journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsig

Short communication

STRAF—A convenient online tool for STR data evaluation in forensic genetics

Alexandre Gouy[a,b], Martin Zieger[c,*]

With STRAF (STR Analysis for Forensics), we provide the forensic genetics community with a freely accessible online tool, that can compute all the statistics necessary to check the validity of an autosomal population data set at once, based on a single input file. In addition to the analysis of autosomal STR data, the program



CONCLUSIONI E OSSERVAZIONI

11 LABORATORI HANNO PARTECIPATO CON UNA MEDIA DI 85 CAMPIONI PER UN TOTALE DI 930 CAMPIONI

HDPlex problemi per laboratori che non lo usano abitualmente:

- Validazione interna (quantità templato, condizioni amplificazione etc)
- Difficoltà ad acquistare un kit aggiuntivo per completare l'analisi dei 100 campioni decisi inizialmente

Criticità generali:

tempo
soldi
personale dedicato

“A Ge.F.I. COLLABORATIVE STUDY ON THE REPRODUCIBILITY AND ACCURACY OF A DNA-METHYLATION-BASED AGE-PREDICTIVE ASSAY FOR IMPLEMENTATION IN ROUTINE FORENSIC CASEWORK”

Prof. Silvano Presciuttini UniPI

METILAZIONE FASE III

Scopo di:

- confrontare, tra i vari laboratori, la determinazione dell'età vera e di quella prevista in un numero maggiore di soggetti rispetto agli 8 analizzati nella fase II;
- determinare se le deviazioni osservate fossero dovute a errori sperimentali e/o a vere differenze biologiche.

METILAZIONE FASE III

- Necessità di avere un numero maggiore di soggetti da analizzare per effettuare una valutazione più corretta del test
- Difficoltà per un solo laboratorio di reclutare un numero adeguato di soggetti disposti a sottoporsi ad un prelievo ematico invasivo ed in quantità notevole

METILAZIONE FASE III

- 7 laboratori oltre il nostro hanno aderito alla terza fase;
- ciascun laboratorio partecipante ha fornito 2 estratti in quantità sufficiente da consentirne l'analisi negli altri laboratori;
- 14 campioni + 8 campioni della fase II;
- sono stati forniti controlli metilati e non metilati per verificare l'efficienza di conversione con bisolfito.

LABORATORI PARTECIPANTI FASE III

- Ancona non ha fornito i campioni
- Brescia
- Orbassano
- Padova
- Parma RIS
- Pavia
- Terni
- Torino
- Trieste ha fornito i campioni ma non ha eseguito l'analisi

CRITICITA' LABORATORIO

RFU di lettura dei picchi (20 -50RFU)
SOGLIA ANALITICA E SOGLIA STOCASTICA
diversa per ciascun laboratorio

CONTROLLO CAMPIONE METILATO picco verde aspecifico in KLF14

CONTROLLO CAMPIONE NON METILATO picco verde in MIR29B2C

frontiers in Genetics

ORIGINAL RESEARCH
published: 25 February 2021
doi: 10.3389/fgene.2021.618955

Bisulfite-Converted DNA Quantity Evaluation: A Multiplex Quantitative Real-Time PCR System for Evaluation of Bisulfite Conversion

*Sae Rom Hong and Kyoung-Jin Shin**

Department of Forensic Medicine and Brain Korea 21 PLUS Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea

Published online 4 November 2008

Nucleic Acids Research, 2008, Vol. 36, No. 22 ***e150***
doi:10.1093/nar/gkn691

Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies

Diane P. Genereux[1,*], Winslow C. Johnson[1], Alice F. Burden[1], Reinhard Stöger[1] and Charles D. Laird[1,2,3]

[1]Department of Biology, [2]Department of Genome Sciences and [3]Center on Human Development and Disability, University of Washington, Box 351800, Seattle, WA 98195, USA

Received July 31, 2008; Revised September 24, 2008; Accepted September 25, 2008

FAILED CONVERSION

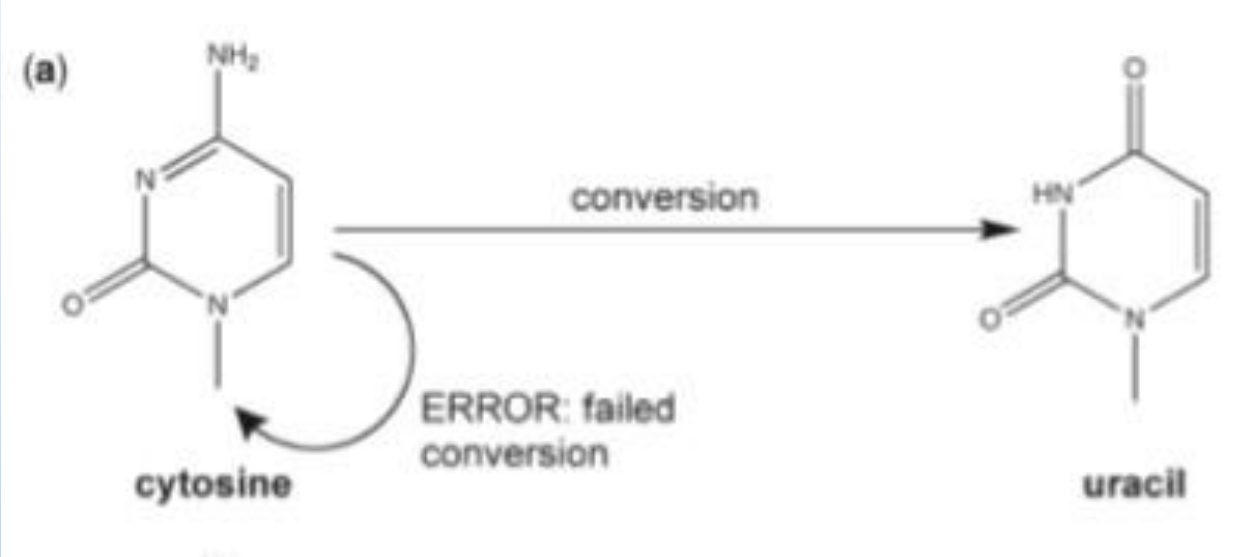


Figure 1. Responses of methylated and unmethylated cytosines to bisulfite treatment. (a) Unmethylated cytosines treated with bisulfite are either converted to uracil, or fail to be converted and remain as cytosine.

Increase the duration of bisulfite treatment

INAPPROPRIATE CONVERSION

Figure 1. Responses of methylated and unmethylated cytosines to bisulfite treatment. (b) the 5-methylcytosines treated with bisulfite either do not undergo conversion, or are inappropriately converted to thymine.

The treatment duration does not exceed the time to complete or near-complete conversion for the majority of molecules;

RISULTATI

CONSIDERAZIONI FINALI

- Migliore procedura di laboratorio: 1 conversione e 3 amplificazioni del convertito;
- Si può considerare il modello ristretto;
- Ogni laboratorio deve effettuare una retta di regressione multivariata ed inserire due punti di misura a 30 e 60 anni.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Tradizione e cambiamento al centro del Mediterraneo

UniMe 1548

Ge.F.I.

Esercizio collaborativo Ge.F.I.: "ANALISI DELLA METILAZIONE DEL DNA PER LA PREDIZIONE DELL'ETÀ BIOLOGICA"

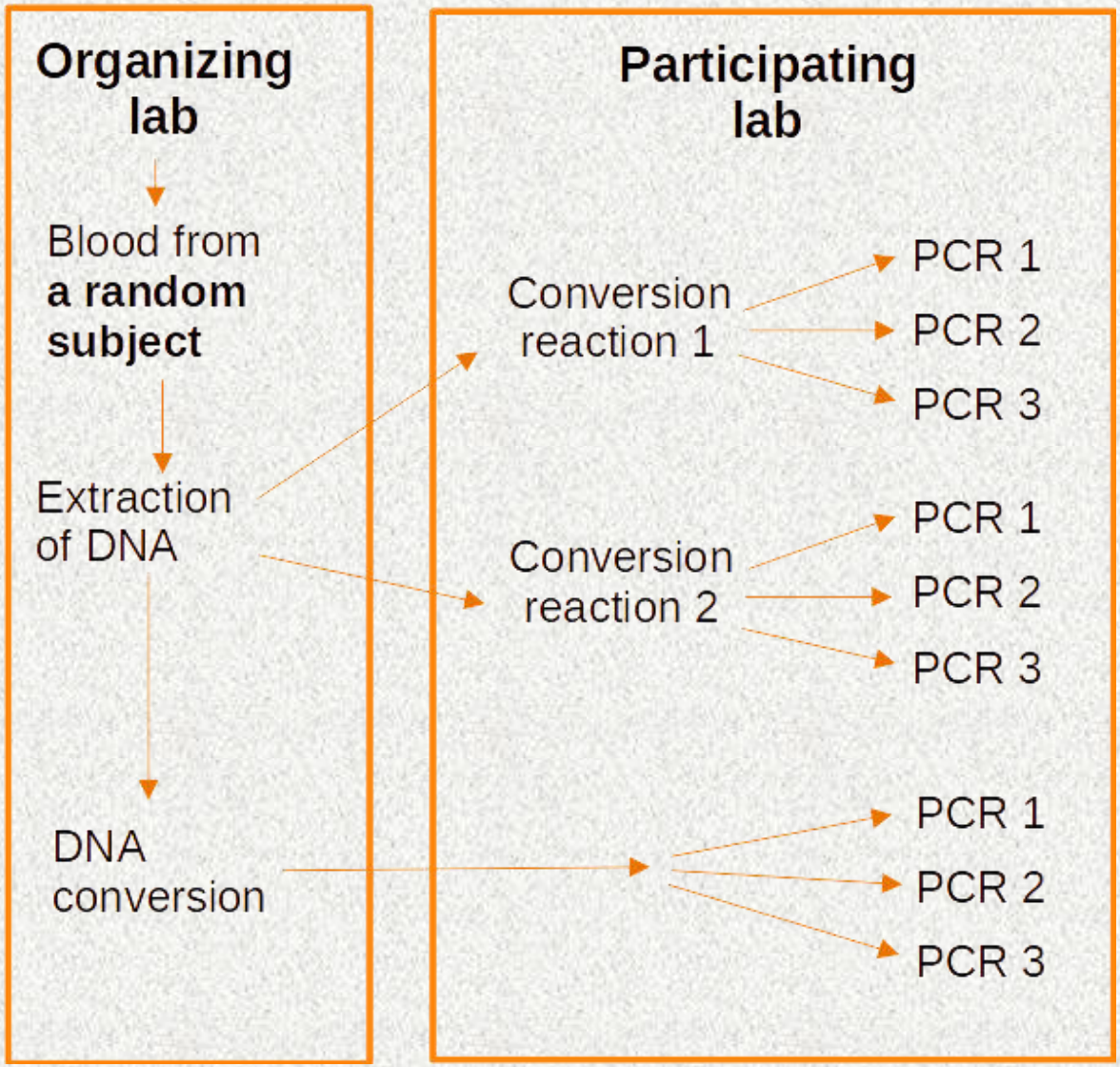
ANALISI DEI DATI

Silvano Presciuttini

UNIVERSITÀ DI PISA

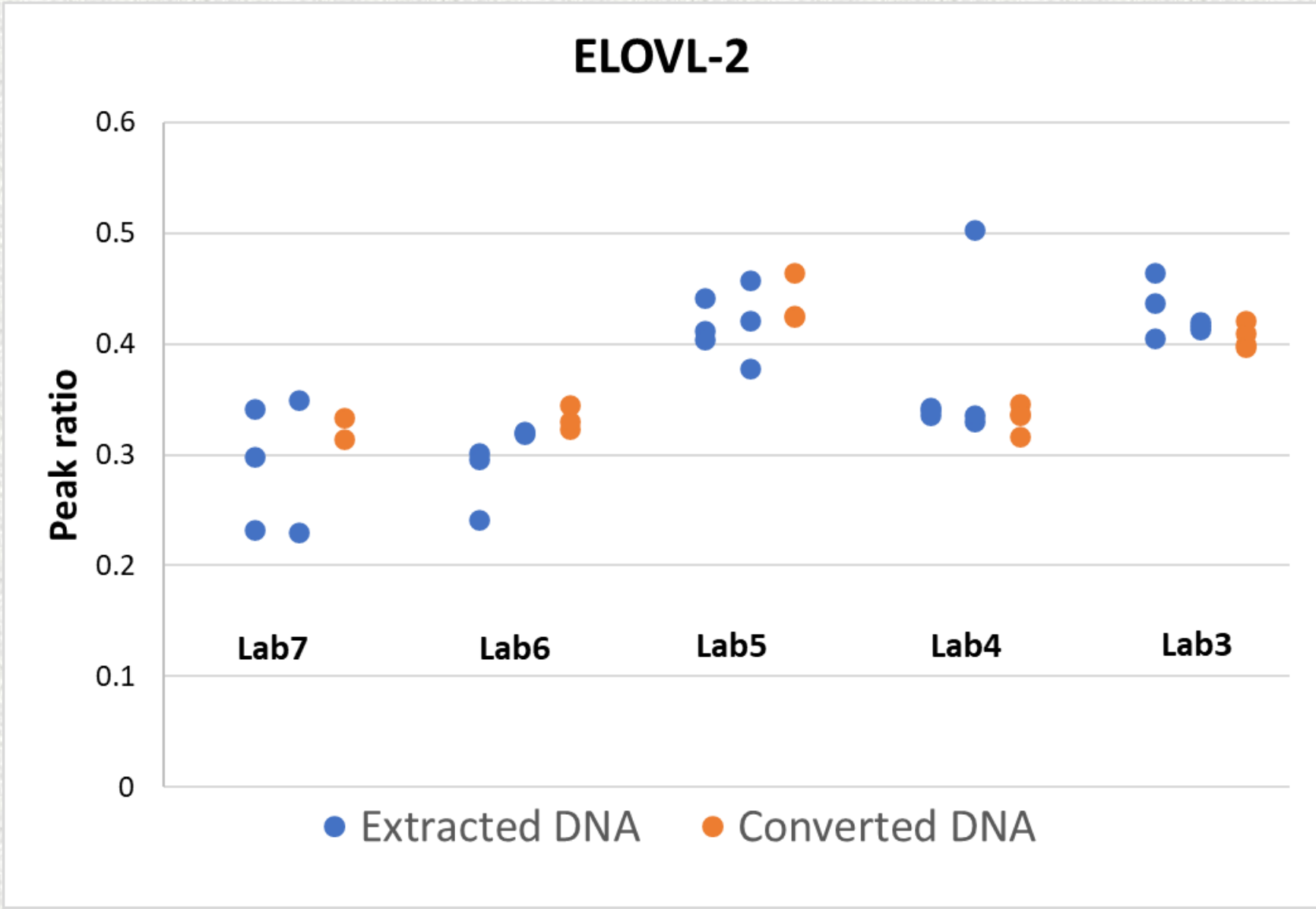
29° CONVEGNO NAZIONALE DEI GENETISTI FORENSI ITALIANI

PRIMA FASE DELLO STUDIO



LABORATORI PARTECIPANTI

- Tre PCR per ciascuno di **due esperimenti di conversione**
- Tre PCR per il **DNA già convertito** dal lab organizzatore
- **Totale: nove data-points per ciascun lab**
- **Cinque** laboratori hanno inviato i dati

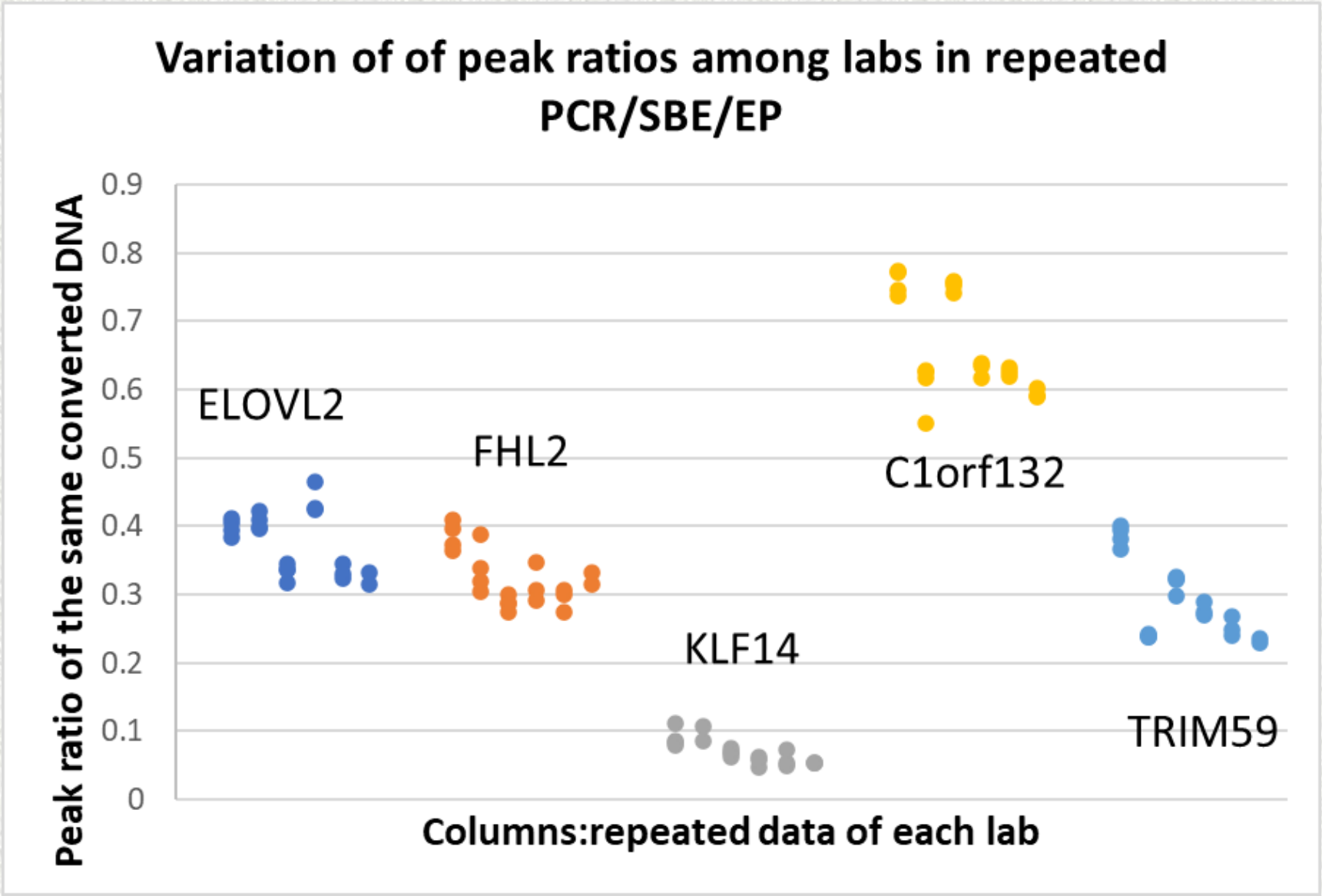

ELOVL-2
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Peak ratio
Lab7
Lab6
Lab5
Lab4
Lab3
Extracted DNA
Converted DNA

1) Ripetibilità delle reazioni di conversione

- I test *t* a due code (3 + 3 punti per laboratorio per locus, per un totale di 25 test) non hanno rivelato eterogeneità significativa tra le medie delle due reazioni di conversione, tranne in un laboratorio
- Questo stesso laboratorio ha fornito dati per una sola reazione in un locus e ha mostrato valori $p < 0,02$ per altri due loci.

2) Eterogeneità fra laboratori

- Il dato appariscente è la grande variazione fra laboratori, sia per i dati del convertito che per quelli dell'estratto
- Il 'convertito' consente di confrontare i dati di sei laboratori:
  - L'85% della varianza rispetto alla media di ciascun locus è dovuta alla componente inter-lab e solo il 15% a quella intra



Per ciascun locus i dati dei sei lab seguono lo stesso ordine

3) Un pattern ripetuto

- **Il pattern dei diversi loci** è chiaramente non casuale. Ad es., gli ultimi due loci, MIR29B2C e TRIM59, e il secondo e terzo loci, FHL2 e KLF14, mostrano un andamento simile.
- Un fattore che potrebbe essere almeno in parte responsabile di questo fenomeno è il diverso strumento utilizzato per l'elettroforesi (due laboratori hanno utilizzato il 310, due laboratori il SeqStudio e due laboratori il 3500)

L'effetto dello strumento

	Sopra la media	Sotto la media	Totale
310	8	2	**10**
3500	3	6	**9**
SeqS	0	10	**10**
Totali	**11**	**18**	**29**

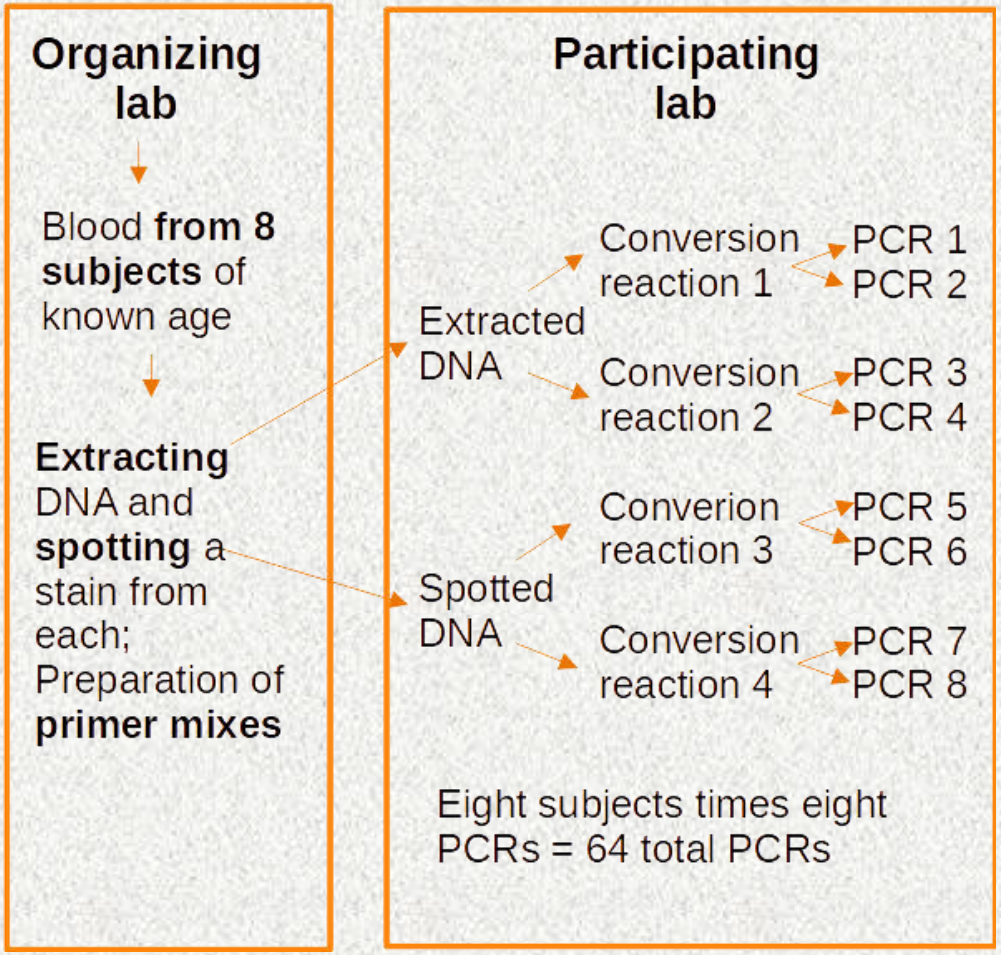
- Il numero delle deviazioni (positive o negative) delle medie dei lab dalle medie di ciascun locus dipende dallo strumento
  - Le medie dei due laboratori che hanno utilizzato SeqStudio sono sotto la media in 10 casi su 10, mentre le medie dei due laboratori che hanno utilizzato il 310 erano sopra la media in 8 casi su 10 ($p = 0.001$)

MAIN CONCLUSIONS OF PHASE 1

1. An important source of variation of the data obtained by different labs on the same DNA **is the specific instrument in use**
2. The protocol of **DNA conversion** showed some evidence of being a **moderately challenging task**
    1. one lab missed a replication experiment and showed heterogeneity between the means of two loci
    2. the MAD values were on average higher than those obtained by the same lab when DNA conversion was provided
    3. The lowest source of variation was observed in the replication of the procedures performed after the DNA had been converted by a single lab

SECONDA FASE DELLO STUDIO

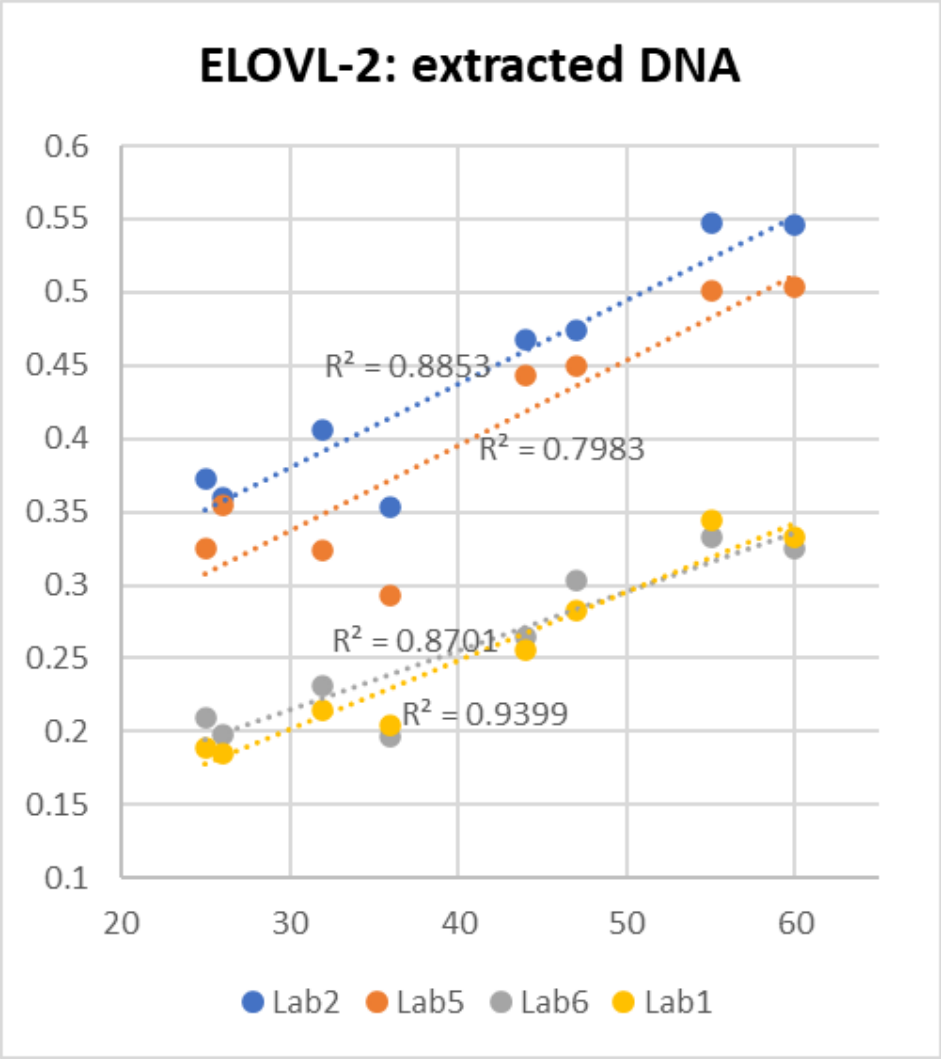
- ✓ VERIFICA DELLA RIPRODUCIBILITÀ su **otto campioni** e introduzione **dell'analisi di tracce**

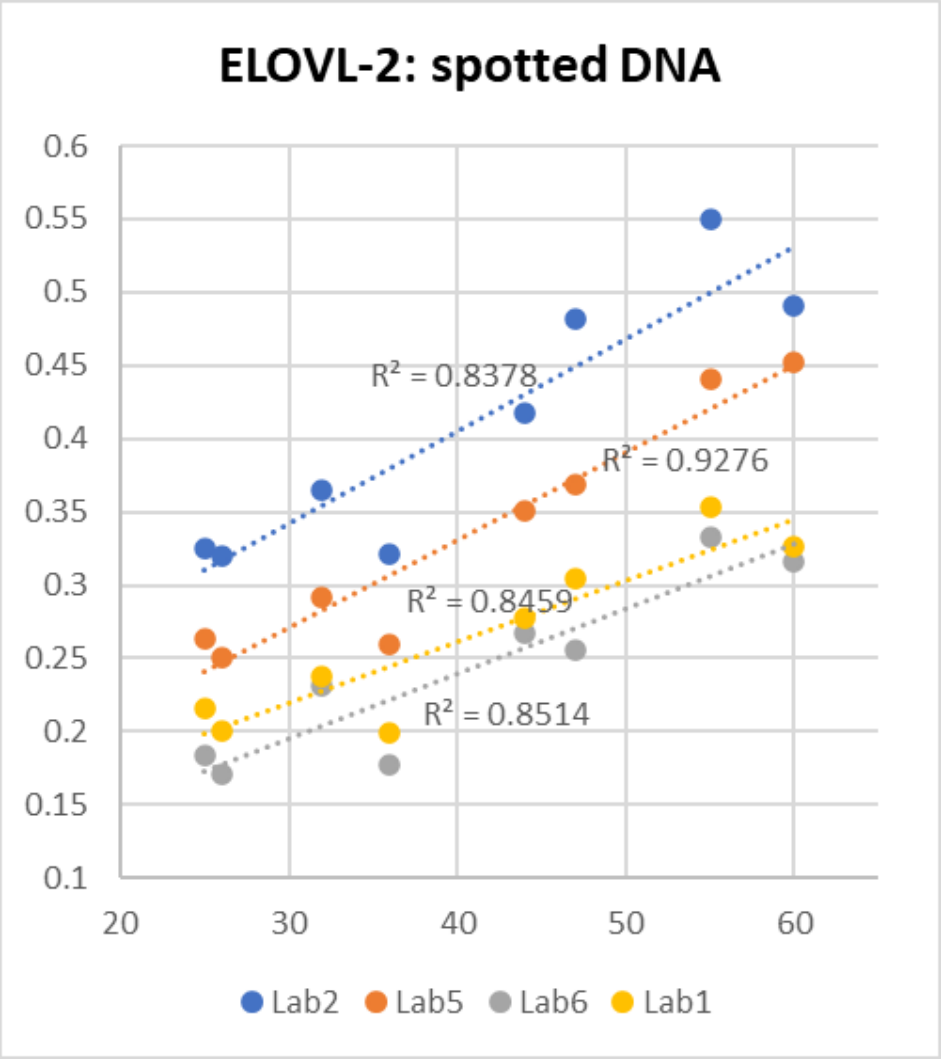


ANALISI DEI DATI

- Quattro lab hanno inviato i dati, ma per uno sono lacunosi e vengono provvisoriamente esclusi
  - **Si analizzano i dati del lab organizzatore più tre lab partecipanti (4 lab)**
- Sulla base dei risultati della prima fase si considerano da una parte **le medie** dei quattro punti sperimentali del **DNA già estratto**
- E dall'altra parte le **medie** dei quattro punti sperimentali del DNA da **macchia di sangue**

CONFRONTO ESTRATTO/MACCHIA FRA LABORATORI (LOCUS *ELOVL2*)





MAIN CONCLUSIONS OF PHASE 2

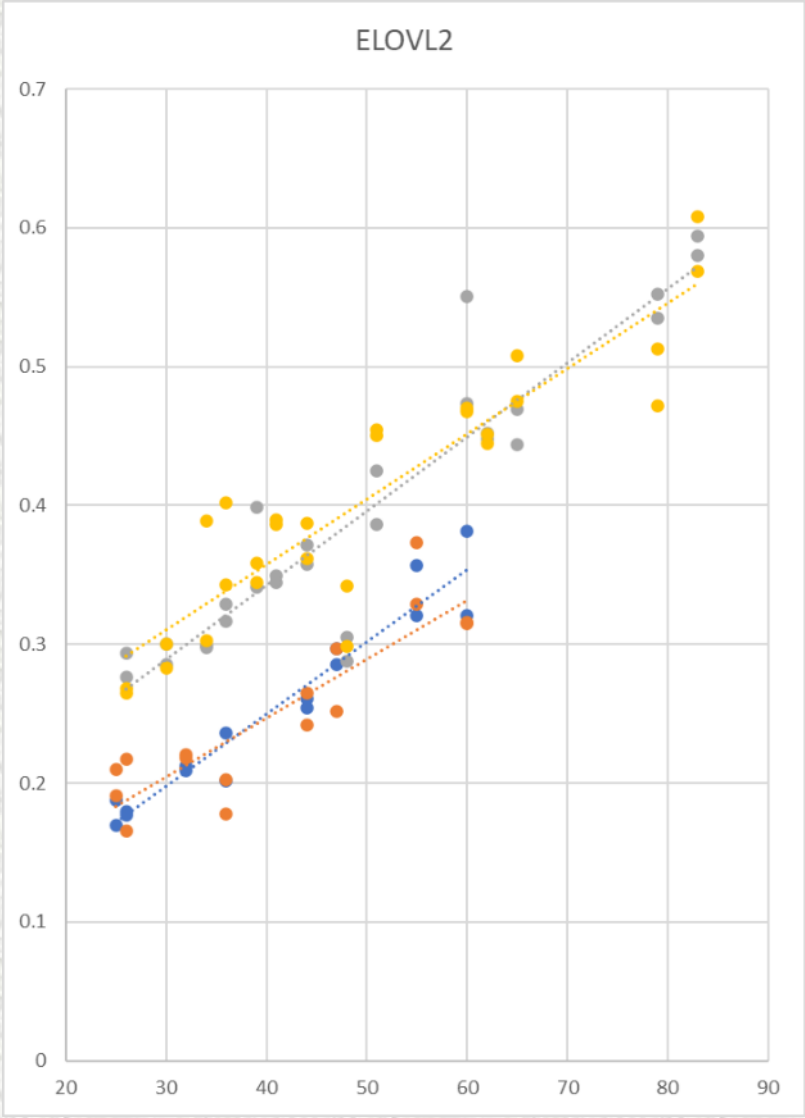
1. DNA converted from blood generally **shows less variation** among replicas than DNA converted from spots within labs
   - Both intercepts and r^2 of blot DNA are generally smaller than extracted DNA
2. However, **spotted blood is a reliable source** of DNA for age/methylation studies

TERZA FASE DELLO STUDIO

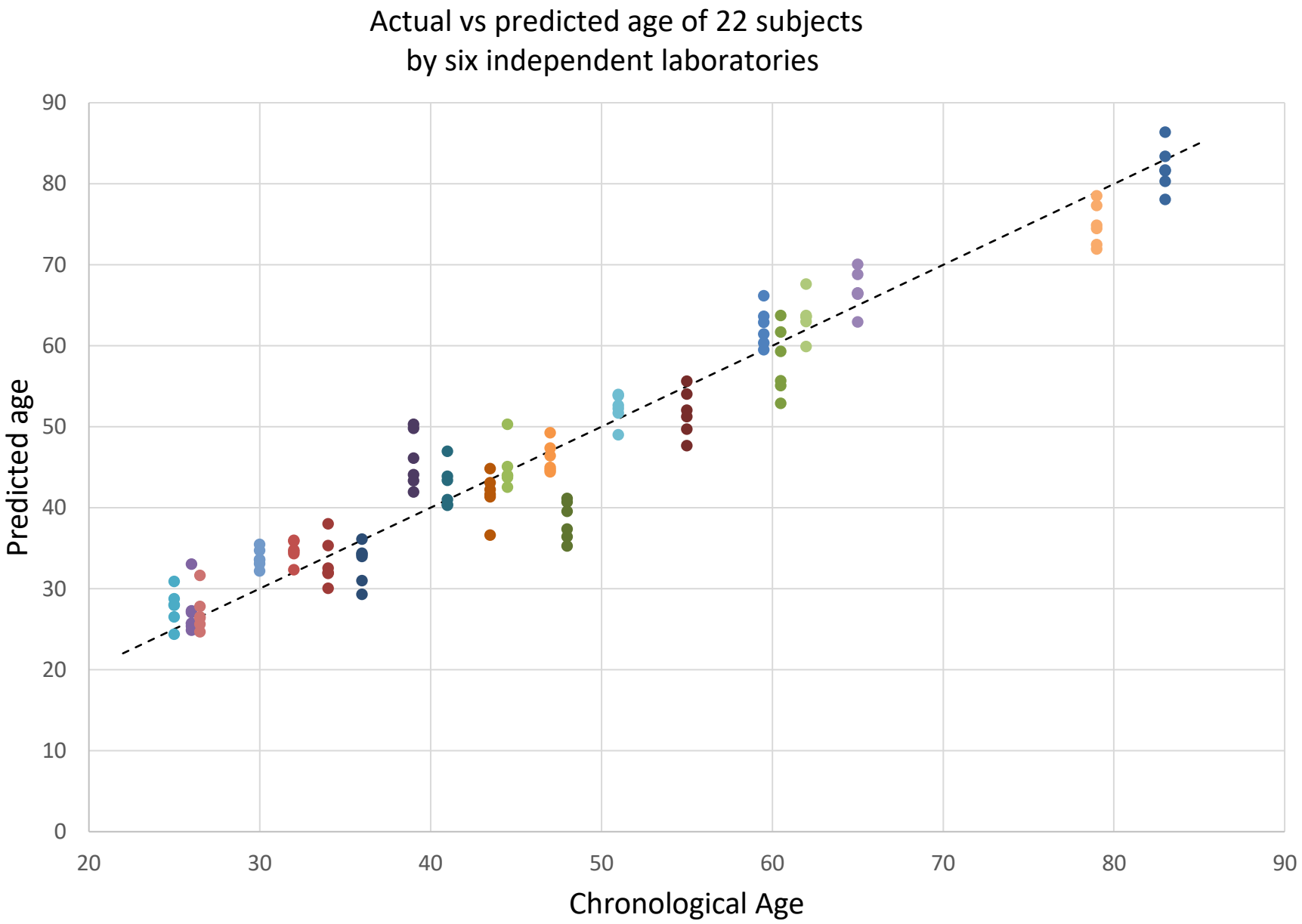
1. Sette laboratori partecipanti hanno estratto il DNA dal sangue di due individui ciascuno (14 soggetti totali) e hanno distribuito gli estratti agli altri laboratori, procedendo poi col protocollo concordato
2. I dati finali delle fasi 2 e 3 sono stati uniti, costituendo quindi un campione di popolazione di 22 individui (12 femmine e 10 maschi)
3. Sei laboratori hanno inviato dati completi

1) Visualizzazione dei dati

- Nella fase esplorativa i dati sono stati stratificati per laboratorio, per fase dello studio, per locus, e per reazione di conversione (120 rette di regressione)
  - si conferma la generale uniformità dei dati delle due conversioni
  - si rende necessaria la correzione per il fattore 'fase'



2) Regressioni multiple



Statistiche di adattamento

	Lab2	Lab3	Lab5	Lab6	Lab8	Lab9	All data	Adjusted
R Square	0.940	0.901	0.939	0.926	0.956	0.960	0.850	0.924
RMSE	4.600	5.950	4.670	5.150	3.940	3.760	6.380	4.625
MAD	3.310	4.040	3.280	3.020	2.220	2.570	5.000	3.415

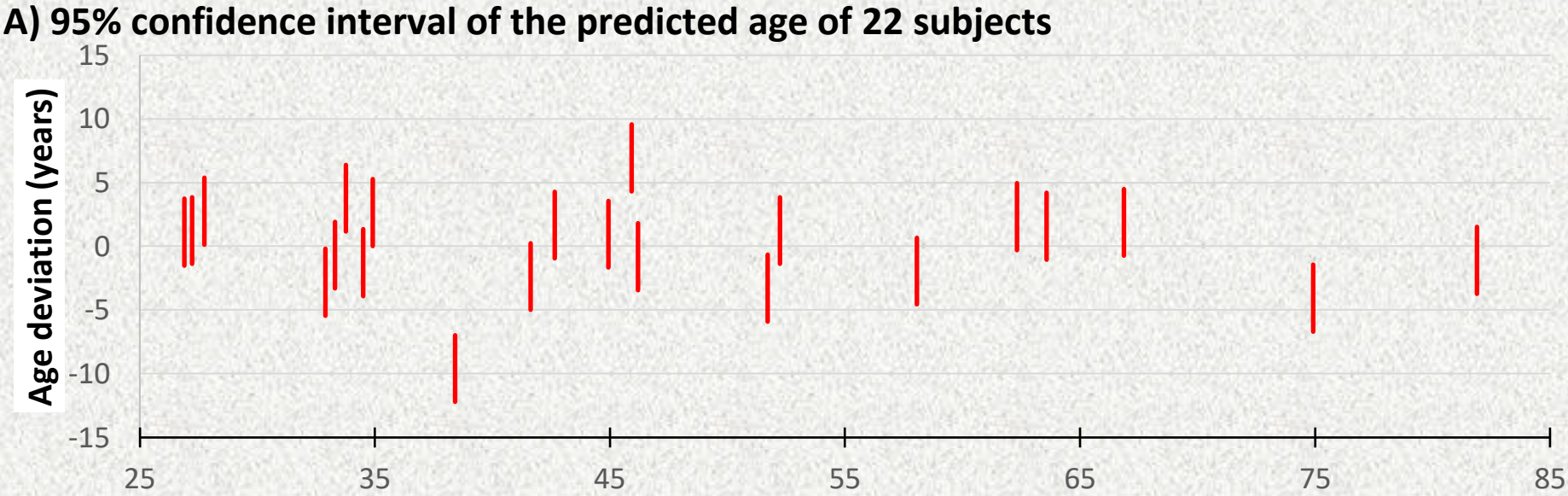
- Le statistiche riassuntive dell'adattamento del modello mostrano una certa eterogeneità tra i laboratori
- L'adattamento dell'insieme dei dati non aggiustati (All-data) è di gran lunga il peggiore
- Anche dopo l'aggiustamento per laboratorio (Adjusted) le statistiche di adattamento sono peggiori di quelle di tutti i laboratori tranne uno.

ANOVA dei residui

- Le deviazioni dalla retta di regressione dei singoli individui sono fortemente correlate fra laboratori
- L'analisi della varianza dei residui mostra che solo il 33,8% della variazione è dovuto al fattore 'laboratorio'
- Ciò significa che circa due terzi della deviazione dell'età stimata da quella cronologica è dovuta a reali differenze nei livelli di metilazione e solo un terzo è dovuto ad 'errore' sperimentale

Limiti di confidenza delle deviazioni medie

"Qual è l'intervallo di confidenza al 95% per la media di un nuovo campione di età sconosciuta, considerando i dati prodotti da sei laboratori?"



"Col 95% di probabilità il valore vero della deviazione di un nuovo campione cade in un intervallo di circa X ± 2,62 anni, dove X è la deviazione media"

3) Modello ristretto

- La ***stepwise regression analysis*** consente di costruire un modello parsimonioso che mantiene solo le variabili più rilevanti mediante un processo iterativo

LOCUS	Lab2	Lab3	Lab5	Lab6	Lab8	Lab9
ELOVL2		Y	Y	Y	Y	Y
FHL2	Y	Y				
KLF14						
MIR29B2C	Y		Y	Y	Y	Y
TRIM59	Y	Y	Y		Y	Y

- Cinque dei sei laboratori mantengono i tre loci EOVL2, MIR29B2C e TRIM59

Confronto 5-loci/3-loci

Full model (5 loci)

	Lab2	Lab3	Lab5	Lab6	Lab8	Lab9	Adjusted
R Square	0.940	0.901	0.939	0.926	0.956	0.960	0.924
RMSE	4.600	5.950	4.670	5.150	3.940	3.760	4.625
MAD	3.310	4.040	3.280	3.020	2.220	2.570	3.415

Restricted model (3 loci)

	Lab2	Lab3	Lab5	Lab6	Lab8	Lab9	Adjusted
R Square	0.936	0.890	0.936	0.914	0.952	0.955	0.915
RMSE	4.789	6.604	4.492	5.057	3.897	3.788	4.681
MAD	3.459	4.388	3.223	3.089	2.032	2.562	3.395

- Le statistiche di adattamento dei due modelli sono molto simili, in alcuni casi migliori per il modello ristretto

5) Data cross-validation

- Il metodo LOO-CV, in cui ogni soggetto viene escluso a turno dal set di dati per la predizione della sua età, consente una valutazione non distorta del modello

	Full	Restricted
R squared	0.928	0.928
RMSE	4.56	4.32
MAD	3.67	3.07

- Le medie dei dati dei sei laboratori produce statistiche di adattamento simili a quelle pubblicate. Le statistiche di adattamento diventano ancora migliori se si utilizza il modello ristretto

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

Progetto morte cardiaca improvvisa giovanile

FRANCESCA CAZZATO
Medico in Formazione Specialistica in Medicina Legale
Dottorando in Scienze Biomediche di Base e Sanità Pubblica
Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma

INDICE

Background

Progetto di studio presso la Sezione di Medicina Legale - UCSC

What’s Next?

Applicazioni pratiche

Background:
morte cardiaca improvvisa

ESC European Society of Cardiology
European Heart Journal (2022) **43**, 3997–4126
https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac262

ESC GUIDELINES

2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death

Developed by the task force for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death of the European Society of Cardiology (ESC)

Endorsed by the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC)

Authors/Task Force Members: Katja Zeppenfeld[*†] (Chairperson) (Netherlands), Jacob Tfelt-Hansen [*†] (Chairperson) (Denmark), Marta de Riva[**] (Task Force Coordinator) (Netherlands), Bo Gregers Winkel[**] (Task Force Coordinator) (Denmark), Elijah R. Behr (United Kingdom), Nico A. Blom[1] (Netherlands), Philippe Charron (France), Domenico Corrado (Italy), Nikolaos Dagres (Germany), Christian de Chillou (France), Lars Eckardt (Germany), Tim Friede (Germany), Kristina H. Haugaa (Norway), Mélèze Hocini (France), Pier D. Lambiase (United Kingdom), Eloi Marijon (France), Jose L. Merino (Spain), Petr Peichl (Czech Republic), Silvia G. Priori (Italy), Tobias Reichlin (Switzerland), Jeanette Schulz-Menger (Germany), Christian Sticherling (Switzerland), Stylianos Tzeis (Greece), Axel Verstrael (Belgium), Maurizio Volterrani (Italy), and ESC Scientific Document Group

TERMINE	DEFINIZIONE
Sudden cardiac death (SCD)	Morte naturale improvvisa che si presume sia di origine cardiaca e che si verifica entro 1 ora dall'insorgenza dei sintomi se avvenuta in presenza di testimoni, ed entro 24 ore dall'ultimo avvistamento in vita in assenza di testimoni. La SCD nei casi sottoposti ad autopsia è definita come morte naturale inaspettata di causa sconosciuta o cardiaca.
Sudden unexplained death	Morte improvvisa inspiegata in un soggetto di età superiore a 1 anno.
Sudden arrhythmic death syndrome (SADS) o autopsy-negative sudden unexplained death	Morte improvvisa inspiegata in un individuo di età superiore a 1 anno in cui gli accertamenti istopatologici e tossicologici risultano negativi.
Sudden infant death syndrome (SIDS)	Morte improvvisa inspiegata che si verifica in un individuo di età inferiore a 1 anno, in cui gli accertamenti istopatologici e tossicologici risultano negativi, così come l’analisi delle circostanze del decesso.

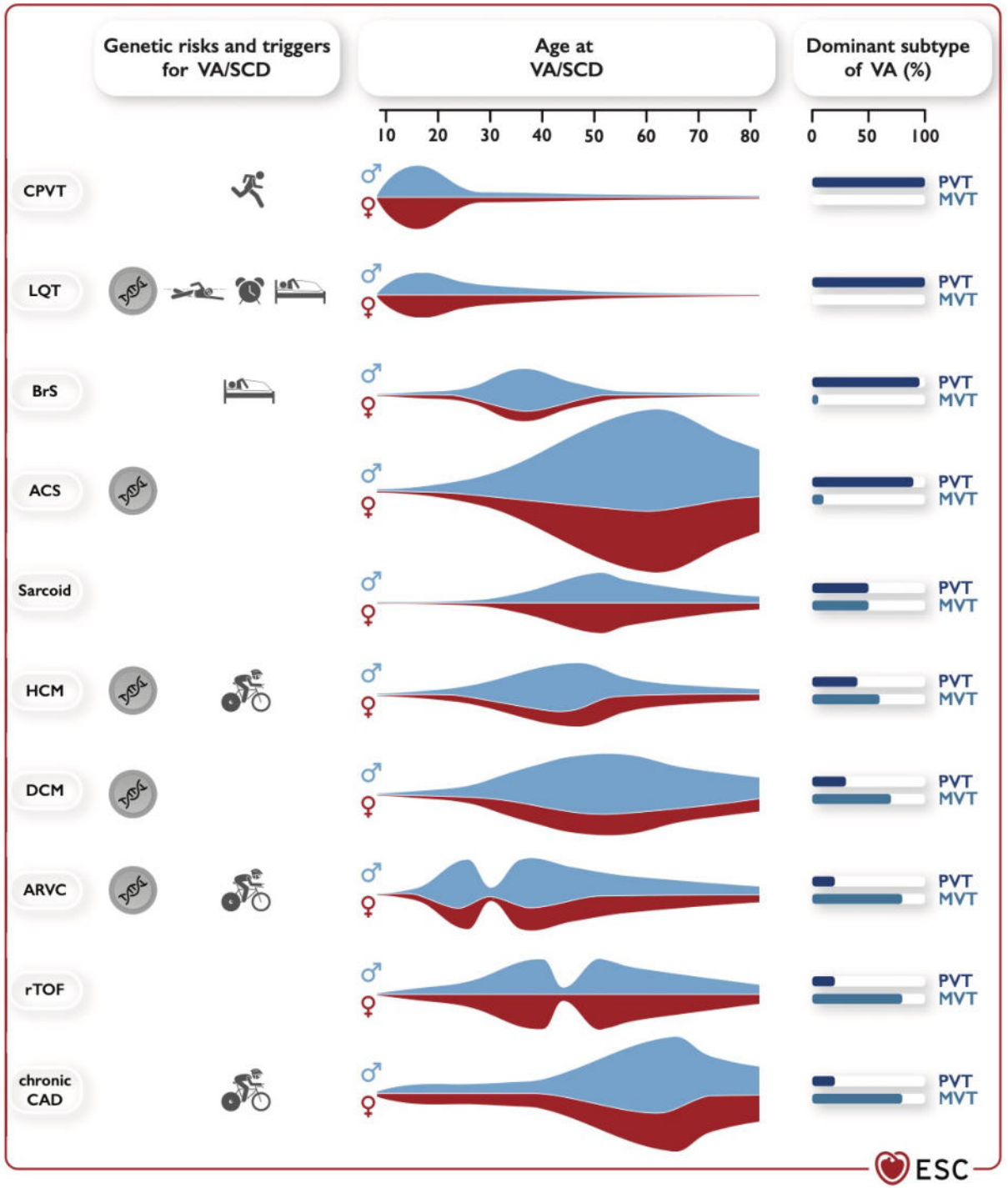
Incidenza

Infanzia e adolescenza: 1 su 100.000 persone anno:

Popolazione adulta: 50 su 100.000 persone anno

Popolazione anziana: 200 su 100.000 persone anno

A partire dai 35 anni d'età, la coronaropatia diventa la causa più comune di SCD

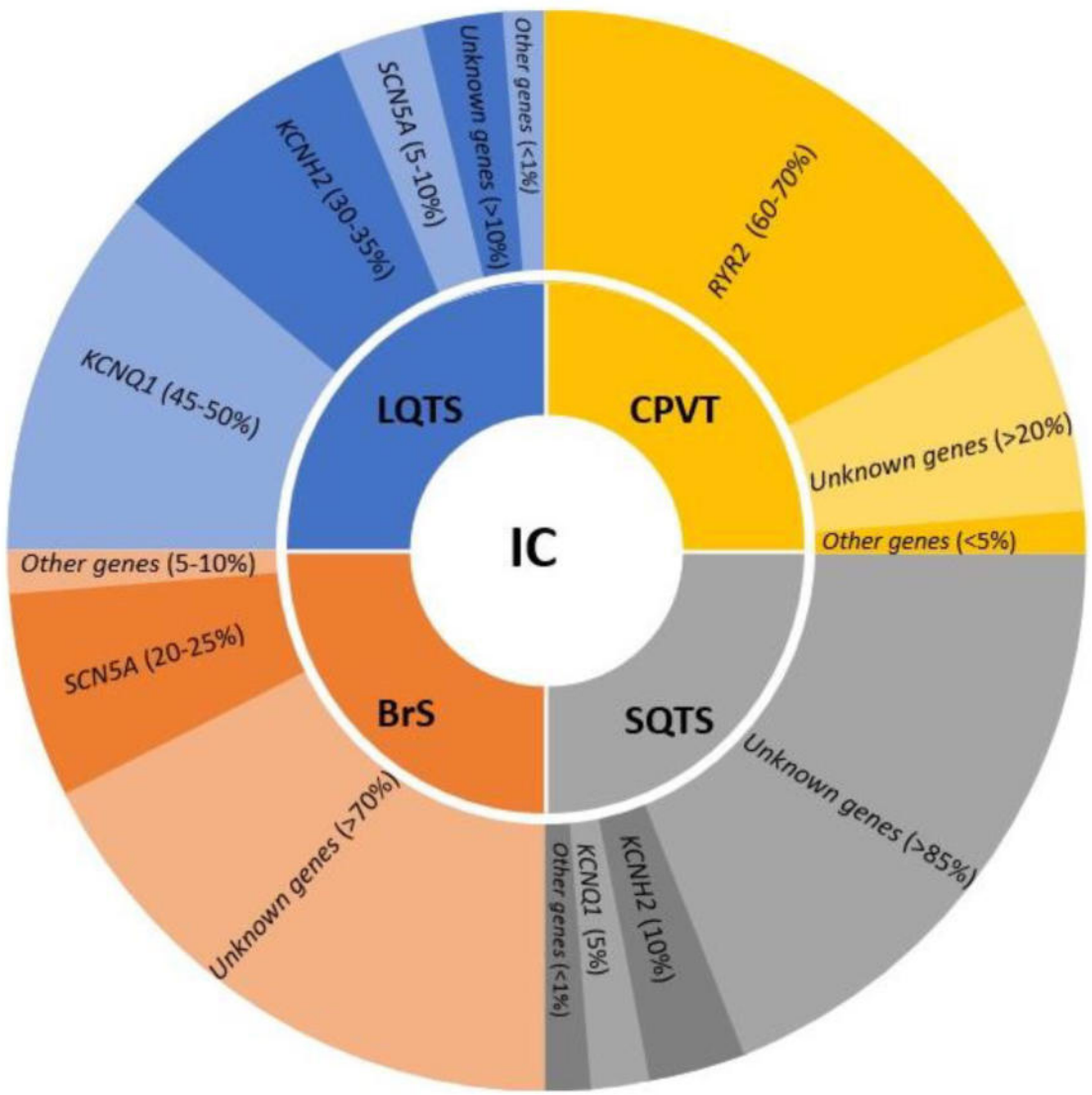


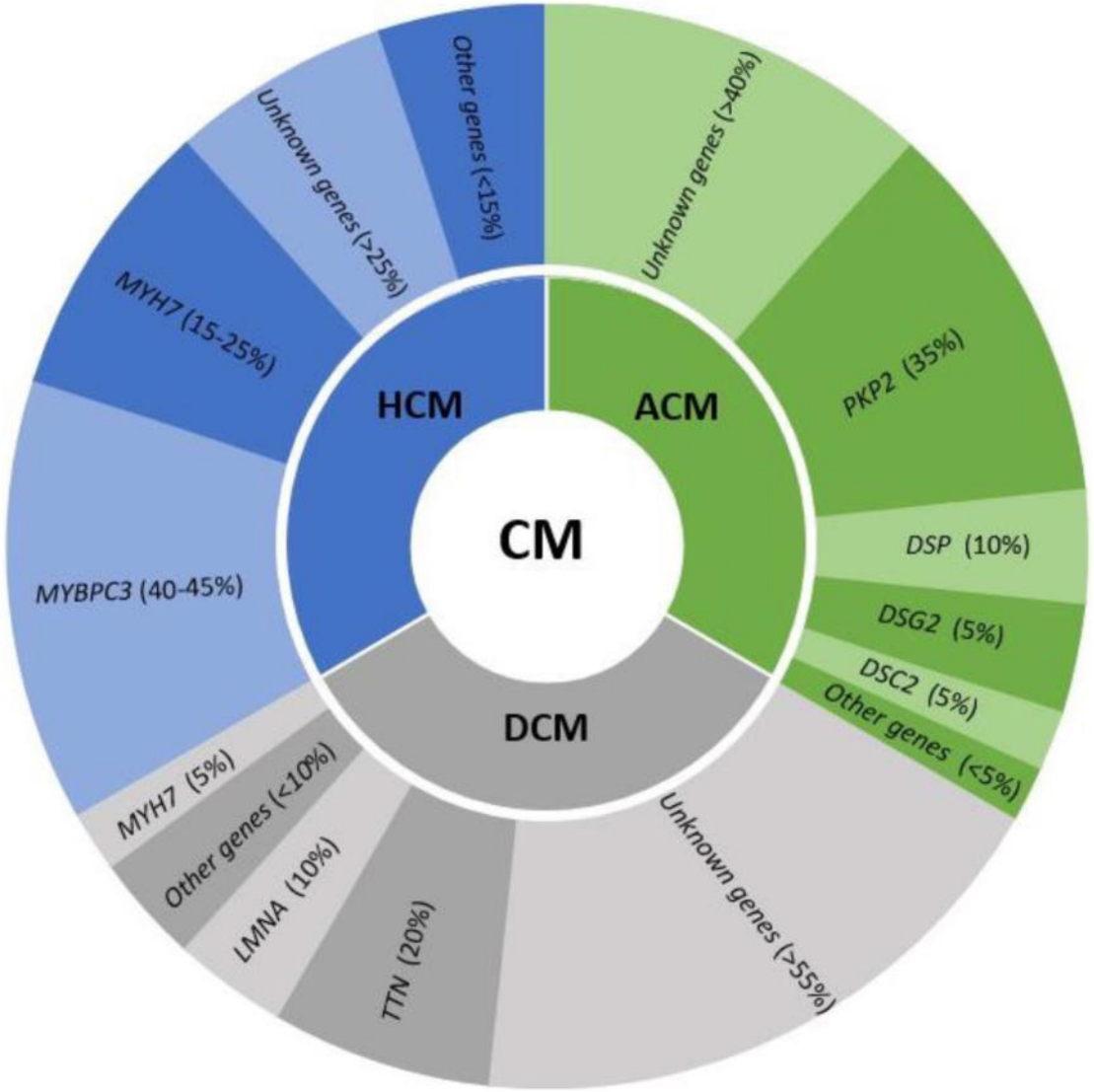
Fino al **30-50%** dei decessi nella popolazione giovanile resta **senza una spiegazione anche in seguito all'esecuzione di un'autopsia completa, comprensiva di indagini istopatologiche e tossicologiche**

Autopsia molecolare

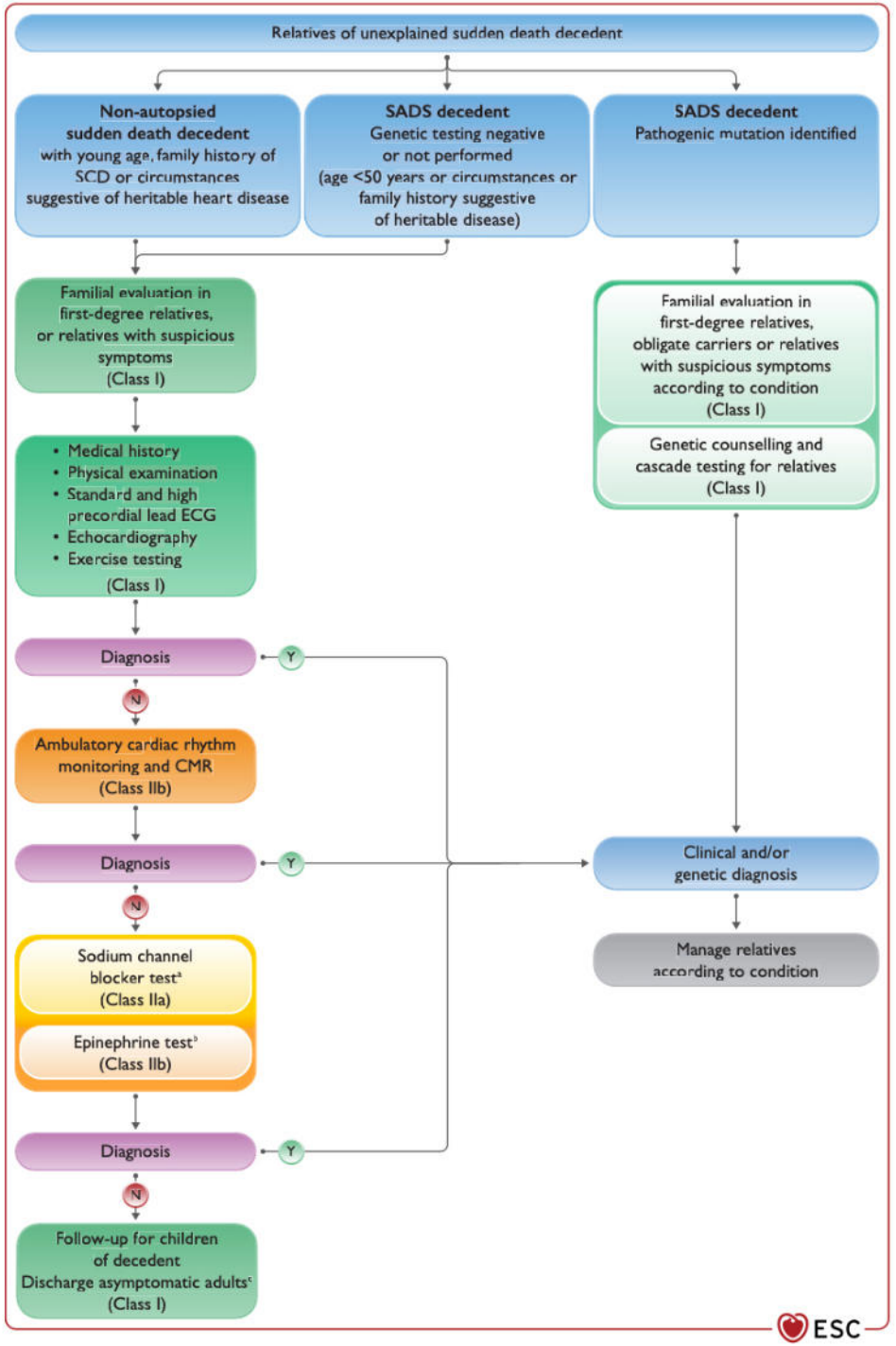
Molecular autopsy: Twenty years of post-mortem diagnosis in sudden cardiac death

Estefanía Martínez-Barrios[1,2,3], Simone Grassi[4], María Brión[5,6,7,8], Rocío Toro[9], Sergi Cesar[1,2,3], José Cruzalegui[1,2,3], Mònica Coll[10,11], Mireia Alcalde[10,11], Ramon Brugada[8,10,11,12], Andrea Greco[3,13], María Luisa Ortega-Sánchez[14,15], Eneko Barberia[14,16], Antonio Oliva[17], Georgia Sarquella-Brugada[1,2,3,10*†] and Oscar Campuzano[8,10,11*†]


IC
LQTS
CPVT
BrS
SQTS
KCNQ1 (45-50%)
KCNH2 (30-35%)
SCN5A (5-10%)
Unknown genes (>10%)
Other genes (<1%)
RYR2 (60-70%)
Unknown genes (>20%)
Other genes (<5%)
Other genes (5-10%)
SCN5A (20-25%)
Unknown genes (>70%)
Other genes (<1%)
KCNQ1 (5%)
KCNH2 (10%)
Unknown genes (>85%)


CM
HCM
ACM
DCM
MYH7 (15-25%)
Unknown genes (>25%)
Other genes (<15%)
MYBPC3 (40-45%)
Unknown genes (>40%)
PKP2 (35%)
DSP (10%)
DSG2 (5%)
DSC2 (5%)
Other genes (<5%)
MYH7 (5%)
Other genes (<10%)
LMNA (10%)
TTN (20%)
Unknown genes (>55%)

Implicazioni cliniche per i familiari



ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death

Progetto morte improvvisa giovanile

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

CRITERI DI INCLUSIONE/ESCLUSIONE

CRITERI INCLUSIONE

soggetti di età compresa 1-50 anni

autopsia eseguita entro 72 ore dal decesso

CRITERI ESCLUSIONE

morte violenta

morte da intossicazione acuta

morte naturale da causa non cardiaca

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

ANAMNESI

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

ESAME ESTERNO

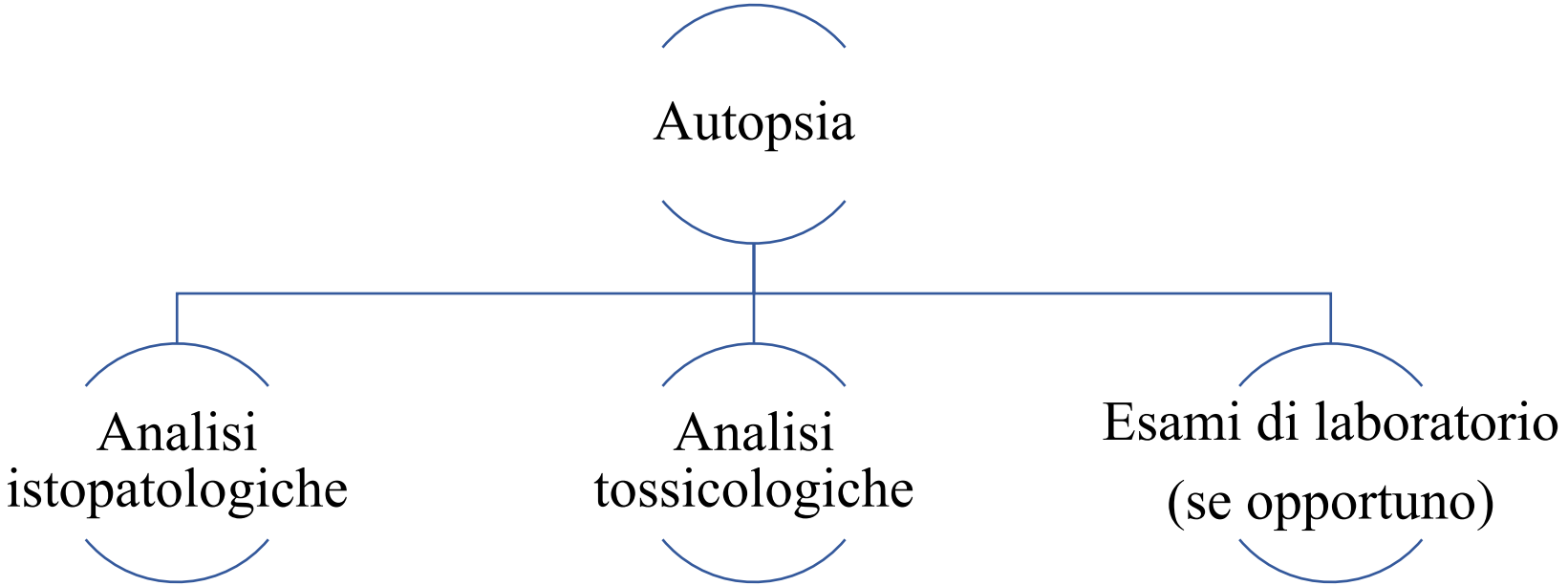
rilevazione di peso ed altezza

documentazione fotografica

valutazione eventuale PMCT

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

AUTOPSIA



Virchows Arch (2017) 471:691–705
DOI 10.1007/s00428-017-2221-0

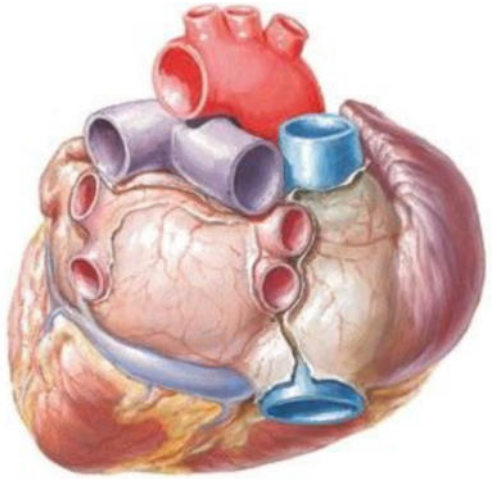
ORIGINAL ARTICLE

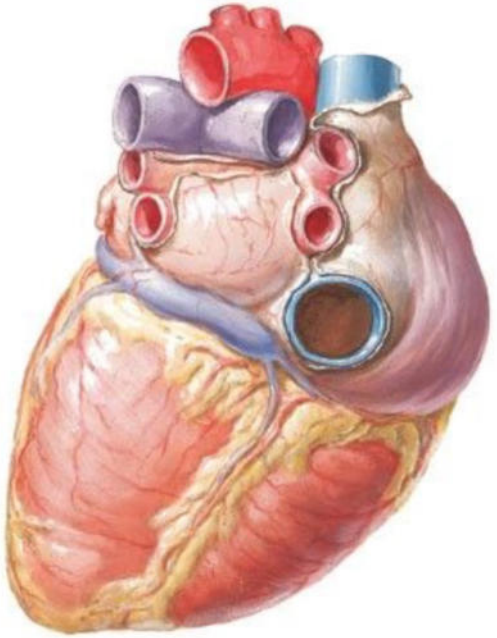
Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology

Cristina Basso[1] · Beatriz Aguilera[2] · Jytte Banner[3] · Stephan Cohle[4] · Giulia d'Amati[5] · Rosa Henriques de Gouveia[6] · Cira di Gioia[5] · Aurelie Fabre[7] · Patrick J. Gallagher[8] · Ornella Leone[9] · Joaquin Lucena[10] · Lubov Mitrofanova[11] · Pilar Molina[12] · Sarah Parsons[13] · Stefania Rizzo[1] · Mary N. Sheppard[14] · Maria Paz Suárez Mier[2] · S. Kim Suvarna[15] · Gaetano Thiene[1] · Allard van der Wal[16] · Aryan Vink[17] · Katarzyna Michaud[18] · on behalf of the Association for European Cardiovascular Pathology

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

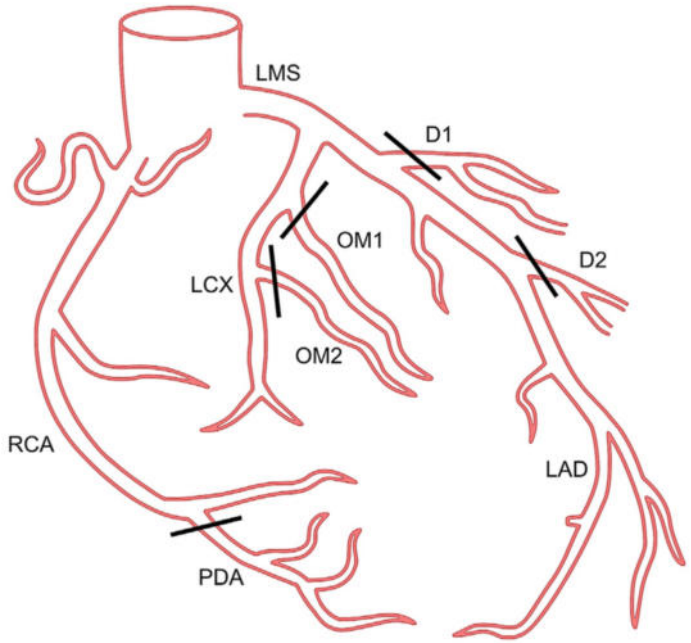
ESAME MACROSCOPICO DEL CUORE





a) Esaminare il **pericardio** ed esplorare la cavità pericardica
b) Se si sospetta una **cardiopatia congenita**, considerare di rimuovere il cuore e i polmoni in blocco
c) Se si sospetta una **dissezione aortica**, è necessario mantenere la continuità dell'aorta
d) Esaminare le **grosse arterie** ed aprire l'arteria polmonare *in situ* e recidere le grosse arterie 3 cm al di sopra della valvola aortica e della valvola polmonare
e) Esaminare e recidere **le vene polmonari, la vena cava superiore** (prestare attenzione nel preservare il nodo del seno) e la **vena cava inferiore**
f) **Aprire l'atrio destro** dalla vena cava inferiore fino all'apice dell'auricola omolaterale. **Aprire l'atrio sinistro** tra le vene polmonari superiori e poi fino all'apice dell'auricola omolaterale. Ispezionare le cavità atriali, il setto interatriale e determinare se il **forame ovale è pervio.** Esaminare le **valvole mitrale e tricuspide** dall'alto e controllare l'integrità dei muscoli papillari e delle corde tendinee
g) Ispezionare **l'aorta, l'arteria polmonare e le valvole aortica e polmonare**

ESAME MACROSCOPICO DEL CUORE



h) Esaminare le **arterie coronarie** ed effettuare tagli trasversali ad intervalli di 3 mm lungo il decorso delle principali arterie epicardiche.
i) Eseguire un **taglio trasversale completo parallelo al solco atrio-ventricolare lungo l'asse corto del cuore** (a circa 3 cm dal solco). Effettuare poi ulteriori sezioni trasversali, parallele, ad intervalli di 1 cm, verso l'apice cardiaco per valutare eventuali alterazioni del miocardio.
j) Rimuovere il sangue dal cuore ed **effettuare le seguenti misurazioni**: peso totale del cuore e spessore delle pareti. Confrontare le misure ottenute rispetto a quelle contenute nelle tabelle dei pesi normali per sesso e peso corporeo.
k) Completare la sezione dei ventricoli nella direzione del flusso sanguigno.
l) Completare l'esame del setto atriale e ventricolare, delle valvole atrio-ventricolari, delle regioni di afflusso e di efflusso ventricolari e delle valvole semilunari.

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

PRELIEVI PER LE ANALISI GENETICHE POST-MORTEM

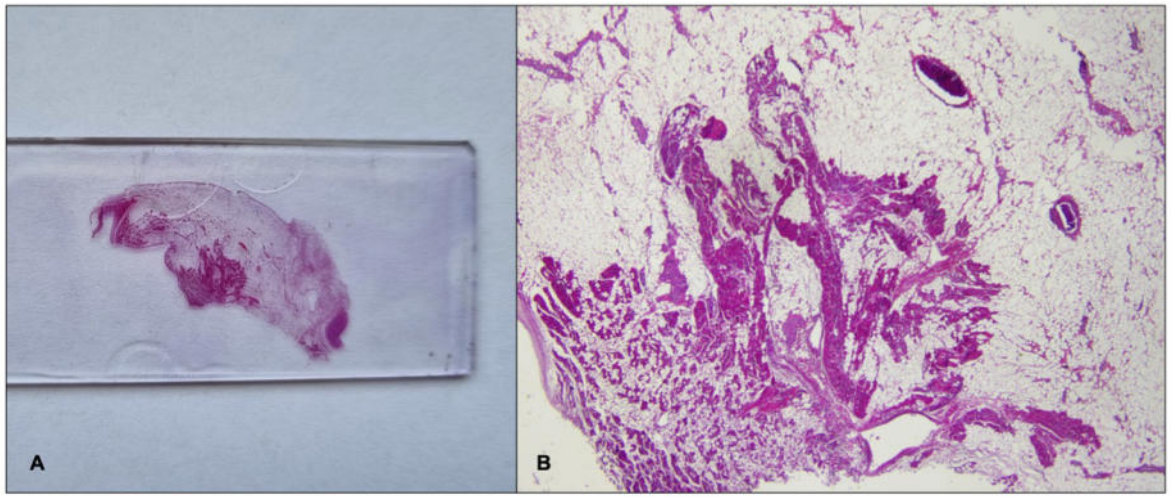
- Sangue intero
- Miocardio

Ed **almeno uno tra:**

- Fegato
- Milza
- Timo
- Muscolo scheletrico

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

ESAME ISTOPATOLOGICO DEL CUORE



- Miocardio
- Arterie coronarie
- Altri campioni cardiaci

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

ESAMI TOSSICOLOGICI

Se l'autopsia e gli accertamenti istopatologici sono negativi eseguire gli **esami tossicologici** sulla salma.

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

COME PROCEDERE SE GLI ACCERTAMENTI RISULTANO NEGATIVI/INCONCLUSIVI?

Eseguire le **analisi genetiche sui campioni prelavati del cadavere**

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

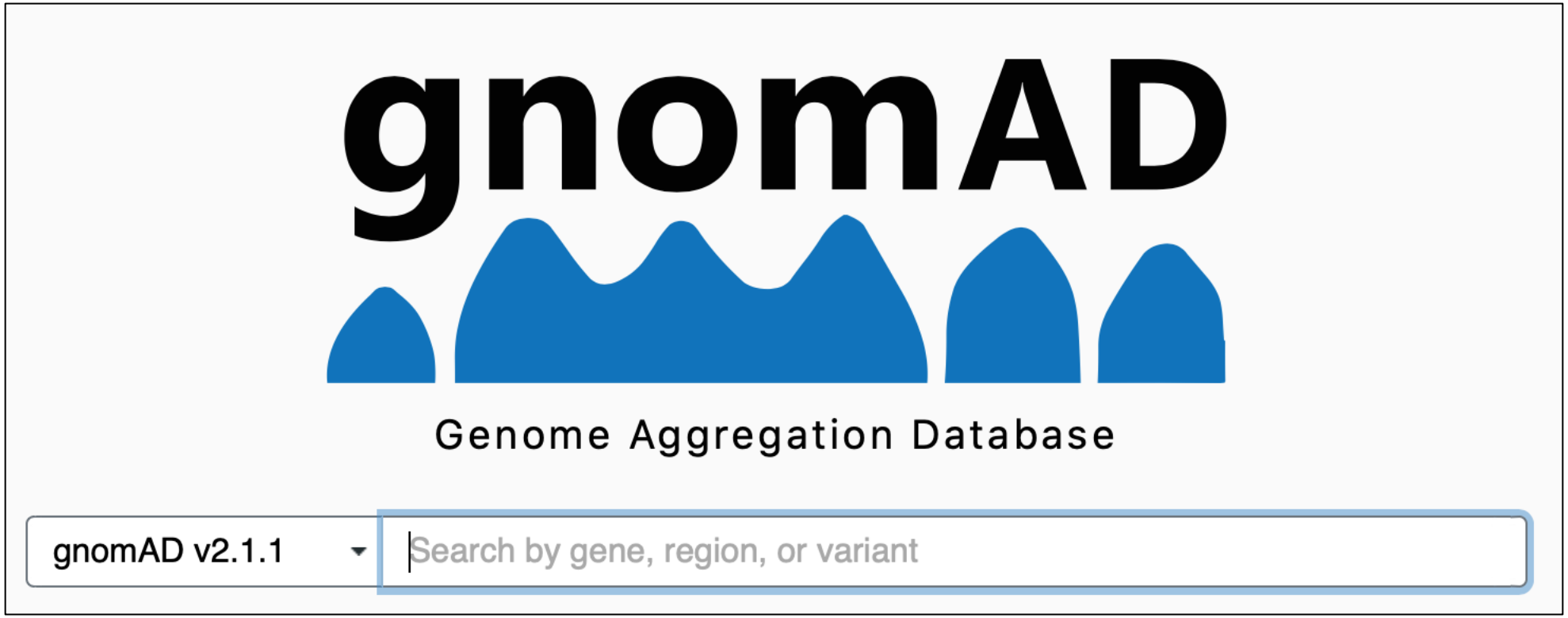
NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Pannello di sequenziamento personalizzato di geni selezionati correlati alla morte cardiaca improvvisa:

- Geni associati a disturbi aritmici (Brs, LQTS, SQTS, CPVT, FA, ripolarizzazione precoce);
- Geni associati a disturbi strutturali (HCM, DCM, LVNC, ACM, RCM);
- Geni associati a vasculopatie e rasopatie (aneurisma e dissezione dell'aorta toracica ereditabili; sindrome di Ehlers-Danlos; sindrome di Noonan; sindrome di Costello; sindrome cardiofaciocutanea).

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

gnomAD



Estrazione dei dati di popolazione

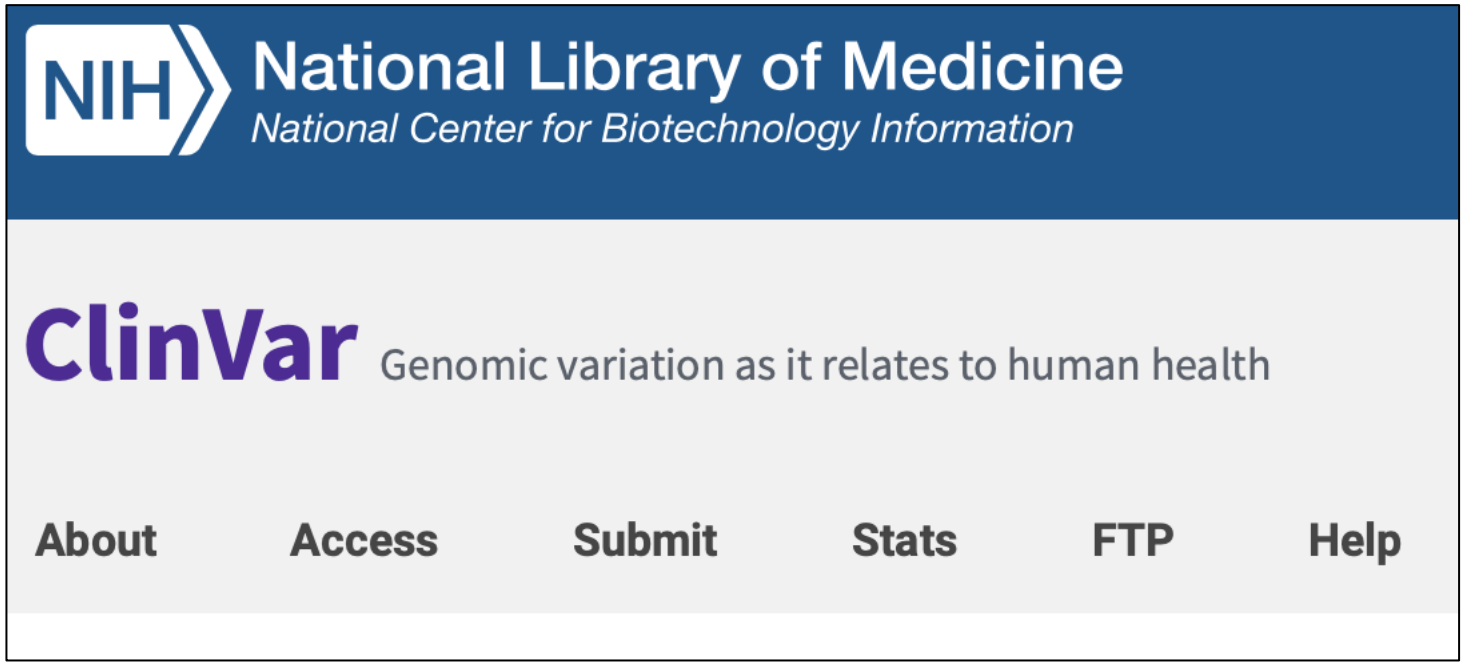
UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

Tools computazionali

- PolyPhen2
- Provean
- Mutation Tester

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

Varianti riportate nella Letteratura scientifica



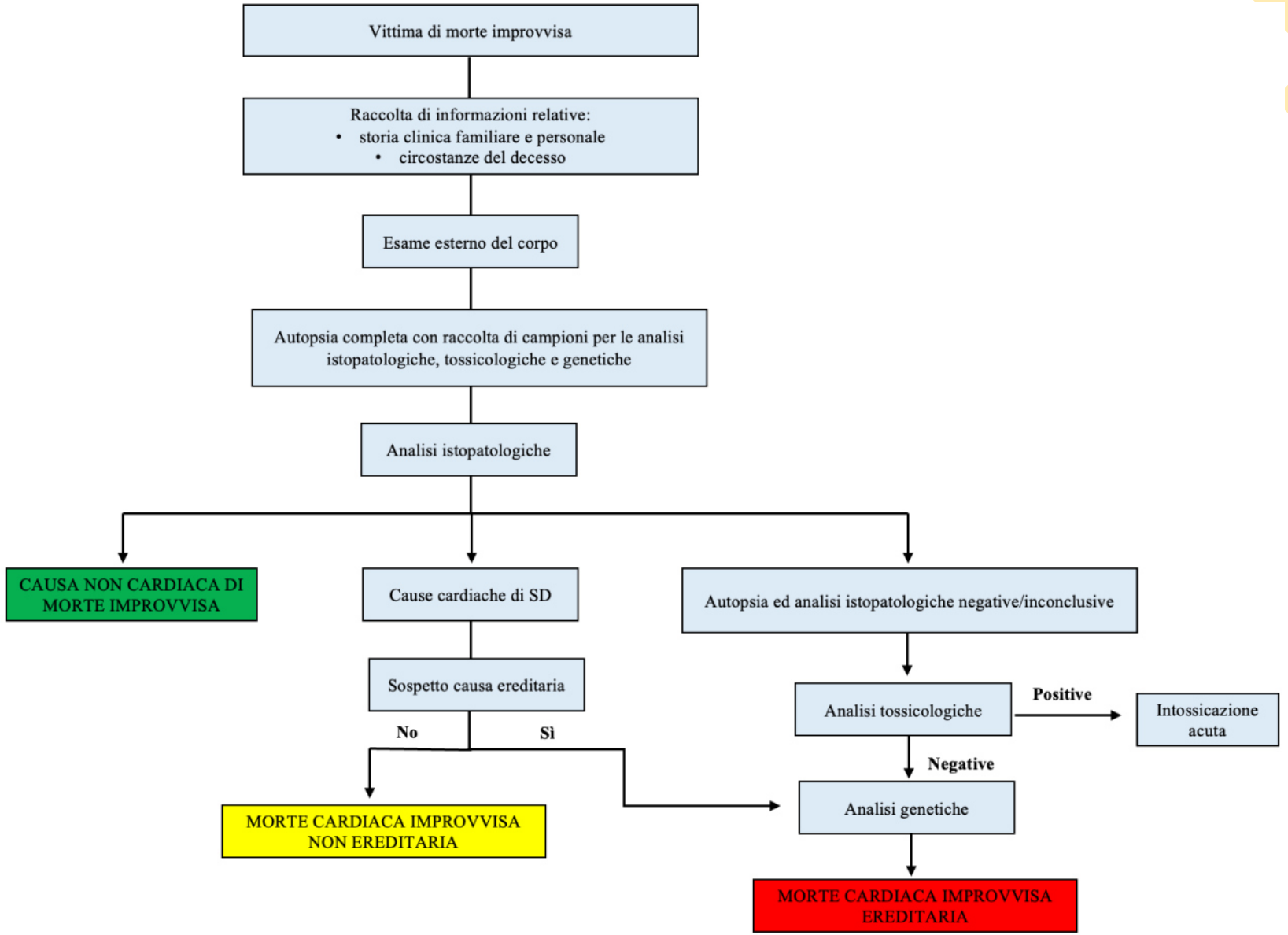
UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

Classificazione delle varianti

	Benign		Pathogenic			
	Strong	**Supporting**	**Supporting**	**Moderate**	**Strong**	**Very Strong**
Population Data	MAF is too high for disorder *BA1/BS1* **OR** observation in controls inconsistent with disease penetrance *BS2*			Absent in population databases *PM2*	Prevalence in affecteds statistically increased over controls *PS4*	
Computational And Predictive Data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product *BP4* Missense in gene where only truncating cause disease *BP1* Silent variant with non predicted splice impact *BP7*	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product *PP3*	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before *PM5* Protein length changing variant *PM4*	Same amino acid change as an established pathogenic variant *PS1*	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease *PVS1*
Functional Data	Well-established functional studies show no deleterious effect *BS3*		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common *PP2*	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation *PM1*	Well-established functional studies show a deleterious effect *PS3*	
Segregation Data	Non-segregation with disease *BS4*		Co-segregation with disease in multiple affected family members *PP1*	Increased segregation data →		
De novo Data				*De novo* (without paternity & maternity confirmed) *PM6*	*De novo* (paternity & maternity confirmed) *PS2*	
Allelic Data		Observed in *trans* with a dominant variant *BP2* Observed in *cis* with a pathogenic variant *BP2*		For recessive disorders, detected in *trans* with a pathogenic variant *PM3*		
Other Database		Reputable source w/out shared data = benign *BP6*	Reputable source = pathogenic *PP5*			
Other Data		Found in case with an alternate cause *BP5*	Patient's phenotype or FH highly specific for gene *PP4*			

- Patogenetiche
- Probabilmente patogenetiche
- Varianti di significato incerto
- Probabilmente benigne
- Benigne

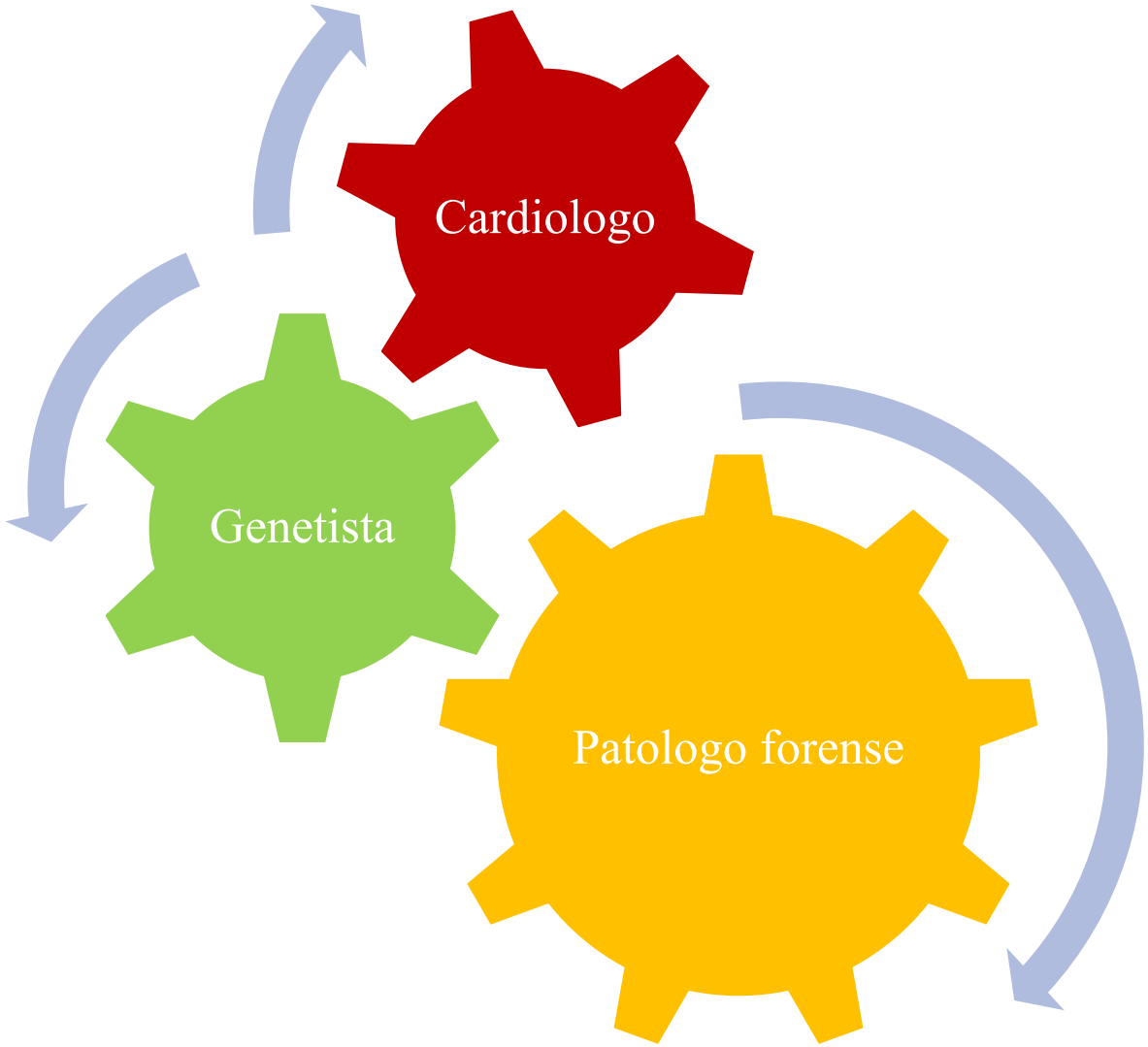
Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology



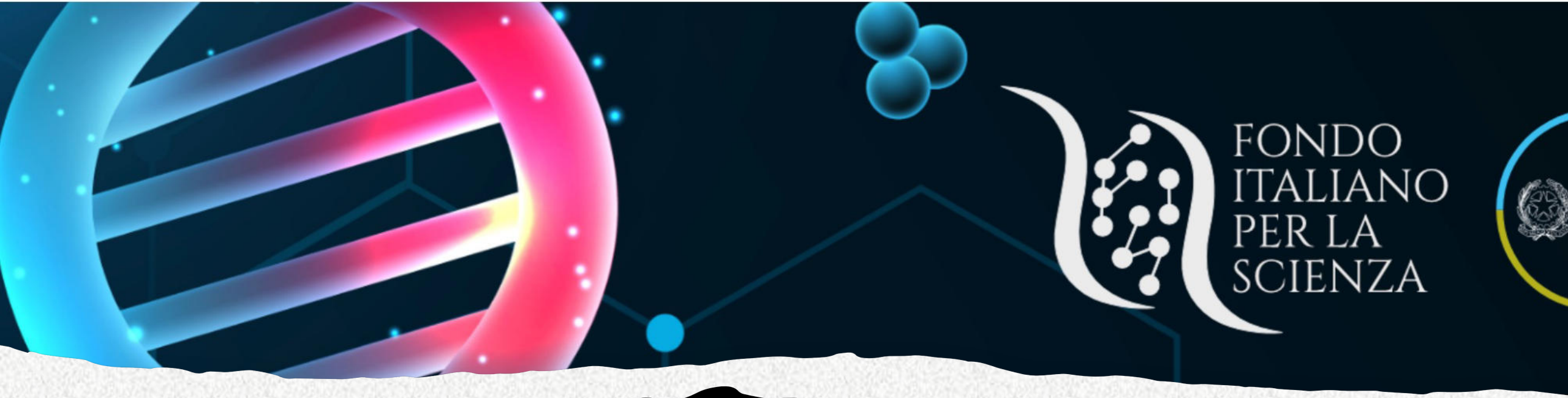
UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

UNIVERSITÀ CATTOLICA del Sacro Cuore

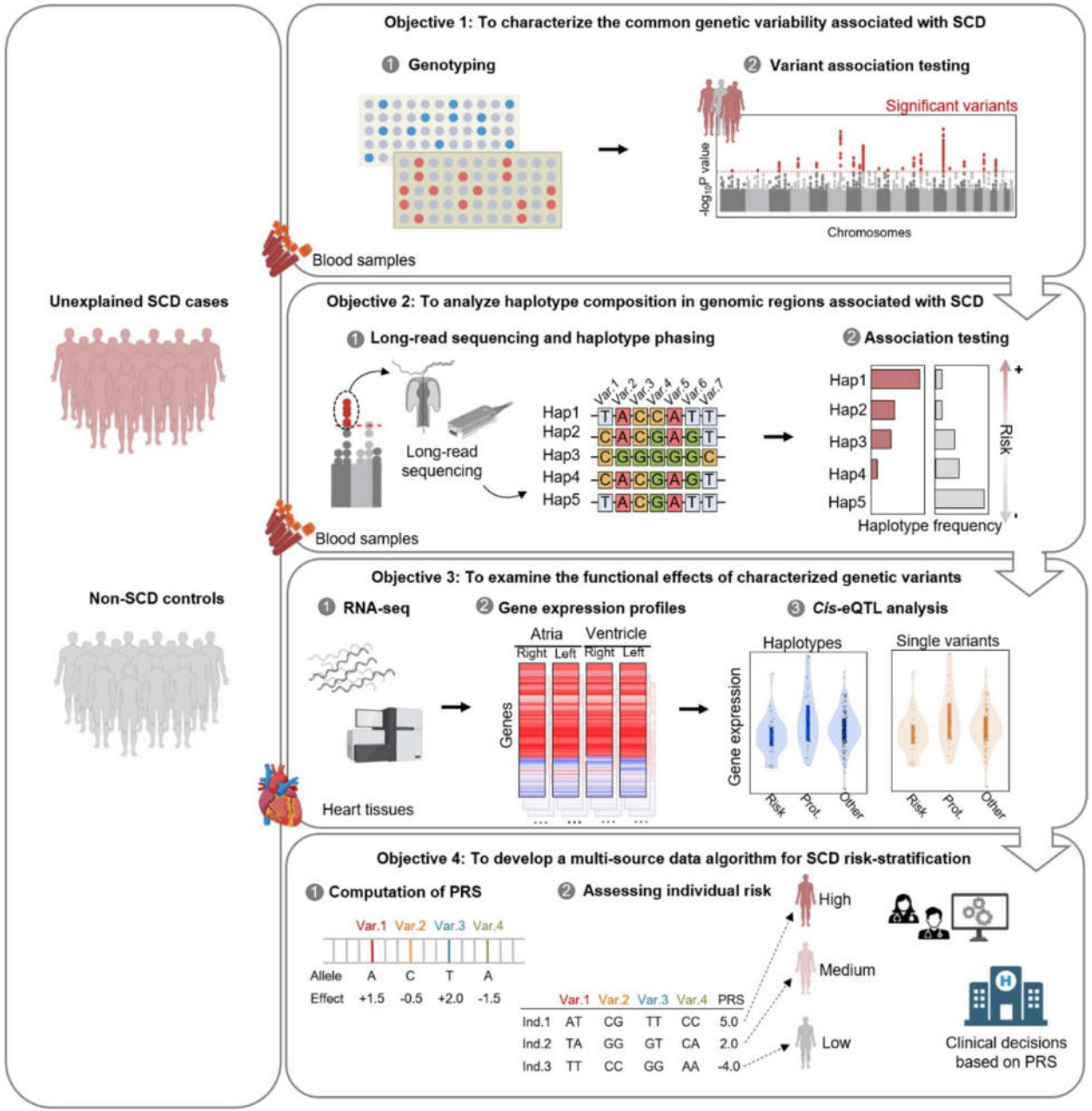
VALUTAZIONE MULTIDISCIPLINARE



What's next?



Application of functional genomics for the forensic investigation of unexplained sudden cardiac death in young people


Unexplained SCD cases
Non-SCD controls
Objective 1: To characterize the common genetic variability associated with SCD
1 Genotyping
2 Variant association testing
Significant variants
-log10P value
Chromosomes
Blood samples
Objective 2: To analyze haplotype composition in genomic regions associated with SCD
1 Long-read sequencing and haplotype phasing
2 Association testing
Long-read sequencing
Var.1 Var.2 Var.3 Var.4 Var.5 Var.6 Var.7
Hap1 T A C C A T T
Hap2 C A C G A G T
Hap3 C G G G G G C
Hap4 C A C G A G T
Hap5 T A C G A T T
Hap1
Hap2
Hap3
Hap4
Hap5
Risk
Haplotype frequency
Blood samples
Objective 3: To examine the functional effects of characterized genetic variants
1 RNA-seq
2 Gene expression profiles
3 Cis-eQTL analysis
Atria
Ventricle
Right Left Right Left
Genes
Haplotypes
Single variants
Gene expression
Risk Prot. Other
Risk Prot. Other
Heart tissues
Objective 4: To develop a multi-source data algorithm for SCD risk-stratification
1 Computation of PRS
2 Assessing individual risk
Var.1 Var.2 Var.3 Var.4
Allele A C T A
Effect +1.5 -0.5 +2.0 -1.5
Var.1 Var.2 Var.3 Var.4 PRS
Ind.1 AT CG TT CC 5.0
Ind.2 TA GG GT CA 2.0
Ind.3 TT CC GG AA -4.0
High
Medium
Low
Clinical decisions based on PRS

UNDER REVIEW

Cardiac genetic background in sudden infant death syndrome (SIDS): is it a matter of structure or electrical conduction?

Francesca Cazzato[a,†], Mònica Coll[b,†], Simone Grassi[a,c,*], Anna Fernàndez-Falgueras[d], Laia Nogué-Navarro[e], Anna Iglesias[b], Josep Castellà[f], Antonio Oliva[a,‡], Ramon Brugada[b,d,g,h,‡]

FSI FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL GENETICS

SCOPO DELLO STUDIO

Valutare se la predisposizione genetica cardiaca possa fornire una spiegazione univoca al decesso.

Lo scopo era anche quello di identificare il tipo di geni coinvolti per chiarire i meccanismi prevalenti alla base della morte cardiaca improvvisa (SCD) nella SIDS.

MATERIALI E METODI

- **Popolazione di studio:** 76 neonati apparentemente sani di età inferiore a 1 anno, morti improvvisamente tra il 2012 e il 2021 senza una chiara causa di morte sottoposti ad un esame forense completo eseguito presso l'Istituto di Medicina Legale della Catalogna (IMLC).

- **Indagini forensi:** Gli esami post-mortem hanno incluso un'autopsia completa con prelievo di tessuti e fluidi biologici per analisi istopatologiche, tossicologiche e genetiche.

ANALISI GENETICHE

- Le analisi genetiche sono state eseguite presso il **Centro di Genetica Cardiovascolare e il Laboratorio di Diagnostica Clinica della Fundació Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI)** (Spagna).

- Il test genetico post-mortem è stato eseguito su tutti i neonati con una **causa di morte non determinata dopo indagini forensi non dirimenti.**

- L’analisi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) è stata effettuata utilizzando un **pannello di risequenziamento personalizzato di geni selezionati correlati alla SCD.**

Risultati

50 (65,8%) carriers di almeno una variante nei geni selezionati correlati alla SCD.

104 varianti genetiche rare.

Classificazione delle varianti:

- **Patogenetica: 1 (1,0%)**
- **Probabilmente patogenetica: 4 (3,8%)**
- **Varianti di significato incerto (VUS): 99 (95,2%)**

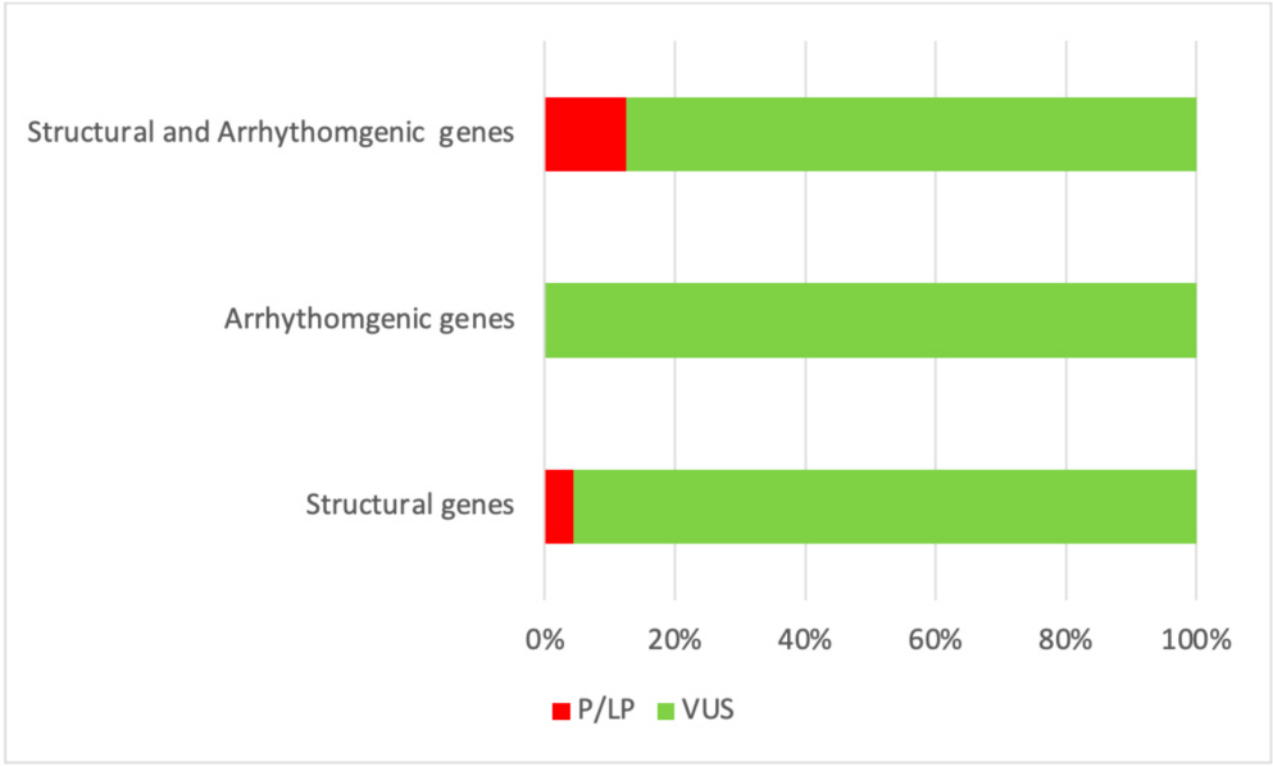
In 4 casi su 76 (5,3%) almeno una variante patogenetica o probabilmente patogenetica poteva essere considerata una causa cardiaca monogenica responsabile della morte improvvisa del bambino.

VARIANTI PATOGENETICHE E PROBABILMENTE PATOGENETICHE

Variant Description		**GnomAD Database**	***In silico* prediction tools**			**Variant Classification**	
Gene (isoform)	Variant (cDNA and Protein)	Popmax Filtering AF (%)	PolyPhen2	PROVEAN	Mutation Taster	ACMG score	Context*
SCN5A (NM_198056.2)	c.5051_5052delinsTT p.(Trp1684Phe)	NA	Possibly damaging	Not Available	Disease causing	LP	BrS
SLC22A5 (NM_003060)	c.845G>A p.(Arg282Gln)	0.0003976	Probably damaging	Deleterious	Disease causing	P (AR)	Renal carnitine transport defect
MYL3 (NM_000258)	c.466G>T p.(Val156Leu)	0.000701	Possibly damaging	Deleterious	Disease causing	LP	HCM
TTN (NM_133378)	c.67439T>A p.(Leu22480*)	NA	NA	NA	NA	LP	DCM
TTN (NM_133378)	c.32705-1G>A	0.0031924	No splicing effect	No splicing effect	No splicing effect	LP	DCM

DISTRIBUZIONE DELLA PATOGENICITÀ DELLE VARIANTI

Non sono state osservate differenze significative nella distribuzione delle varianti tra i gruppi di geni



Sono necessari ulteriori studi per rivelare l’effettiva patogenicità della VUS e per chiarire i meccanismi alla base della stretta interazione tra proteine strutturali cardiache e canali ionici, che determina aritmie fatali improvvise e inaspettate nei neonati senza un fenotipo rilevabile.

Grazie per l'attenzione

29° CONVEGNO NAZIONALE DEI GENETISTI FORENSI ITALIANI

LA GENETICA FORENSE AL SERVIZIO DELLA PERSONA FRAGILE

Renato Guttuso: Colapesce, 1985

Opera composta da 145 pannelli assemblati. Con una superfice di 130 metri quadri, è l'opera più grande mai composta dall'Autore. E' installata sulla volta del Teatro Vittorio Emanuele di Messina e suggella la discussa e lunghissima ricostruzione del massimo teatro cittadino (1852-1908-1985)

MESSINA, 9-11 NOVEMBRE 2023

AULA MAGNA UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

UniMe 1548

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
Tradizione e cambiamento al centro del Mediterraneo

Ge.F.I.

Trasferimento, persistenza e recupero del DNA: le ricadute nell'interpretazione dei risultati in ambito forense

FRANCESCO SESSA, MS, PHD

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

29° Convegno Nazionale Ge.F.I. - Messina, 9-11 novembre 2023

Background

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsig

Editorial

Highlights of the conference 'The hidden side of DNA profiles: Artifacts, errors and uncertain evidence'

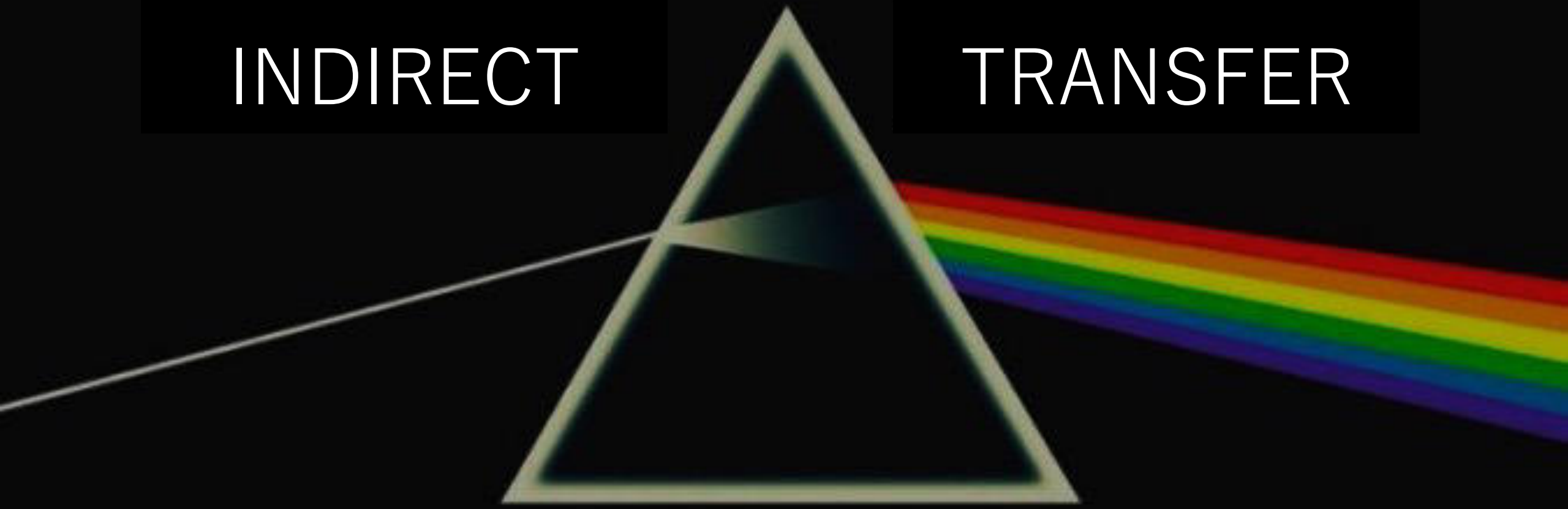
Vince Pascali*
Istituto di Medicina Legale, Università Cattolica, Roma, Italy

Mechthild Prinz President of the International Society of Forensic Genetics (ISFG)
Department of Forensic Biology, Office of the Chief Medical Examiner (OCME), New York, USA

Peter Gill's main focus was on the 'relevance of the evidence'. He moved from a careful re-assessment of the evidence available in the Kercher case, to state that in this case the inherent profiles were often good quality but irrelevant profiles. He described a general timeline of DNA transfer from the original source to the evidentiary item and applied it to the case of the 'knife' and the 'bra clasp' of the Perugia case. He remarked that there is a general lack of understanding when the process of contamination is taken into account. He concluded that: (A) Transfer of DNA is much 'easier' than previously believed. (B) Introduction of very sensitive instrumentation and multiplexes has greatly increased the opportunities to detect low level DNA using conventional methods (no definition of LT DNA is possible) and getting full, good quality profiles. (C) Therefore, extreme caution is needed when inferring an activity (such as, for example, stabbing) simply by the presence of a DNA profile on a knife handle. (D) The relevance of the evidence and the probative value of the DNA profile are two separate issues to be dealt with. (E) Scientists should be very cautious in overstating the reality and inferring details that cannot be inferred.

Peter Gill
University of Oslo, Norway

INDIRECT TRANSFER



THE DARK SIDE OF DNA EVIDENCE

Background

Negli ultimi anni, le tecniche di profilazione del DNA sono diventate altamente sensibili, consentendo di ottenere un profilo completo anche partendo da piccole quantità di DNA.

Buccal swab

Touch DNA

Estrazione e PCR → ≥80 cellule buccali

PCR diretta (raccolti utilizzando tampone) → ≥40 cellule buccali

Tampone + PCR diretta → ≥800 corneociti

Tapelift + PCR diretta → ≥4000 corneociti

Tampone + Estrazione + PCR → ≥4000 corneociti

I risultati descritti, prodotti in condizioni sperimentali, dimostrano anche che da un tampone con un numero di cellule pari a 10 è possibile ottenere un profilo del DNA con un numero di alleli variabile (9 - 25 alleli).

Kanokwongnuwut P, Martin B, Taylor D, Kirkbride KP, Linacre A. How many cells are required for successful DNA profiling? Forensic Sci Int Genet. 2021 Mar;51:102453. doi: 10.1016/j.fsigen.2020.102453. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33422808.

Background

Forensic Science International: Genetics 39 (2019) 8–18

Contents lists available at ScienceDirect

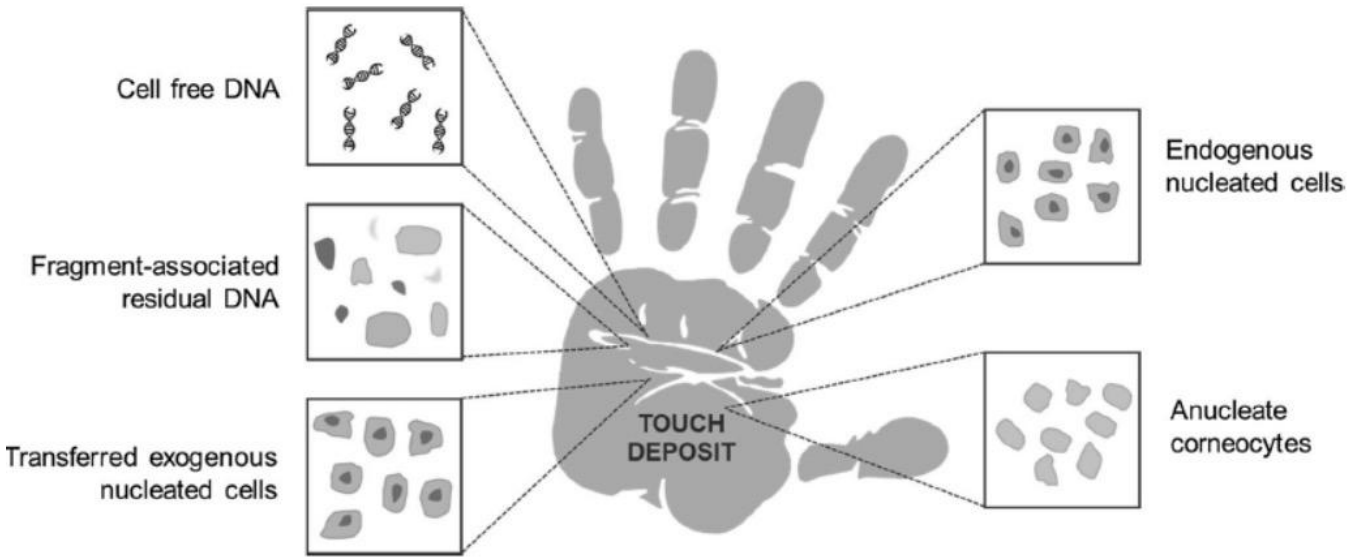
Forensic Science International: Genetics

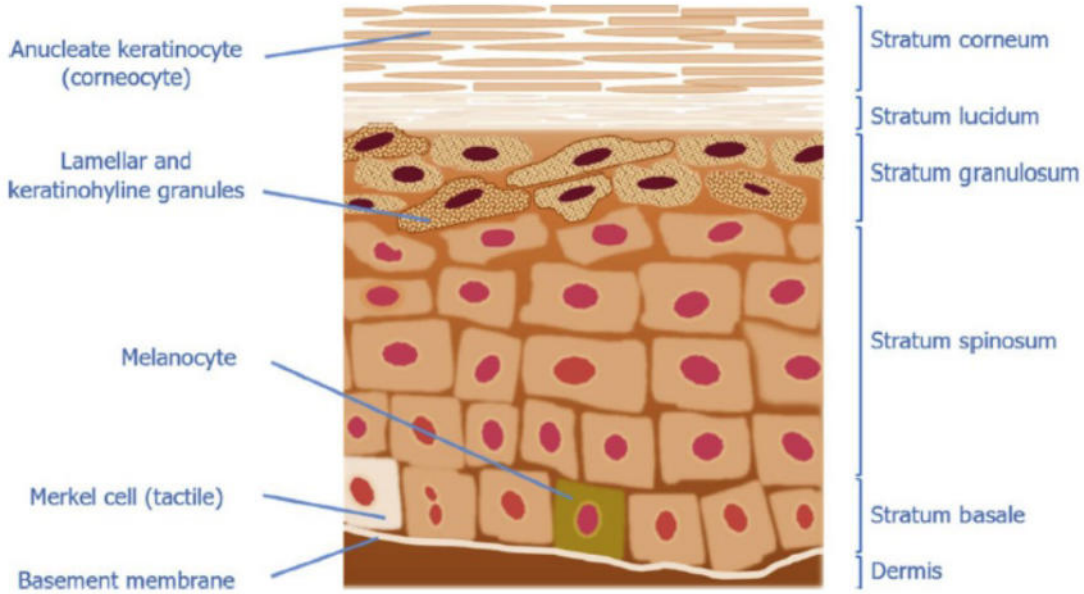
journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Review article

A review of trace "Touch DNA" deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition*

Julia Burrill, Barbara Daniel, Nunzianda Frascione*





Burrill J, Daniel B, Frascione N. A review of trace "Touch DNA" deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition. Forensic Sci Int Genet. 2019 Mar;39:8-18. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.11.019.

Background

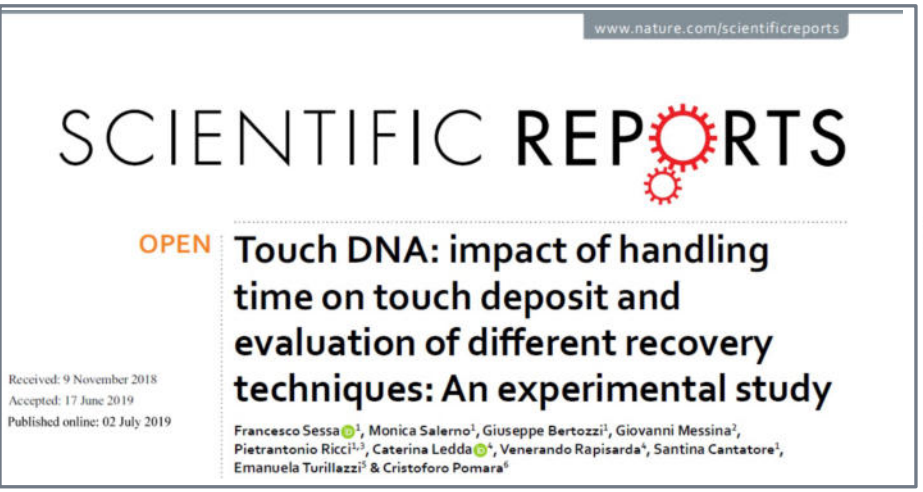
Direct transfer

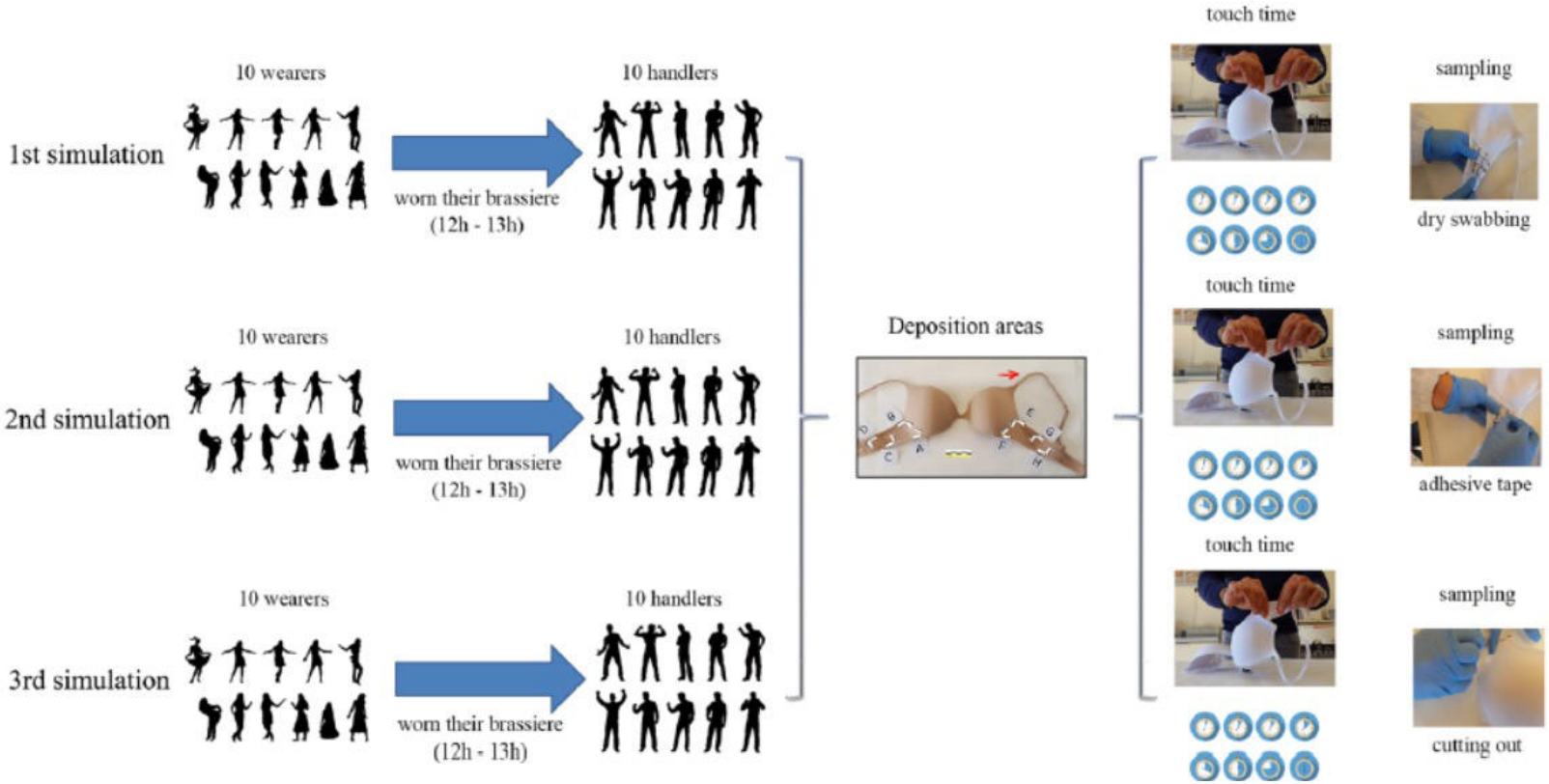
- Deposizione di fluidi biologici su una superficie (es. sangue, saliva o sperma).
- Trasferimento del DNA semplicemente toccando un oggetto o una superficie a mani nude.
- Trasferimento del DNA ad un altro soggetto (es. handshaking).
- Trasferimento del DNA indossando oggetti (es. vestiti, gioielli).

Un uomo adulto perde circa 1000 cellule cutanee per cm2/h

van Oorschot, R.A.H.; Szkuta, B.; Meakin, G.E.; Kokshoorn, B.; Goray, M. DNA transfer in forensic science: A review. Forensic Sci. Int. Genet. 2019, 38, 140–166

Background

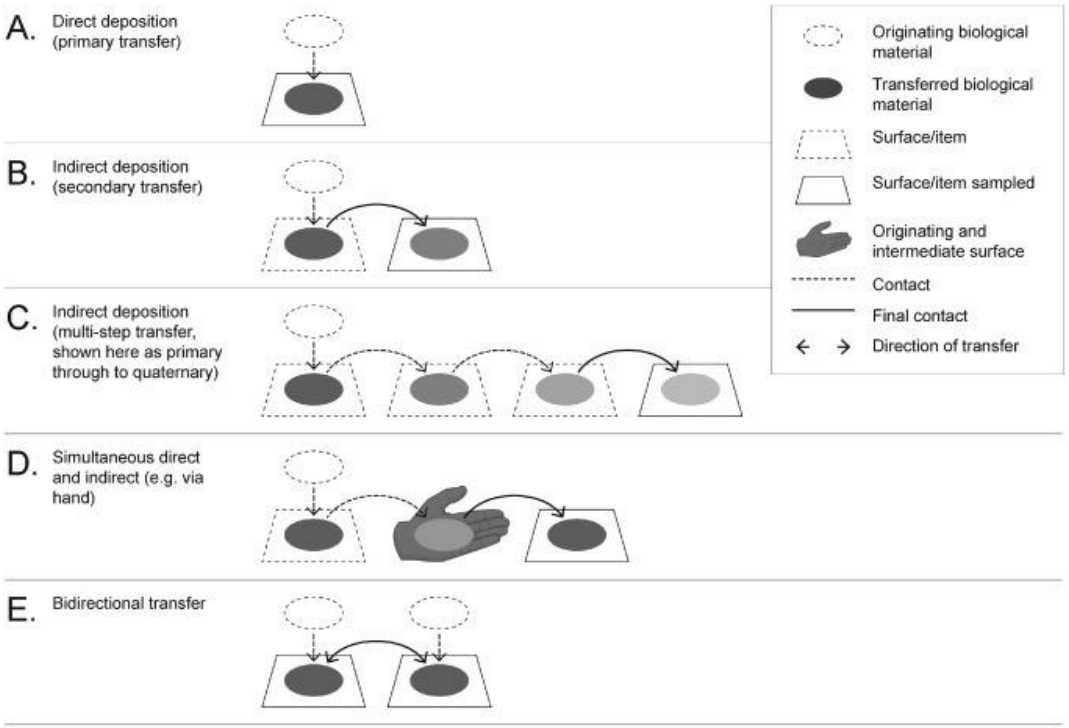


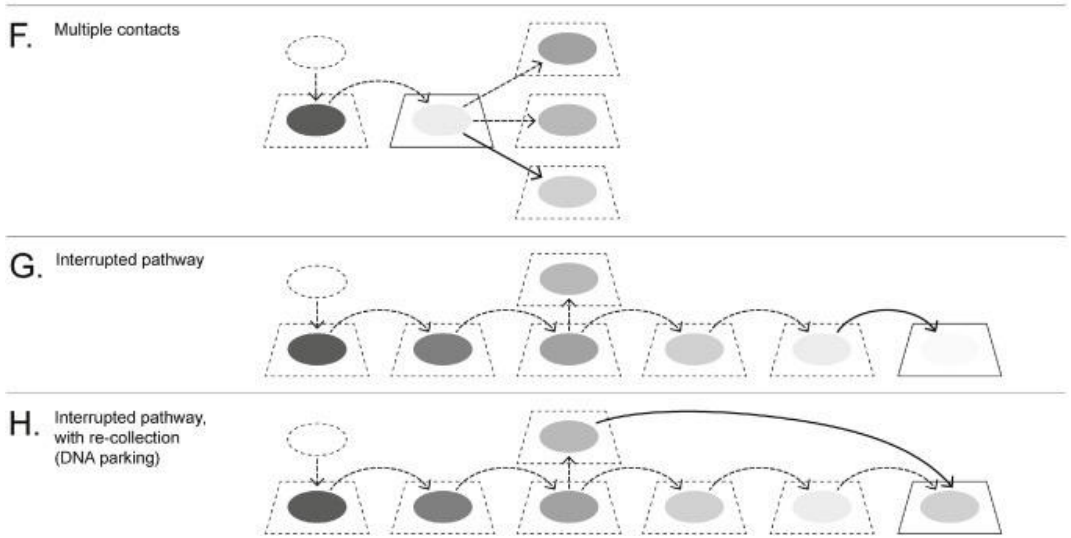


Sessa F, Salerno M, Bertozzi G, Messina G, Ricci P, Ledda C, Rapisarda V, Cantatore S, Turillazzi E, Pomara C. Touch DNA: impact of handling time on touch deposit and evaluation of different recovery techniques: An experimental study. Sci Rep. 2019 Jul 2;9(1):9542. doi: 10.1038/s41598-019-46051-9.

Background

Indirect transfer

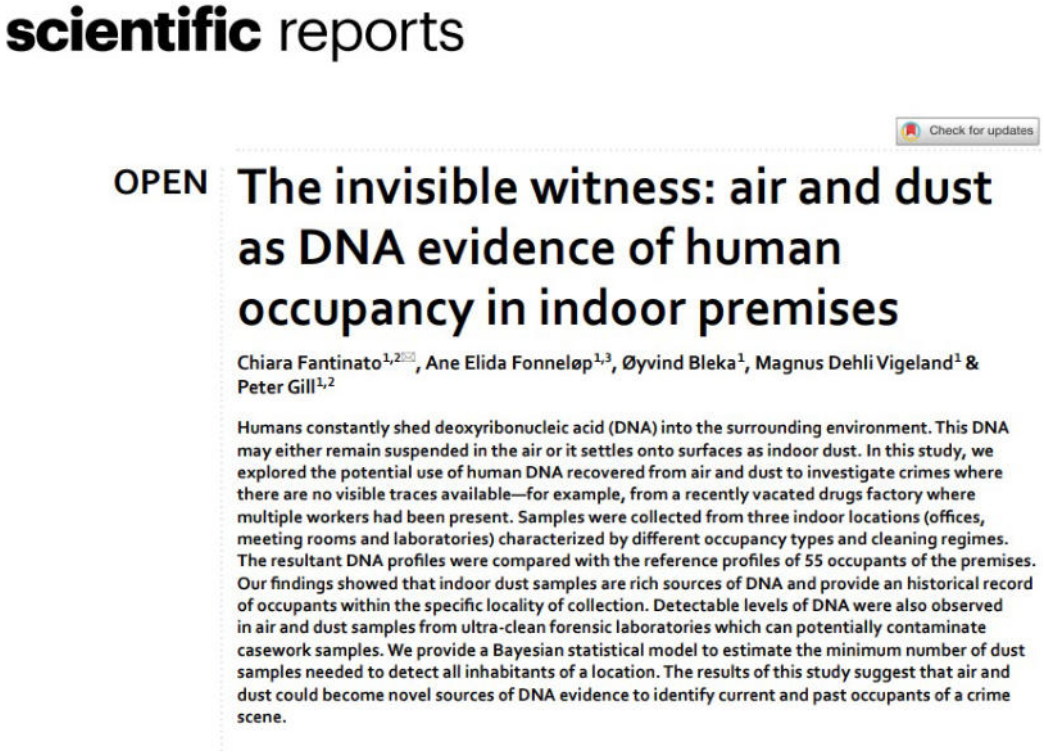




van Oorschot, R.A.H.; Szkuta, B.; Meakin, G.E.; Kokshoorn, B.; Goray, M. DNA transfer in forensic science: A review. Forensic Sci. Int. Genet. 2019, 38, 140–166

Background

Indirect DNA transfer and forensic implications



scientific reports

Check for updates

OPEN

The invisible witness: air and dust as DNA evidence of human occupancy in indoor premises

Chiara Fantinato[1,2✉], Ane Elida Fonneløp[1,3], Øyvind Bleka[1], Magnus Dehli Vigeland[1] & Peter Gill[1,2]

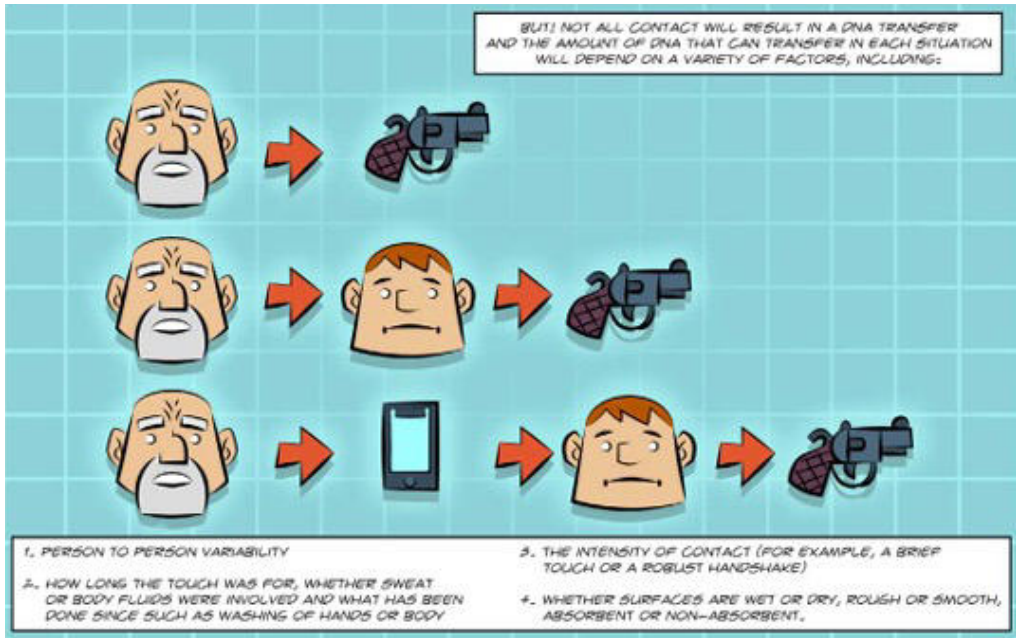
Humans constantly shed deoxyribonucleic acid (DNA) into the surrounding environment. This DNA may either remain suspended in the air or it settles onto surfaces as indoor dust. In this study, we explored the potential use of human DNA recovered from air and dust to investigate crimes where there are no visible traces available—for example, from a recently vacated drugs factory where multiple workers had been present. Samples were collected from three indoor locations (offices, meeting rooms and laboratories) characterized by different occupancy types and cleaning regimes. The resultant DNA profiles were compared with the reference profiles of 55 occupants of the premises. Our findings showed that indoor dust samples are rich sources of DNA and provide an historical record of occupants within the specific locality of collection. Detectable levels of DNA were also observed in air and dust samples from ultra-clean forensic laboratories which can potentially contaminate casework samples. We provide a Bayesian statistical model to estimate the minimum number of dust samples needed to detect all inhabitants of a location. The results of this study suggest that air and dust could become novel sources of DNA evidence to identify current and past occupants of a crime scene.

Fantinato, C., Fonneløp, A.E., Bleka, Ø. et al. The invisible witness: air and dust as DNA evidence of human occupancy in indoor premises. Sci Rep 13, 19059 (2023). https://doi.org/10.1038/s41598-023-46151-7

Background

Direct and Indirect DNA transfer: forensic implications

- Il trasferimento diretto e quello indiretto possono avvenire simultaneamente;
- Possono essere bi-direzionali.
- Possono avvenire per contatti multipli o attraverso eventi multipli.



Background

«Indirect DNA transfer»

5 Reviews on this topic negli ultimi 5 anni

Taylor, D., Kokshoorn, B., Biedermann, A. Evaluation of forensic genetics findings given activity level propositions: A review. (2018) Forensic Science International: Genetics, 36, pp. 34-49. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.06.001. **Cited 73 times (+15 da aprile)**.

van Oorschot, R.A.H., Szkuta, B., Meakin, G.E., Kokshoorn, B., Goray, M. DNA transfer in forensic science: A review. (2019) Forensic Science International: Genetics, 38, pp. 140-166. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.10.014. **Cited 147 times. (+24 da aprile)**

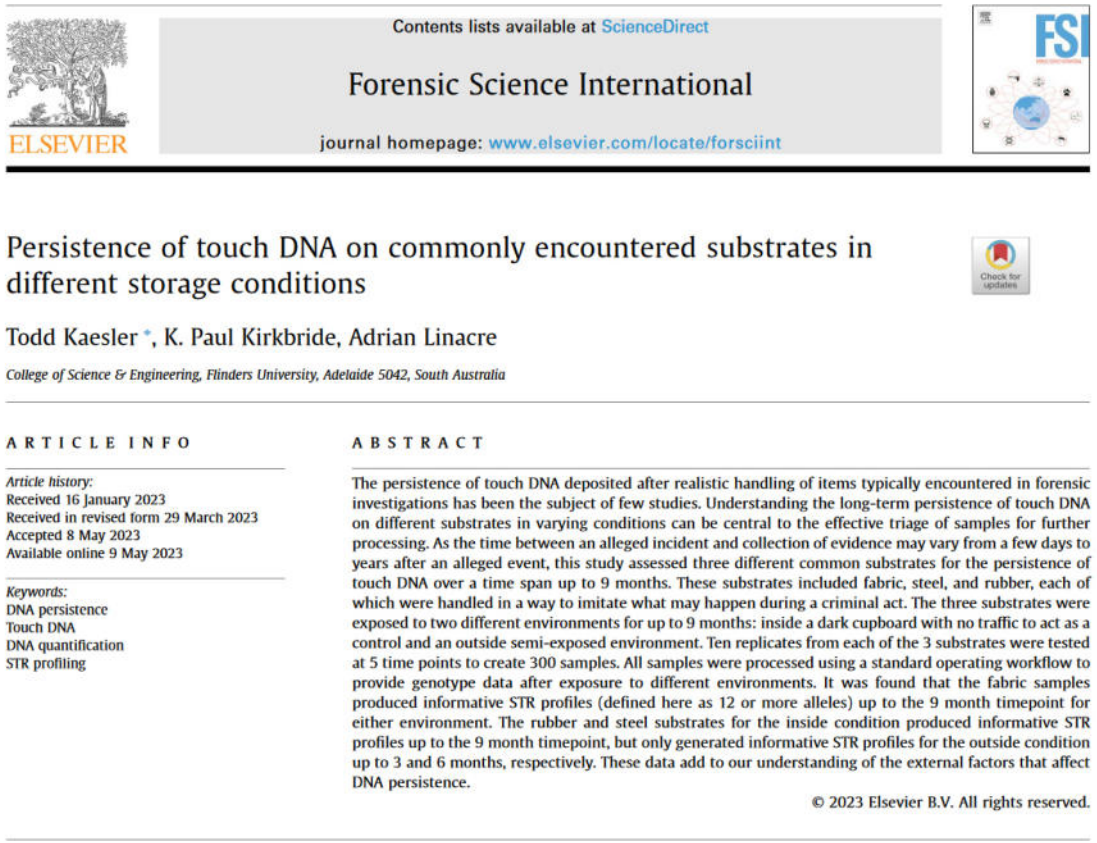
Burrill, J., Daniel, B., Frascione, N. A review of trace "Touch DNA" deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition, (2019) Forensic Science International: Genetics, 39, pp. 8-18. times.DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.11.019. **Cited 85 times (+20 da aprile).**

Gosch, A., Courts, C. On DNA transfer: The lack and difficulty of systematic research and how to do it better. (2019) Forensic Science International: Genetics, 40, pp. 24-36. DOI: 10.1016/j.fsigen.2019.01.012. **Cited 54 times (+10 da aprile).**

van Oorschot, R.A.H., Meakin, G.E., Kokshoorn, B., Goray, M., Szkuta, B. DNA transfer in forensic science: recent progress towards meeting challenges. (2021) Genes, 12 (11), art. no. 1766, . DOI: 10.3390/genes12111766. **Cited 10 times (+5 da aprile).**

Background

Persistenza



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

Persistence of touch DNA on commonly encountered substrates in different storage conditions

Todd Kaesler *, K. Paul Kirkbride, Adrian Linacre

College of Science & Engineering, Flinders University, Adelaide 5042, South Australia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 January 2023
Received in revised form 29 March 2023
Accepted 8 May 2023
Available online 9 May 2023

Keywords:
DNA persistence
Touch DNA
DNA quantification
STR profiling

ABSTRACT

The persistence of touch DNA deposited after realistic handling of items typically encountered in forensic investigations has been the subject of few studies. Understanding the long-term persistence of touch DNA on different substrates in varying conditions can be central to the effective triage of samples for further processing. As the time between an alleged incident and collection of evidence may vary from a few days to years after an alleged event, this study assessed three different common substrates for the persistence of touch DNA over a time span up to 9 months. These substrates included fabric, steel, and rubber, each of which were handled in a way to imitate what may happen during a criminal act. The three substrates were exposed to two different environments for up to 9 months: inside a dark cupboard with no traffic to act as a control and an outside semi-exposed environment. Ten replicates from each of the 3 substrates were tested at 5 time points to create 300 samples. All samples were processed using a standard operating workflow to provide genotype data after exposure to different environments. It was found that the fabric samples produced informative STR profiles (defined here as 12 or more alleles) up to the 9 month timepoint for either environment. The rubber and steel substrates for the inside condition produced informative STR profiles up to the 9 month timepoint, but only generated informative STR profiles for the outside condition up to 3 and 6 months, respectively. These data add to our understanding of the external factors that affect DNA persistence.

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

La **persistenza** del «Touch DNA» dipende dal materiale che è stato depositato. Un recente lavoro ha dimostrato che è stato possibile recuperare il touch DNA da tessuto fino a 9 mesi dopo la sua deposizione, mentre deposizioni sull'acciaio e gomma hanno tempo di latenza inferiore (rispettivamente 6 e 3 mesi).

B. Szkuta, K.N. Ballantyne, R.A.H. van Oorschot
Transfer and persistence of DNA on the hands and the influence of activities performed
Forensic Sci. Int. Genet., 28 (2017), pp. 10-20

Background

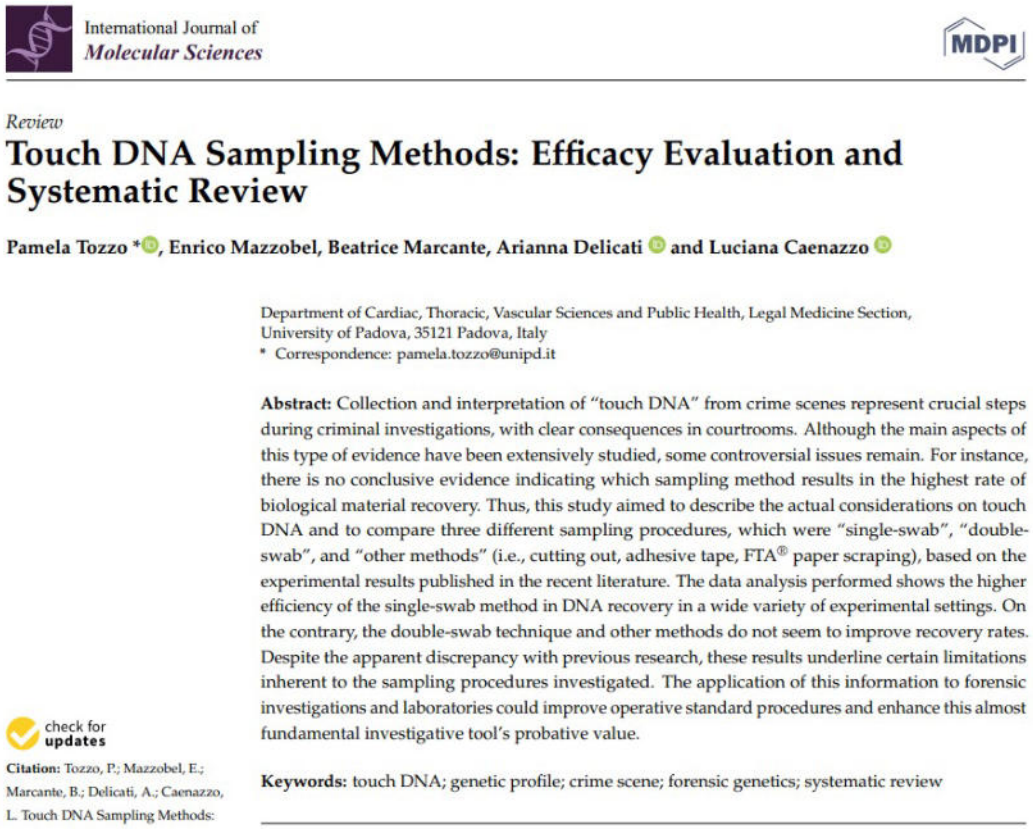
Prevalenza

NIST NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

https://www.nist.gov/feature-stories/dna-mixtures-forensic-science-explainer

Background

Recupero



International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Review

Touch DNA Sampling Methods: Efficacy Evaluation and Systematic Review

Pamela Tozzo *, Enrico Mazzobel, Beatrice Marcante, Arianna Delicati and Luciana Caenazzo

Department of Cardiac, Thoracic, Vascular Sciences and Public Health, Legal Medicine Section, University of Padova, 35121 Padova, Italy
* Correspondence: pamela.tozzo@unipd.it

Abstract: Collection and interpretation of "touch DNA" from crime scenes represent crucial steps during criminal investigations, with clear consequences in courtrooms. Although the main aspects of this type of evidence have been extensively studied, some controversial issues remain. For instance, there is no conclusive evidence indicating which sampling method results in the highest rate of biological material recovery. Thus, this study aimed to describe the actual considerations on touch DNA and to compare three different sampling procedures, which were "single-swab", "double-swab", and "other methods" (i.e., cutting out, adhesive tape, FTA® paper scraping), based on the experimental results published in the recent literature. The data analysis performed shows the higher efficiency of the single-swab method in DNA recovery in a wide variety of experimental settings. On the contrary, the double-swab technique and other methods do not seem to improve recovery rates. Despite the apparent discrepancy with previous research, these results underline certain limitations inherent to the sampling procedures investigated. The application of this information to forensic investigations and laboratories could improve operative standard procedures and enhance this almost fundamental investigative tool's probative value.

check for updates

Citation: Tozzo, P.; Mazzobel, E.; Marcante, B.; Delicati, A.; Caenazzo, L. Touch DNA Sampling Methods:

Keywords: touch DNA; genetic profile; crime scene; forensic genetics; systematic review

Questa review ha confrontato tre diverse procedure di campionamento per il «Touch DNA», che erano "tampone singolo", "tampone doppio" e "altri metodi" (ad esempio, ritaglio, nastro adesivo, raschiamento di carta FTA), concludendo che il miglior campionamento è il campionamento a singolo tampone.

Background

Recupero

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Research paper

The DNA-Buster: The evaluation of an alternative DNA recovery approach

Jonathan Währer [a,1], Sabrina Kehm [a,1], Marie Allen [b], Linnéa Brauer [b], Oliver Eidam [c], Ilona Seiberle [a], Sarah Kron [a], Eva Scheurer [a], Iris Schulz [a,*]

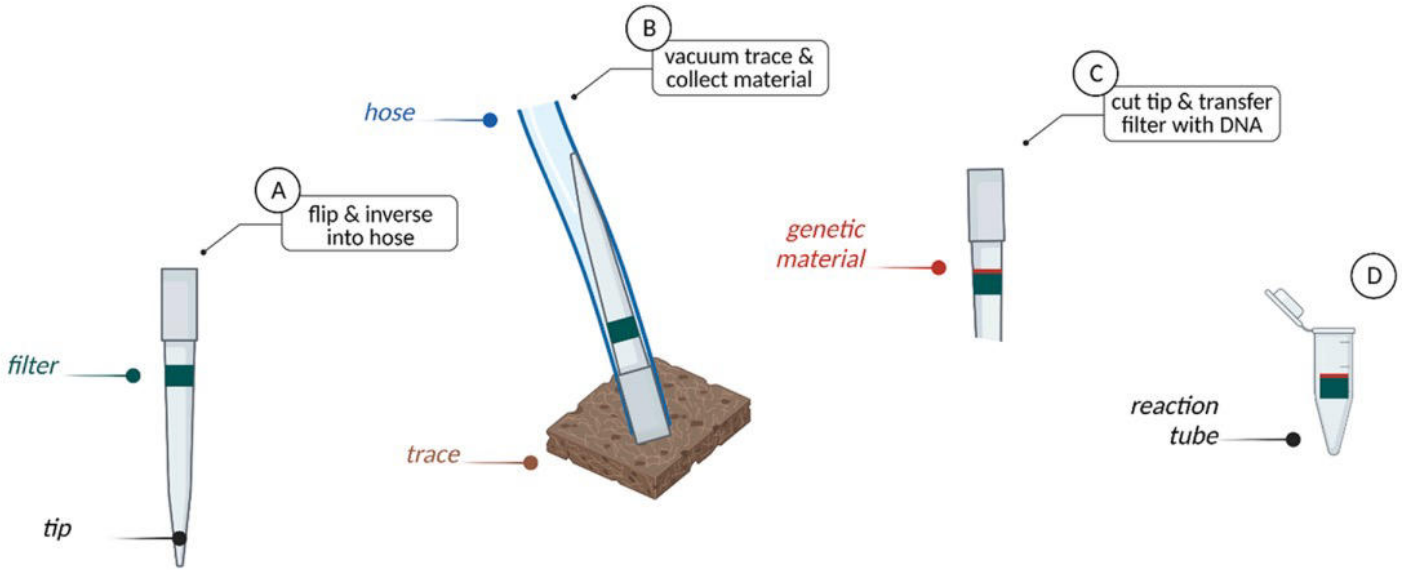
[a] Institute of Forensic Medicine, Department of Biomedical Engineering, University of Basel, Switzerland
[b] Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Sweden
[c] OTR-Performance GmbH, Cologne, Germany

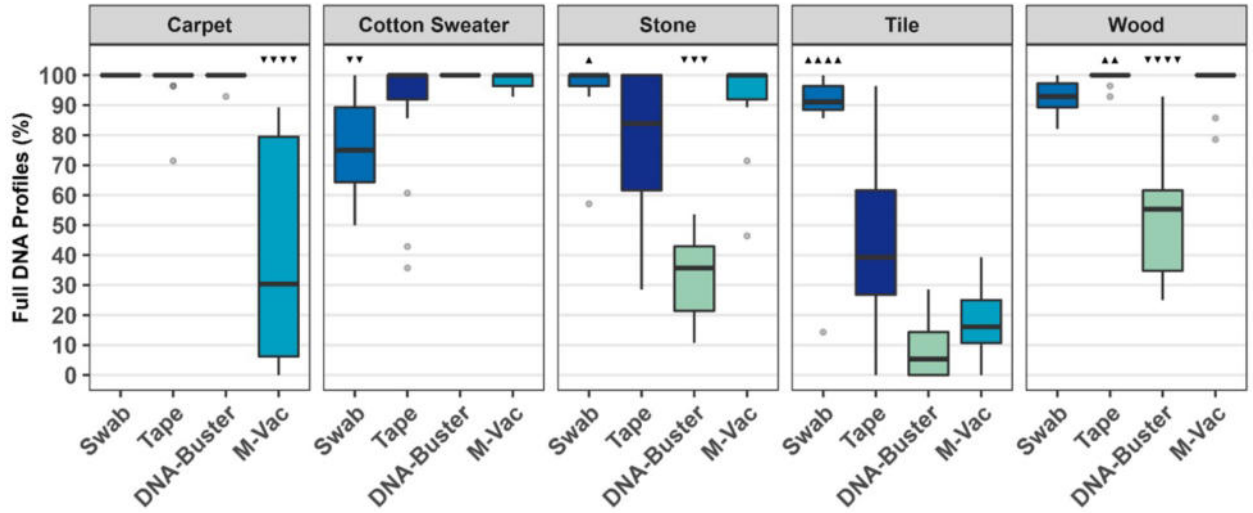
ARTICLE INFO

Keywords:
Dry-vacuuming
Swabbing
Taping
Wet-vacuuming
Performance comparison
Full DNA profile

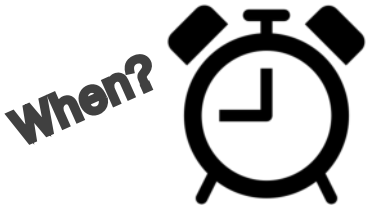
ABSTRACT

Touch DNA recovery techniques can have limitations, as their effectiveness depends on the substrate on which the DNA of a person of interest can be found. In this study, an in-house dry-vacuuming device, the DNA-Buster, was compared to traditional methods for its DNA recovery performance from items typically examined in forensic casework. The aim was to evaluate whether this dry-vacuuming approach can recover DNA efficiently, potentially complementing the well-established recovery strategies. For this, the performances of swabbing, taping, wet- (M-Vac®) and dry-vacuuming (DNA-Buster) were investigated quantitatively and qualitatively for touch DNA deposited on carpet, cotton sweater, stone, tile and wood. For the sweater, both vacuuming methods outperformed the other collection tools quantitatively. While the highest DNA amounts for the carpet were yielded by swabbing and taping, dry-vacuuming was equally good in reaching full DNA profiles, whereas less complete profiles were observed for the M-Vac®. For stone and tile, swabbing was optimal, whereas dry-vacuuming clearly underperformed for these substrates. Taping was the best recovery method for wood. Despite applying single donor DNA after thoroughly cleaning the items, undesired DNA mixtures were detected for all recovery techniques and all substrates. The overall research findings show first that the novel dry-vacuuming method is suited for DNA recovery from textiles. Secondly, they indicate that more attention should be paid to the substrate-collection dependency to ensure best practices in recovering genetic material in a precise, confident and targeted manner from the variety of forensic casework material.





Background

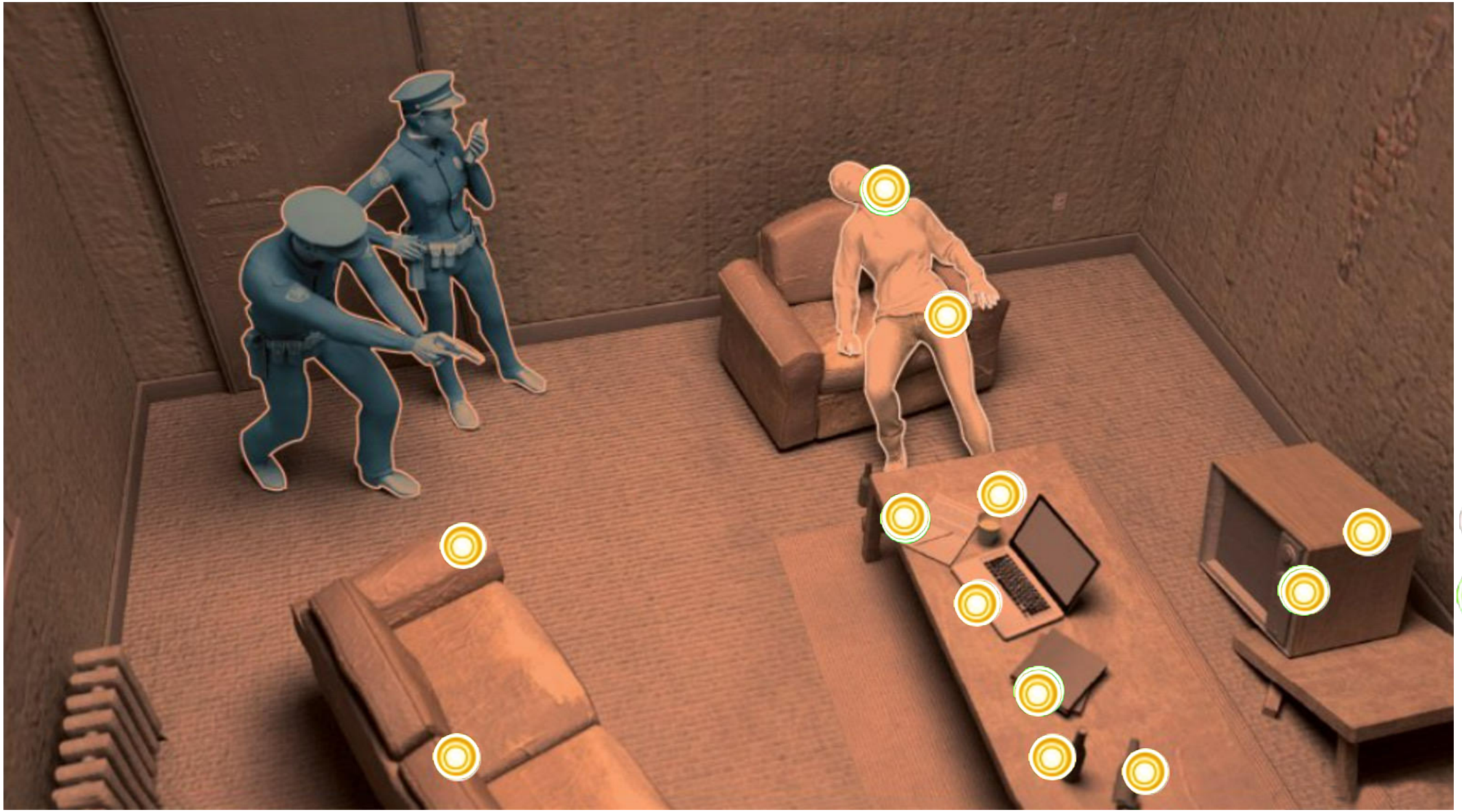


Quando può avvenire un Transfer?

Durante

Dopo

Prima



DNA IGNOTO

VITTIMA

ALTRO

MIXTURE

Obiettivi

Obiettivo 1

Literature review and experimental model

Obiettivo 2

Main findings

Obiettivo 3

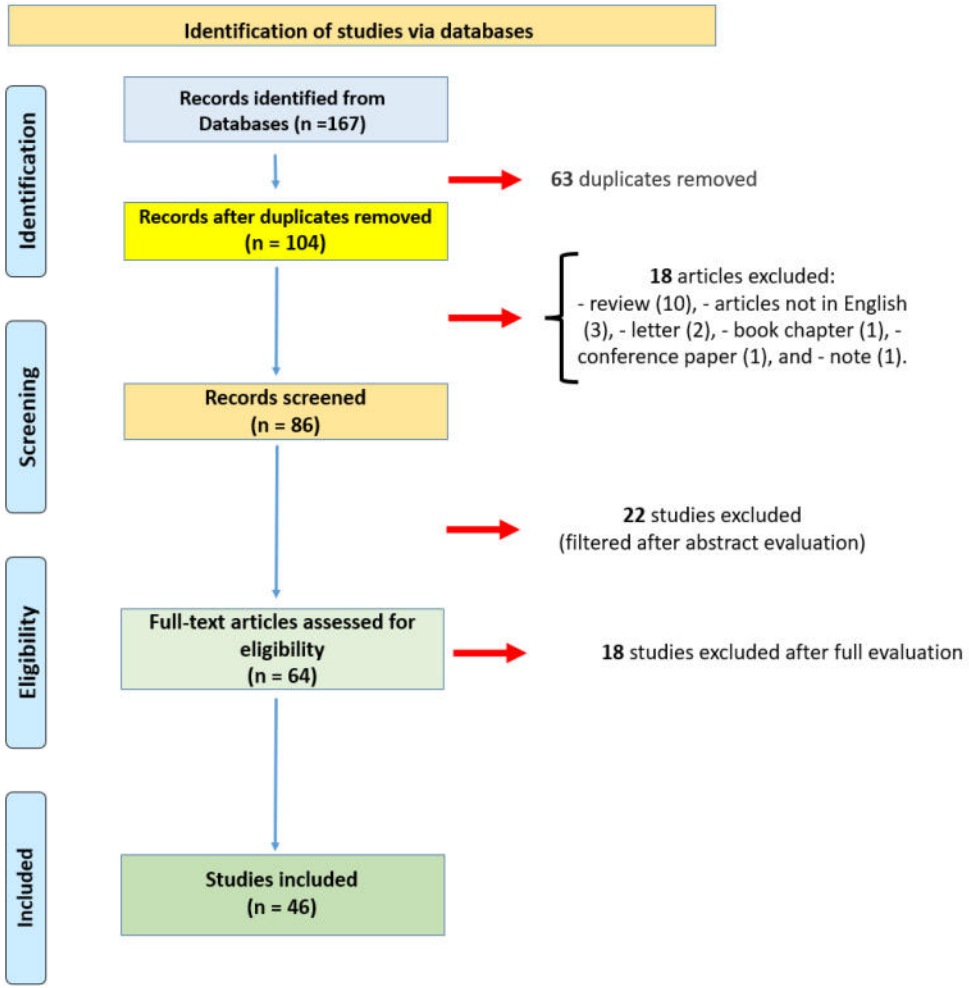
Strengths and limitations

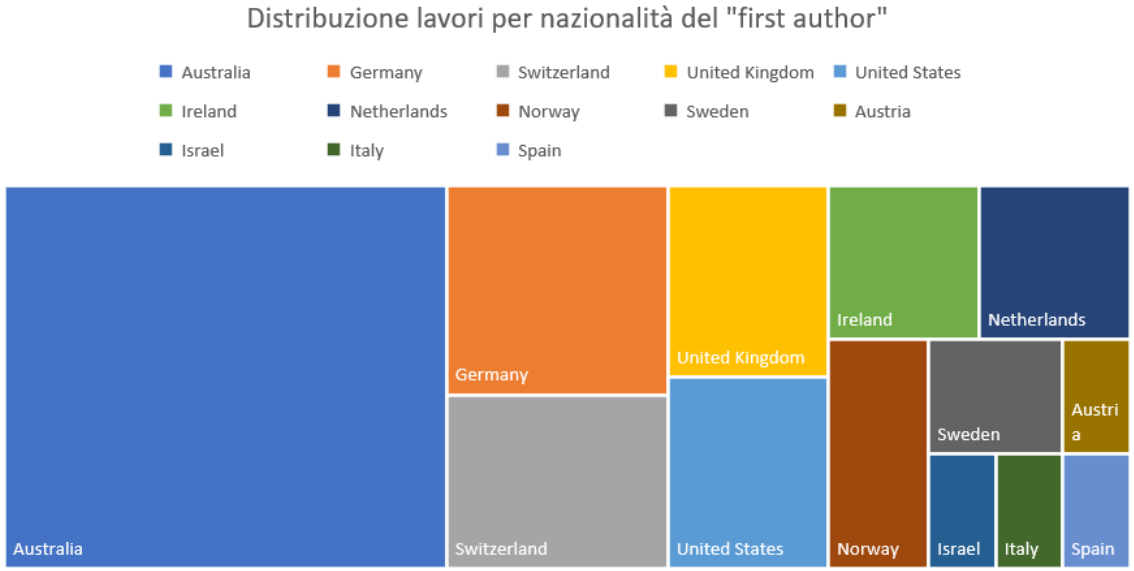
Obiettivo 4

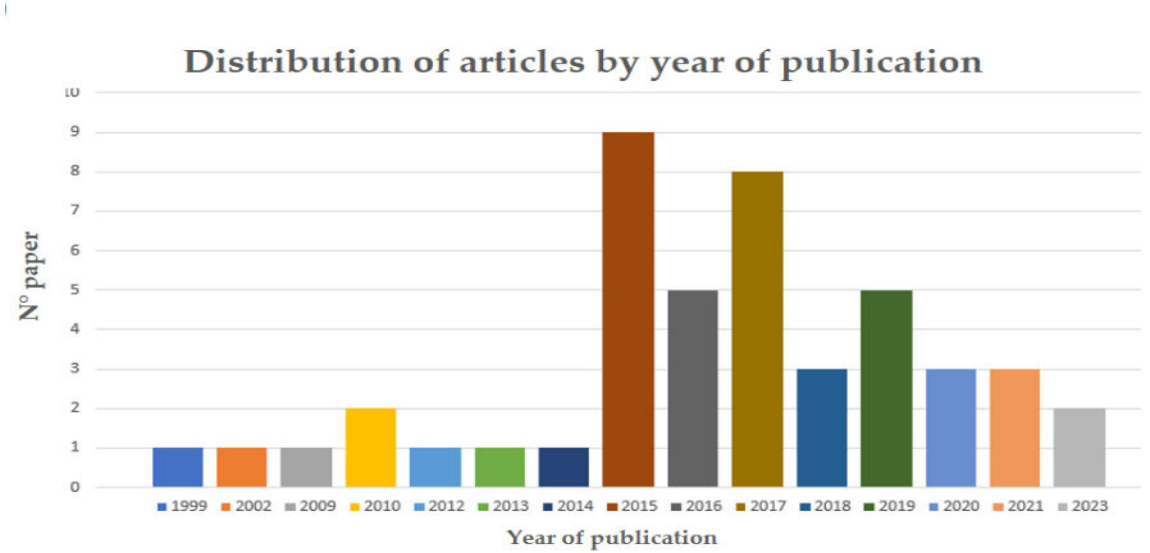
Future directions

Methods

Keywords: (Touch DNA) AND (Secondary DNA Transfer); (Touch DNA) AND (Indirect DNA Transfer); (Touch DNA) AND (Secondary); (Touch DNA) AND (Indirect).

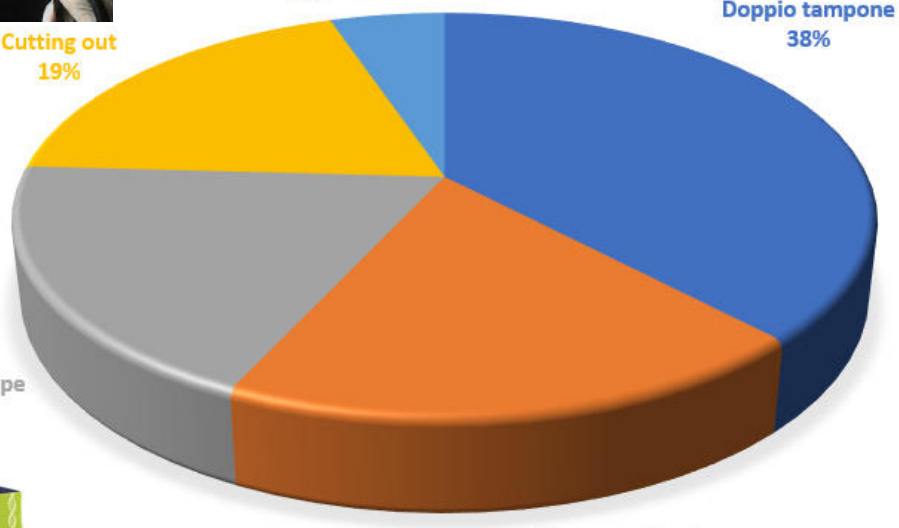




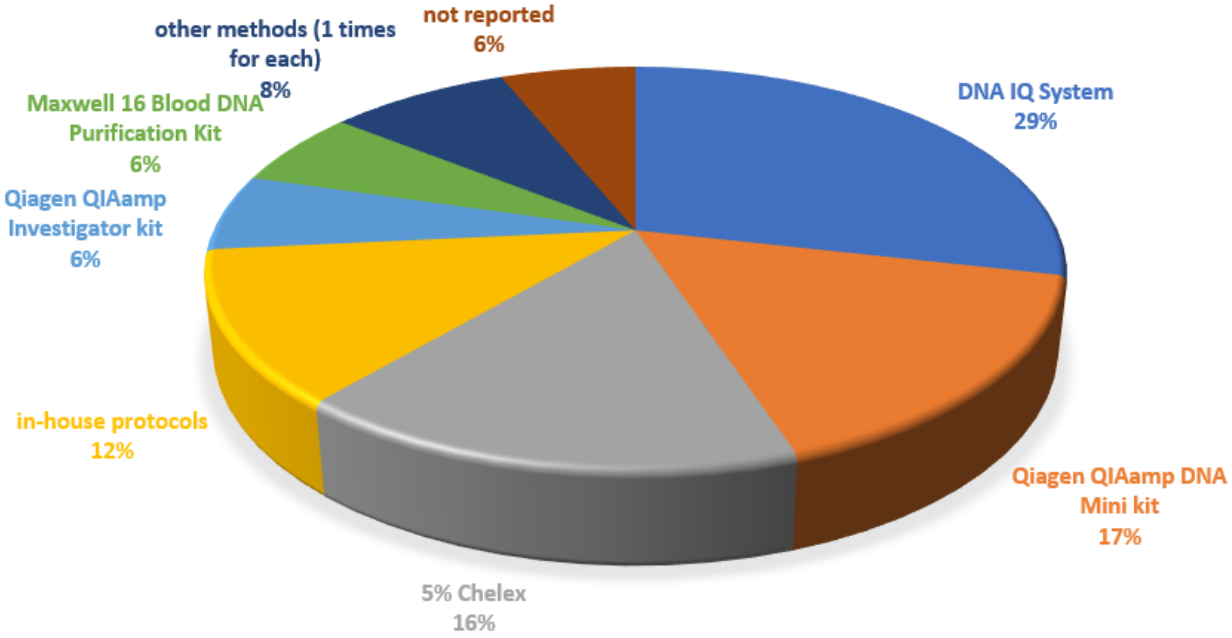


Results

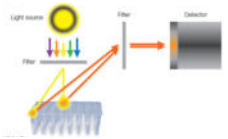
Campionamento



Kit di estrazione

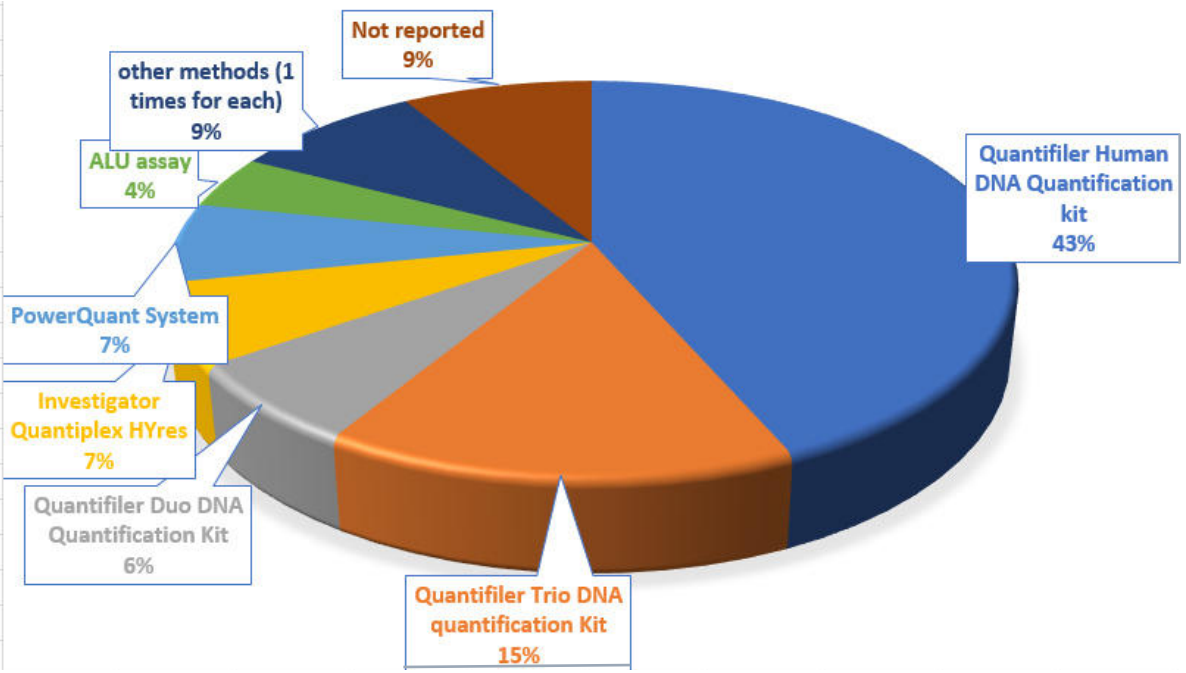


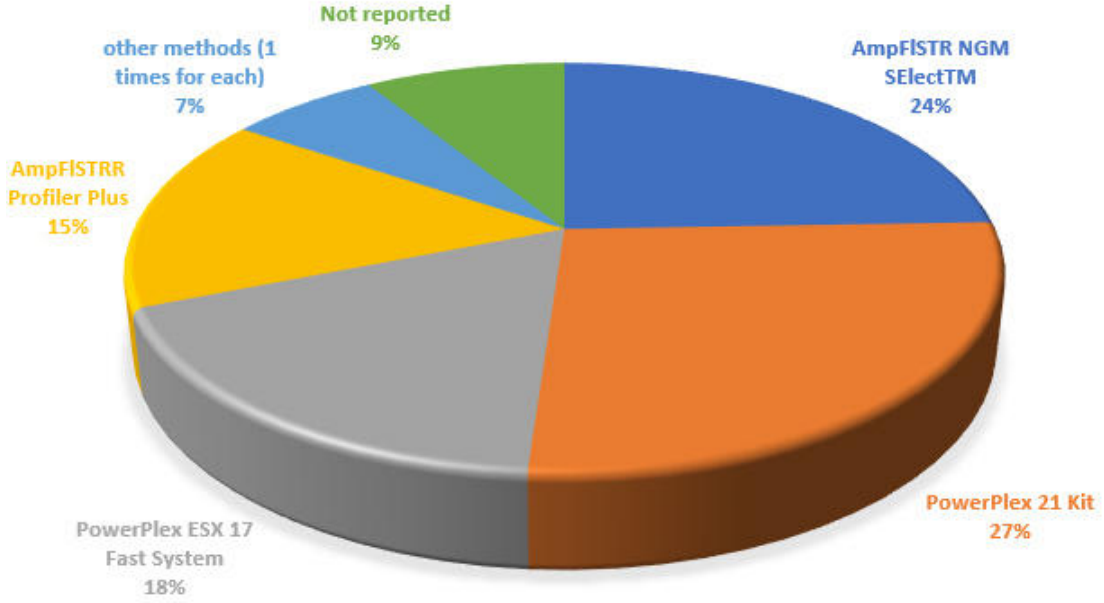
Results



Quantificazione

Amplificazione





Results

Variabili che influenzano il transfer

Background DNA

Oggetto

Traccia

Tipo

Tempo di deposito

Contatto

Tipo di contatto
Durata, body zone, condizione

Individu

Attività e body zone

high, intermediate and low Shedder

Età, sesso

Attività

Results

Fattori che incidono sulla possibilità di rilevazione del transfer

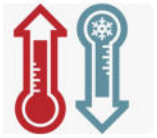
Persistenza

Tempo

Tempo di contatto

Tempo tra contatto e campionamento

Condizioni esterne



Temperatura

Umidità

Crescita microbica

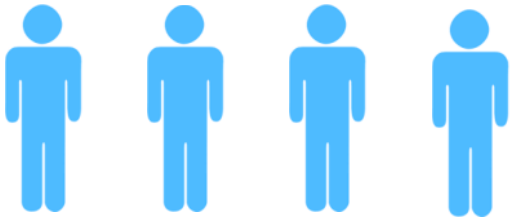
Tecniche

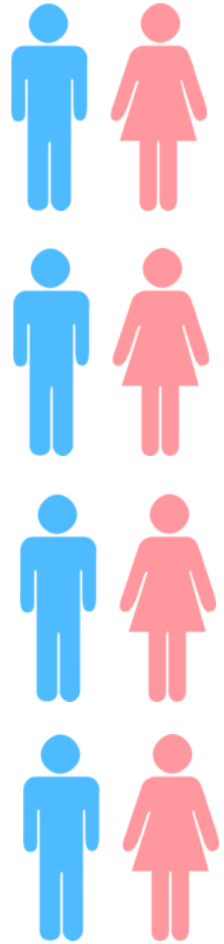
Campionamento
Metodi di rilevazione, Campionamento, Superfice

Metodica di Estrazione

Metodiche di «Profiling»
Amplificazione, Enhancement, LT-DNA

Experimental models

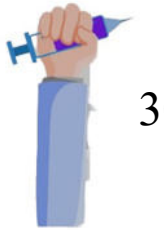




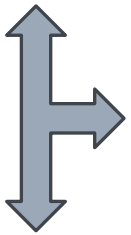
30 sec.

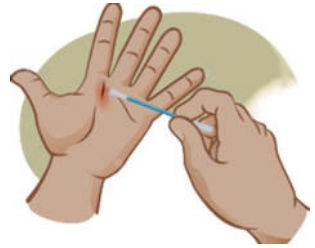
2 h

45 sec.



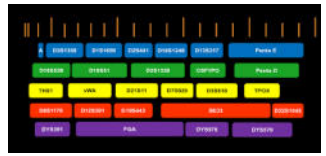
30 sec.





Materials and Methods

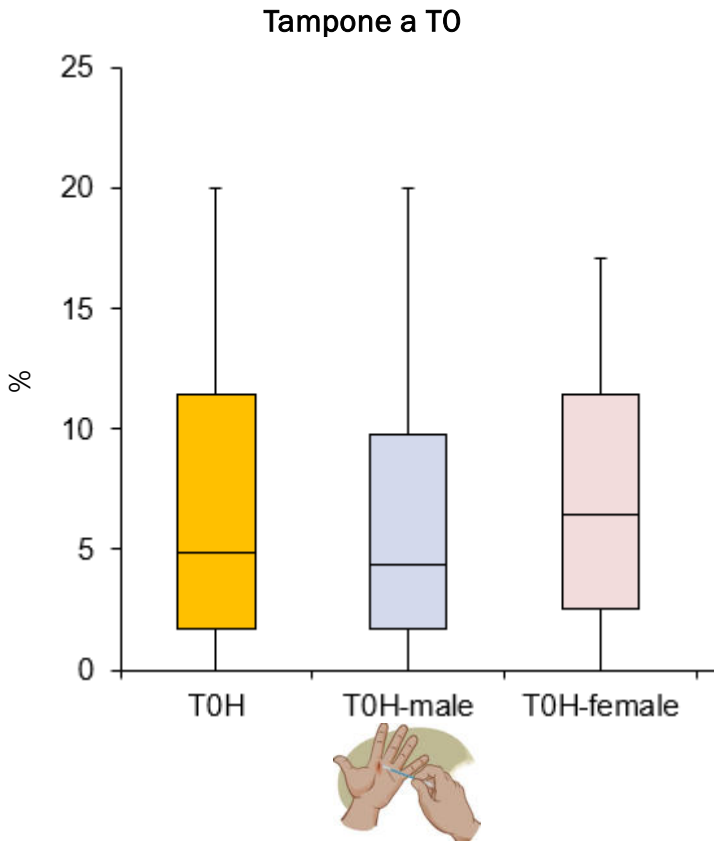
Investigator Quantiplex Kits

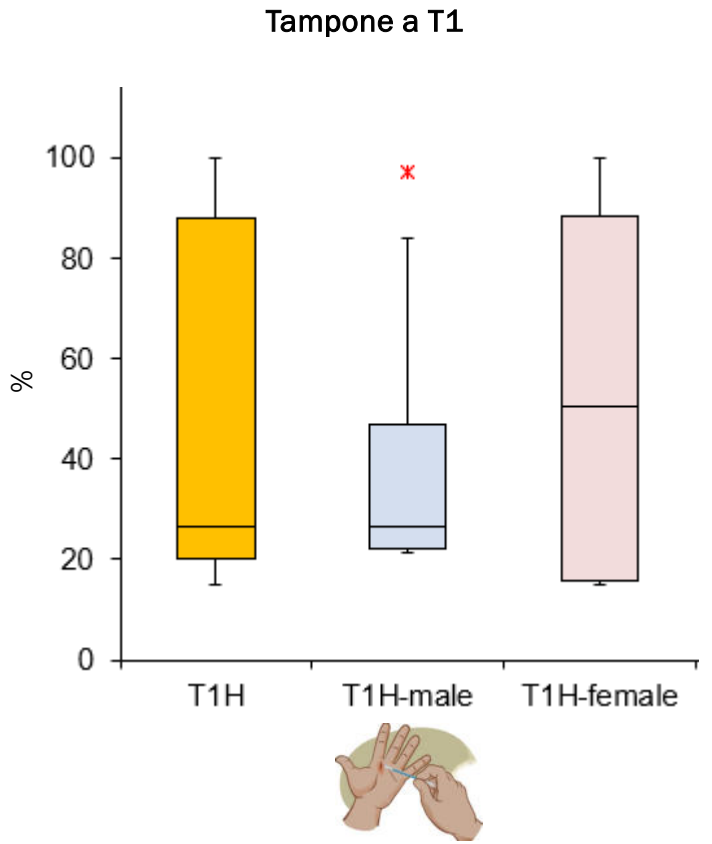


Powerplex Fusion 6C System

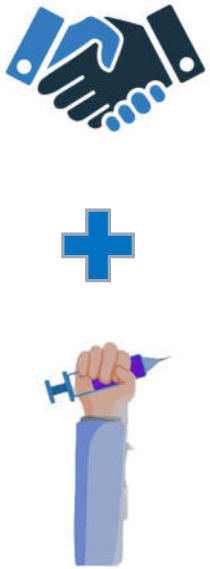
Results – Experimental study

30 sec.

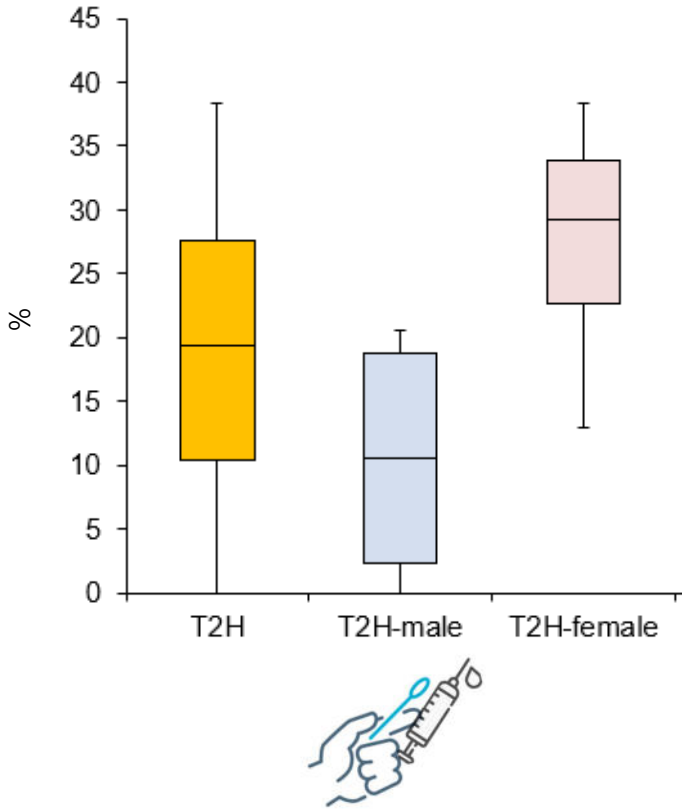




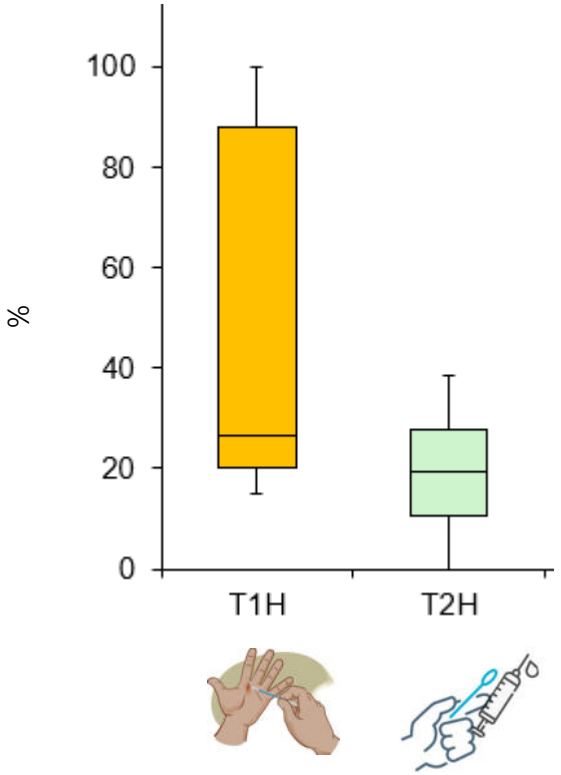
Results – Experimental study



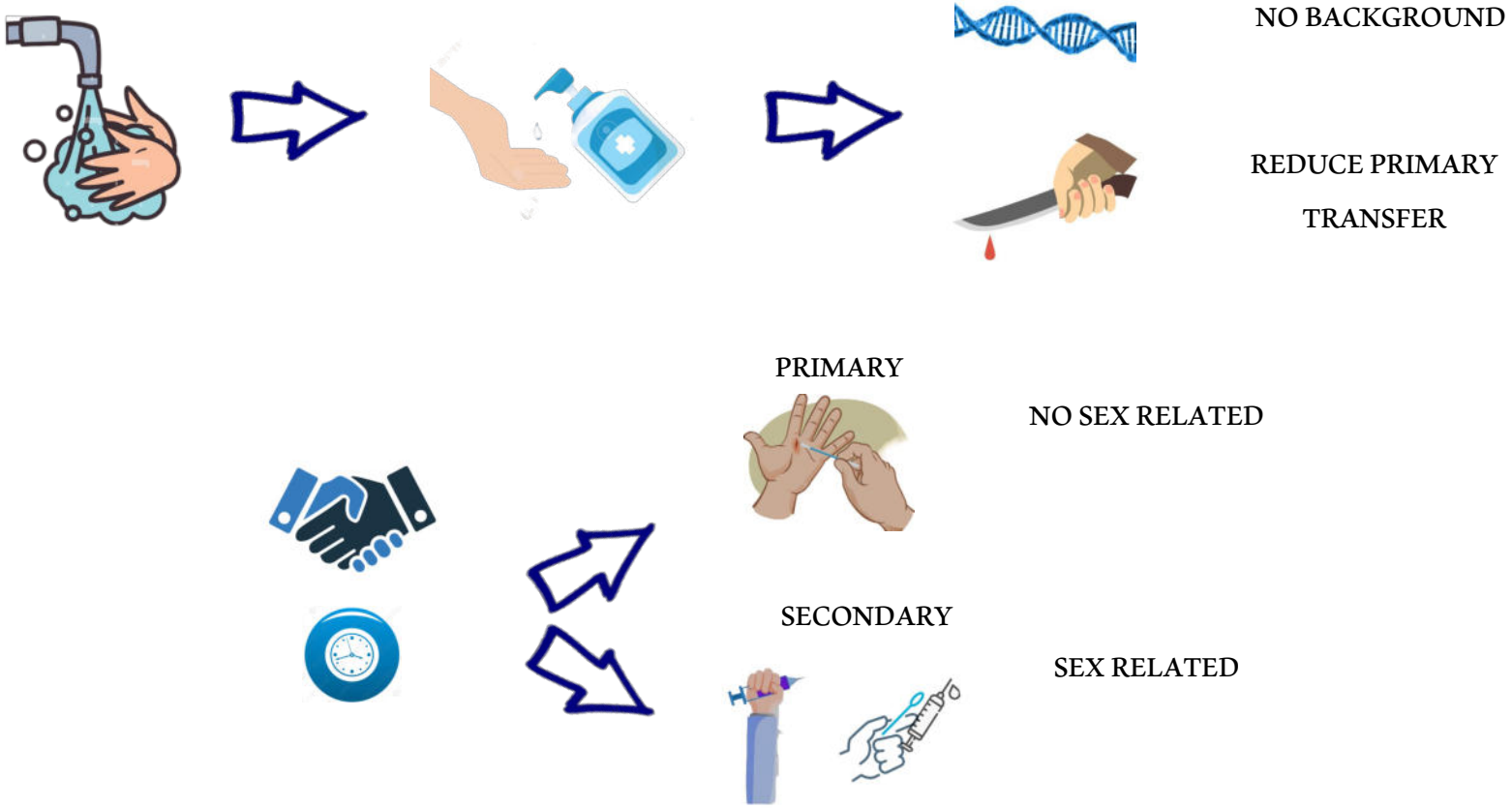
Tampone a T2



Tampone a T1 vs T2



Main findings

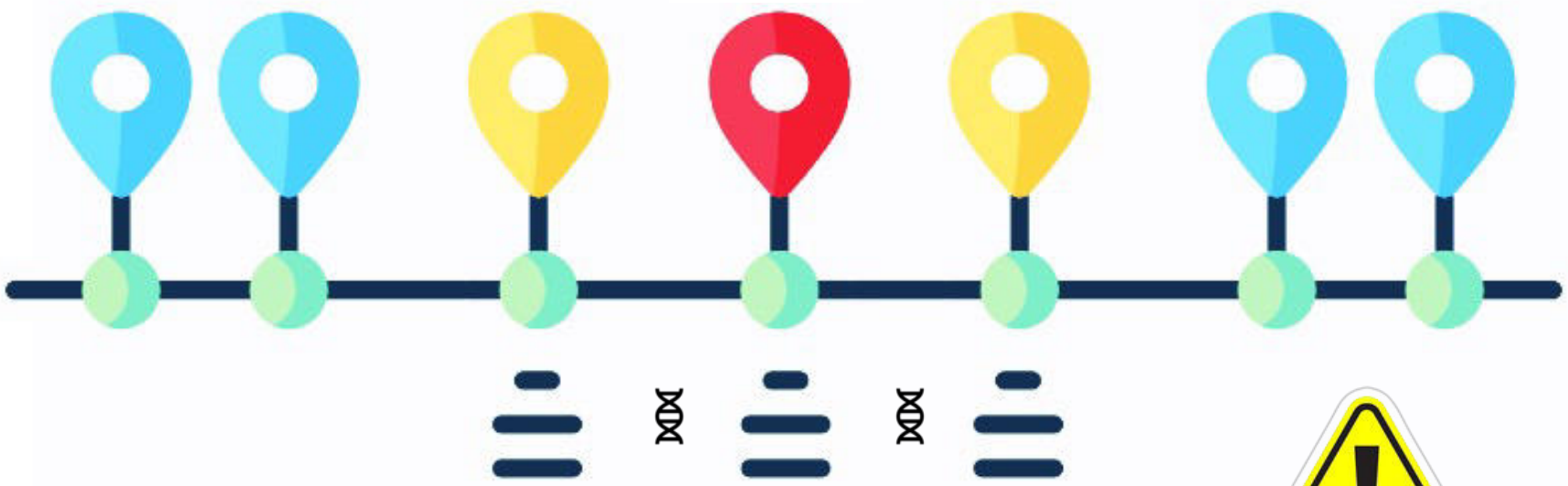


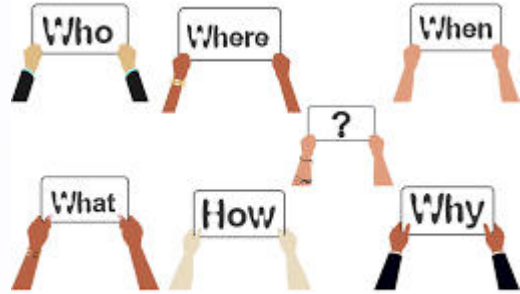
Discussion

DAILY ACTIVITIES

CRIME

INVESTIGATIONS





Possibile «transfer» prima del «Crime»

«Transfer» rilevante

TRACCE BIOLOGICHE

When:	Prima AOI	Durante AOI	Dopo AOI, durante CSI	Durante le indagini
What:	Background DNA	DNA aggiunto/perso	DNA aggiunto/perso	DNA aggiunto/perso
Who:	POI(s) Altri	POI(s)/Altri «Differenti altri»	POI(s)/Altri «Differenti altri»	POI(s)/Altri «Differenti altri»
How:	Direct transfer Indirect transfer	Direct transfer Indirect transfer	Direct transfer Indirect transfer	Direct transfer Indirect transfer

Impact:

Factors:

- Precedenti Contatti
- Tipo di materiale biologico
- Qualità & Quantità DNA
- Materiale biologico essiccato
- Tipo e durata del contatto
- Numero e ordine dei contatti
- Tipologia del substrato
- Tempo intercorso e ambiente
- Metodi (Thresholds)

Potenziali fattori che influenzano il «Transfer», Persistenza, Prevalenza e Recupero (TPPR)

van Oorschot, R.A.H., Meakin, G.E., Kokshoorn, B., Goray, M., Szkuta, B. DNA transfer in forensic science: recent progress towards meeting challenges. (2021) Genes, 12 (11), art. no. 1766, . DOI: 10.3390/genes12111766

Discussion

Forensic Science International: Genetics 36 (2018) 189–202

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence - Guidelines highlighting the importance of propositions
Part I: evaluation of DNA profiling comparisons given (sub-) source propositions

Peter Gill[a,b,*,1], Tacha Hicks[c,d,**,1], John M. Butler[e], Ed Connolly[f], Leonor Gusmão[g,h,i], Bas Kokshoorn[j], Niels Morling[k], Roland A.H. van Oorschot[l,m], Walther Parson[n,o], Mechthild Prinz[p], Peter M. Schneider[q], Titia Sijen[j], Duncan Taylor[r,s]

[a] Oslo University Hospital, Oslo, Norway
[b] University of Oslo, Oslo, Norway
[c] Faculty of Law, Criminal Justice and Public Administration, School of Criminal Justice, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland
[d] Fondation pour la formation continue Universitaire Lausannoise (UNIL-EPFL), 1015 Dorigny, Switzerland
[e] National Institute of Standards and Technology, Special Programs Office, Gaithersburg, MD, USA
[f] Forensic Science Ireland, Garda HQ, Phoenix Park, Dublin 8, D08 HN3X, Ireland
[g] State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil
[h] IPATIMUP, Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Portugal
[i] Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, University of Porto, Portugal
[j] Netherlands Forensic Institute, Division Biological Traces, P.O. Box 24044, 2490 AA The Hague, The Netherlands
[k] Section of Forensic Genetics, Department of Forensic Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark
[l] Office of the Chief Forensic Scientist, Victoria Police Forensic Service Centre, Macleod, VIC 3085, Australia
[m] School of Molecular Sciences, La Trobe University, Bundoora, VIC 3086, Australia
[n] Institute of Legal Medicine, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria
[o] Forensic Science Program, The Pennsylvania State University, PA, USA
[p] John Jay College of Criminal Justice, New York, USA
[q] Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany
[r] Forensic Science South Australia, 21 Divett Place, Adelaide, SA 5000, Australia
[s] School of Biological Sciences, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide, SA, 5001, Australia

Forensic Science International: Genetics 44 (2020) 102186

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Research paper

DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence - Guidelines highlighting the importance of propositions. Part II: Evaluation of biological traces considering activity level propositions

Peter Gill[a,b,*,1], Tacha Hicks[c,d,1], John M. Butler[e], Ed Connolly[f], Leonor Gusmão[g,h,i], Bas Kokshoorn[j], Niels Morling[k], Roland A.H. van Oorschot[l,m], Walther Parson[n,o], Mechthild Prinz[p], Peter M. Schneider[q], Titia Sijen[j], Duncan Taylor[r,s]

[a] Department of Forensic Sciences, Oslo University Hospital, Oslo, Norway
[b] Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway
[c] Faculty of Law, Criminal Justice and Public Administration, School of Criminal Justice, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland
[d] Fondation pour la formation continue universitaire lausannoise (UNIL-EPFL), 1015, Dorigny, Switzerland
[e] National Institute of Standards and Technology, Special Programs Office, Gaithersburg, MD, USA
[f] Forensic Science Ireland, Garda HQ, Phoenix Park, Dublin 8. D08 HN3X, Ireland
[g] State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil
[h] IPATIMUP, Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Portugal
[i] Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, University of Porto, Portugal
[j] Netherlands Forensic Institute, Division Biological Traces, P.O. Box 24044, 2490 AA, The Hague, the Netherlands
[k] Section of Forensic Genetics, Department of Forensic Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark
[l] Office of the Chief Forensic Scientist, Victoria Police Forensic Service Centre, Macleod, VIC, 3085, Australia
[m] School of Molecular Sciences, La Trobe University, Bundoora, VIC, 3086, Australia
[n] Institute of Legal Medicine, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria
[o] Forensic Science Program, The Pennsylvania State University, PA, USA
[p] John Jay College of Criminal Justice, New York, USA
[q] Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine and University Clinic, University of Cologne, Germany
[r] Forensic Science SA, GPO box 2790, Adelaide, 5001, South Australia, Australia
[s] School of Biological Sciences, Flinders University, GPO Box 2100, 5001, Adelaide, SA, Australia

Gill P., Hicks T., Butler J.M., Connolly E., Gusmão L., Kokshoorn B., Morling N., van Oorschot R.A.H., Parson W., Prinz M., Schneider P.M., Sijen T., Taylor D. DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence - Guidelines highlighting the importance of propositions: Part I: evaluation of DNA profiling comparisons given (sub-) source propositions(2018) Forensic Science International: Genetics, 36, pp. 189 - 202DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.07.003.

Gill P., Hicks T., Butler J.M., Connolly E., Gusmão L., Kokshoorn B., Morling N., van Oorschot R.A.H., Parson W., Prinz M., Schneider P.M., Sijen T., Taylor D. DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence - Guidelines highlighting the importance of propositions. Part II: Evaluation of biological traces considering activity level propositions(2020) Forensic Science International: Genetics, 44, art. no. 102186DOI: 10.1016/j.fsigen.2019.102186.

Discussion

Table 1
Relationship of various levels in the hierarchy of propositions relative to the purpose, issues, results and factors to consider. Within source variation refers to the variability of the results (e.g. presence/absence of peaks, peak heights, DNA quantities) given that the DNA came from the POI. The table is adapted from the SEFE online course (http://www.formation-continue-unil-epfl.ch/en/formation/statistics-evaluation-forensic-evidence-cas/).

Level in the hierarchy of propositions	Purpose	Issue	Results	Factors
Sub-source	Investigation	Who could be the source of the DNA?	DNA profile	Occurrence in the relevant population
	Evaluation	Is the DNA from Mr S?		Within source variation
Source	Investigation	Who could be the source of the biological fluid?	DNA profile Presumptive tests	Occurrence in the relevant population
	Evaluation	Is the biological fluid from Mr S?		Within source variation Test false pos./neg. Cross-reactivity etc.
Activity	Evaluation Did Mr S perform the given activity?		DNA profile Presumptive tests Extrinsic characteristics (relative quantity of DNA, where it was recovered) Multiple traces	Occurrence in the relevant population Within source variation Transfer, persistence, and recovery (TPR) DNA present for unknown reasons (background)

Gill P., Hicks T., Butler J.M., Connolly E., Gusmão L., Kokshoorn B., Morling N., van Oorschot R.A.H., Parson W., Prinz M., Schneider P.M., Sijen T., Taylor D. DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence - Guidelines highlighting the importance of propositions: Part I: evaluation of DNA profiling comparisons given (sub-) source propositions(2018) Forensic Science International: Genetics, 36, pp. 189 - 202DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.07.003

Discussion

Activity level

Forensic Science International: Genetics 36 (2018) 34–49

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Review article

Evaluation of forensic genetics findings given activity level propositions: A review

Duncan Taylor[a,b,*], Bas Kokshoorn[c], Alex Biedermann[d,e]

[a] Forensic Science SA, PO Box 2790, Adelaide, SA 5000, Australia
[b] School of Biological Sciences, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide, SA 5001, Australia
[c] Department of Biological Traces, Netherlands Forensic Institute, P.O. Box 24044, NL-2490AA, The Hague, The Netherlands
[d] Faculty of Law, Criminal Justice and Public Administration, School of Criminal Justice, University of Lausanne, Lausanne-Dorigny, Switzerland
[e] University of Adelaide Law School, Litigation Law Unit, Adelaide, SA 5000, Australia

ARTICLE INFO

Keywords:
Evidence evaluation
Bayesian networks
Likelihood ratio
DNA
Activity level propositions

ABSTRACT

The evaluation of results of forensic genetic analyses given activity level propositions is an emerging discipline in forensic genetics. Although it is a topic with a long history, it has never been considered to be such a critically important topic for the field, as today. With the increasing sensitivity of analysis techniques, and advances in data interpretation using probabilistic models ('probabilistic genotyping'), there is an increasing demand on forensic biologists to share specialised knowledge to help recipients of expert information address mode and timing of transfer and persistence of traces in court. Scientists thereby have a critical role in the assessment of their findings in the context of the case. This helps the judiciary with activity level inferences in a balanced, robust and transparent way, when based on (1) proper case assessment and interpretation respecting the hierarchy of propositions (supported by, for example, the use of Bayesian networks as graphical models), (2) use of appropriate data to inform probabilities, and (3) reporting guidelines by international bodies. This critical review of current literature shows that with certain prerequisites for training and quality assurance, there is a solid foundation for evidence interpretation when propositions of interest are at the 'activity level'.

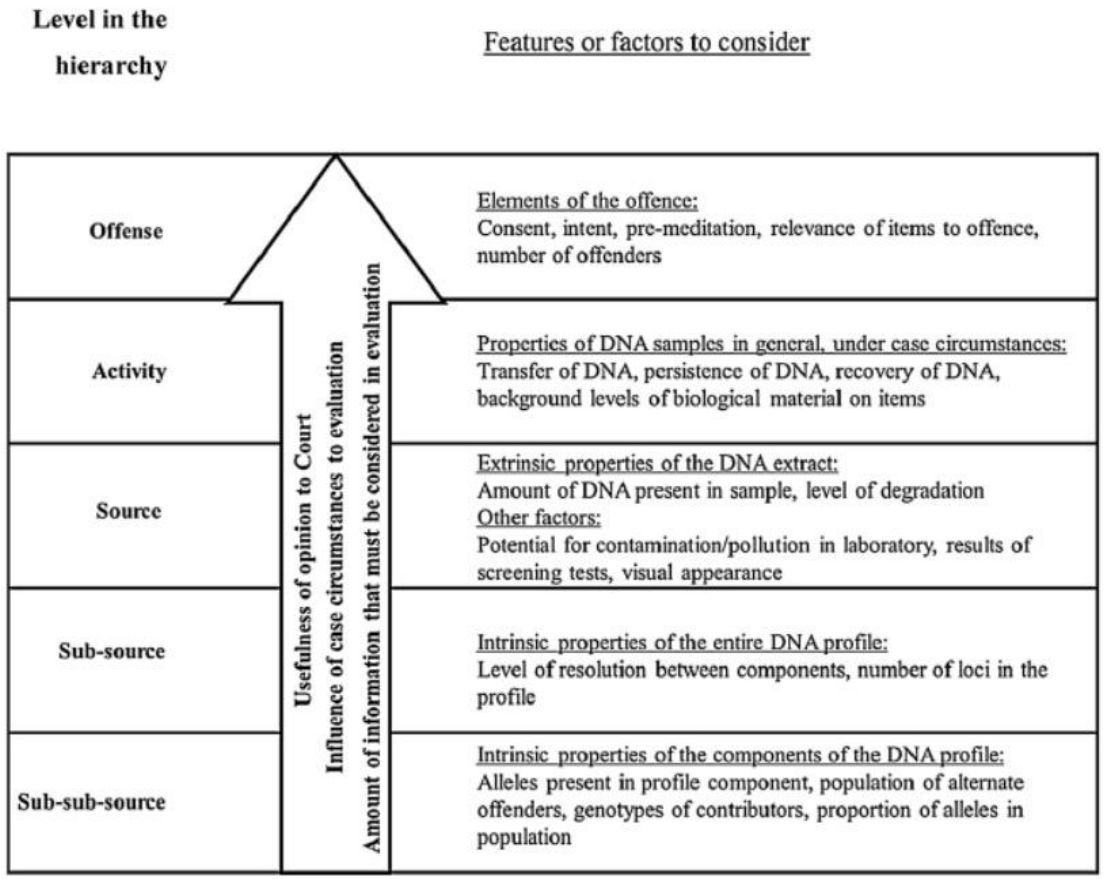


Fig. 1. Hierarchy of propositions [20,33,35].

Discussion

Forensic Science International: Genetics 42 (2019) 69–80

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Research paper

Using Bayesian networks to track DNA movement through complex transfer scenarios

Duncan Taylor[a,b,*], Lydie Samie[c,d], Christophe Champod[c]

[a] Forensic Science SA, PO Box 2790, Adelaide, SA, 5000, Australia
[b] School of Biological Sciences, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide, SA, 5001, Australia
[c] Faculty of Law, Criminal Justice and Public Administration, School of Criminal Justice, University of Lausanne, CH-1015, Lausanne-Dorigny, Switzerland
[d] Forensic Genetics Unit, University Center of Legal Medicine Lausanne and Geneva (CURML), Chemin de la Vulliette 4, Lausanne 25, CH-1000, Lausanne, Switzerland

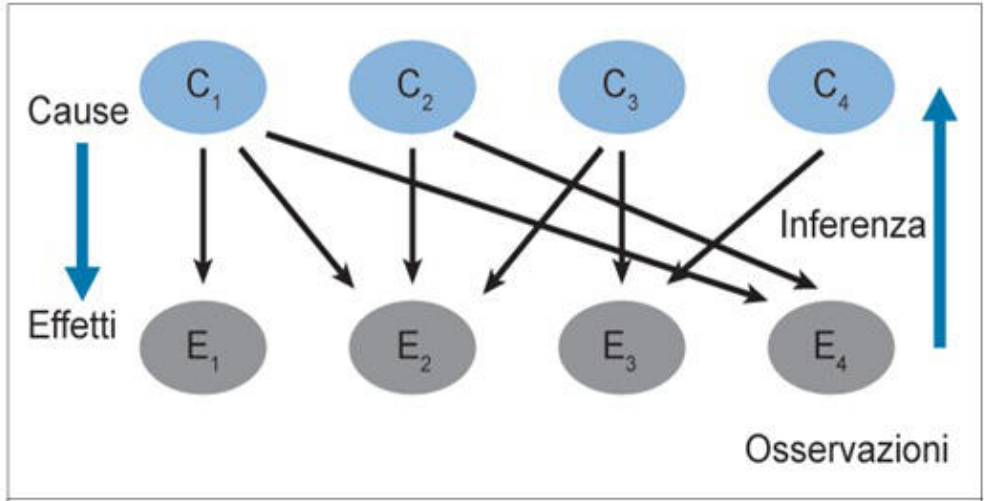
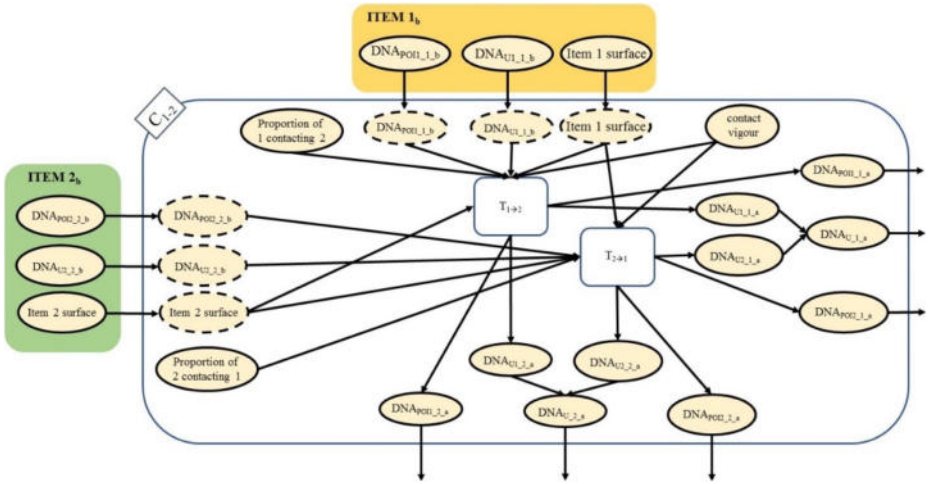


Figura 1 - Data un'osservazione possiamo non essere certi dell'esatta causa che l'ha provocata. Questo tipo di problema è classificato come 'probabilità delle cause' e il processo che porta alla sua risoluzione è detto 'inferenza'.



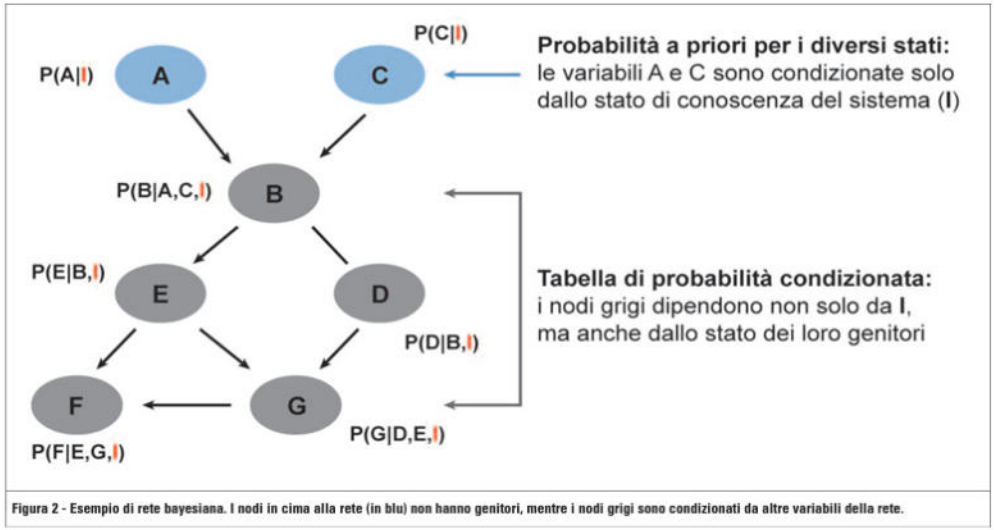


Figura 2 - Esempio di rete bayesiana. I nodi in cima alla rete (in blu) non hanno genitori, mentre i nodi grigi sono condizionati da altre variabili della rete.

Discussion

Future Directions

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigen

Research paper

Explainable artificial intelligence in forensics: Realistic explanations for number of contributor predictions of DNA profiles

Marthe S. Veldhuis [a,b], Simone Ariëns [b], Rolf J.F. Ypma [b], Thomas Abeel [a], Corina C. G. Benschop [c,*]

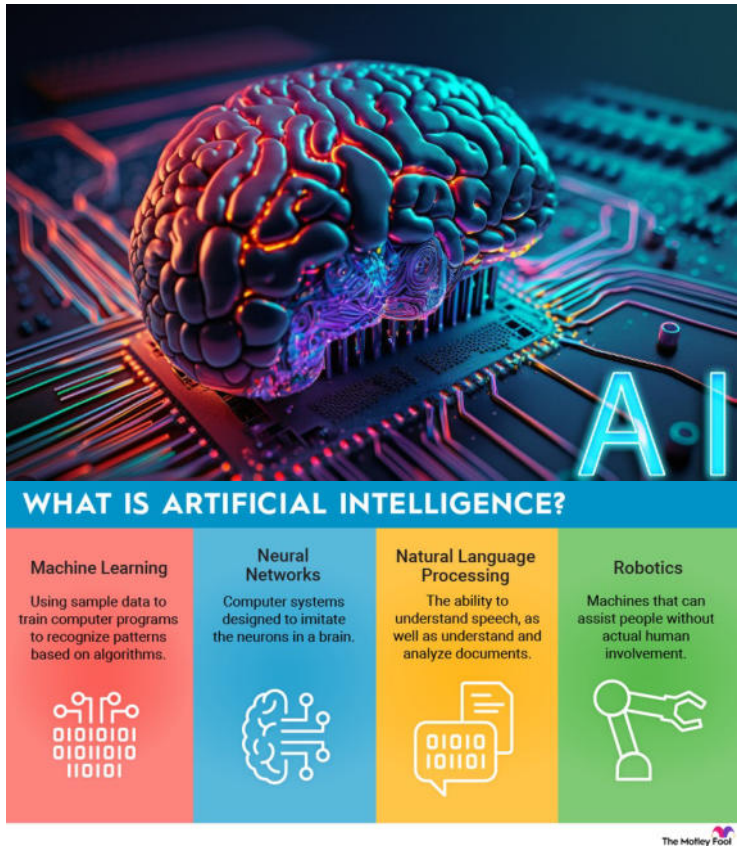
[a] Delft University of Technology, Mekelweg 5, 2628 CD Delft, The Netherlands
[b] Netherlands Forensic Institute, Division of Digital and Biometric Traces, Laan van Ypenburg 6, 2497GB The Hague, The Netherlands
[c] Netherlands Forensic Institute, Division of Biological Traces, Laan van Ypenburg 6, 2497GB The Hague, The Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:
Number of contributors
Explainable artificial intelligence
DNA mixtures
Machine learning
Counterfactual explanations

ABSTRACT

Machine learning obtains good accuracy in determining the number of contributors (NOC) in short tandem repeat (STR) mixture DNA profiles. However, the models used so far are not understandable to users as they only output a prediction without any reasoning for that conclusion. Therefore, we leverage techniques from the field of explainable artificial intelligence (XAI) to help users understand why specific predictions are made. Where previous attempts at explainability for NOC estimation have relied upon using simpler, more understandable models that achieve lower accuracy, we use techniques that can be applied to any machine learning model. Our explanations incorporate SHAP values and counterfactual examples for each prediction into a single visualization. Existing methods for generating counterfactuals focus on uncorrelated features. This makes them inappropriate for the highly correlated features derived from STR data for NOC estimation, as these techniques simulate combinations of features that could not have resulted from an STR profile. For this reason, we have constructed a new counterfactual method, Realistic Counterfactuals (ReCo), which generates realistic counterfactual explanations for correlated data. We show that ReCo outperforms state-of-the-art methods on traditional metrics, as well as on a novel realism score. A user evaluation of the visualization shows positive opinions of end-users, which is ultimately the most appropriate metric in assessing explanations for real-world settings.

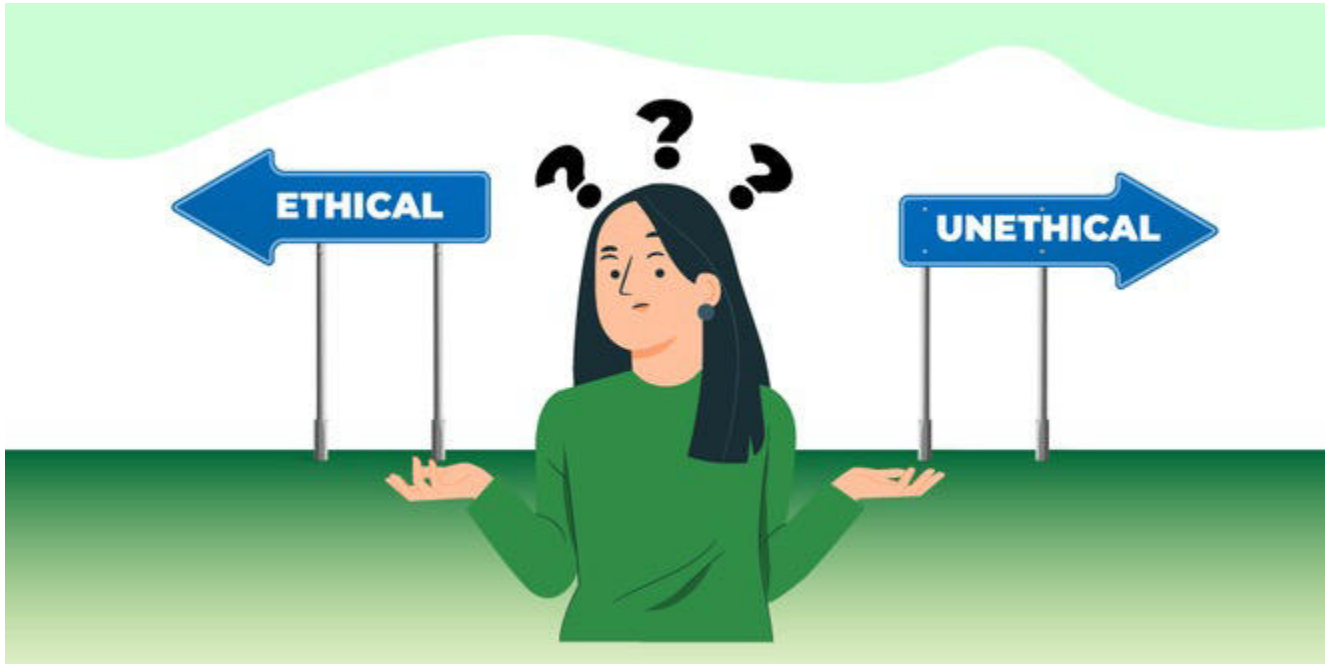


Open question

Privacy legata ai test genetici

Accreditamento

Possibili conflitti di interessi



Utilizzo di reperti non conservati in modo ottimale

Utilizzo di campioni conservati

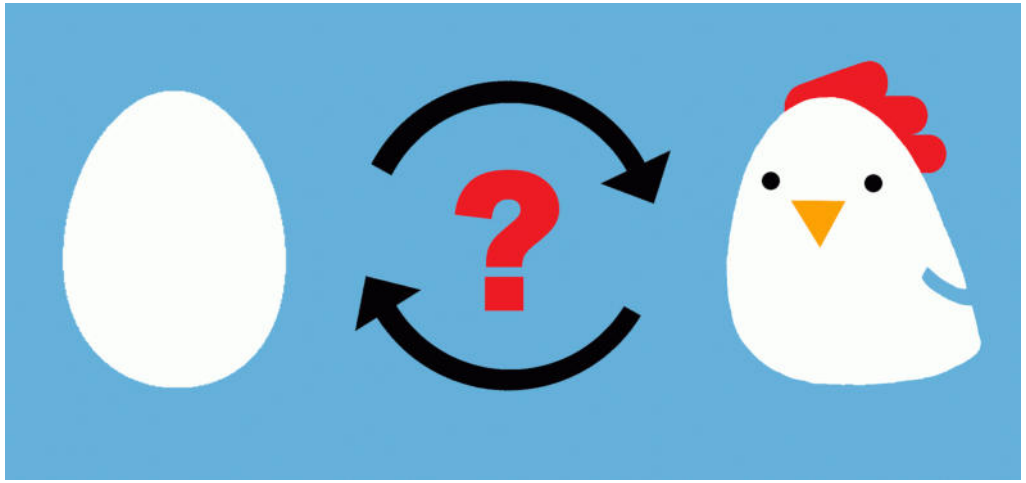
Problemi legati al test (accuratezza, sensibilità, specificità,...)

Scoperta accidentale di alterazioni genetiche

Open question

Case Assessment and Interpretation (CAI) model.

Il processo di assegnazione delle probabilità date le attività prima di conoscere i risultati garantisce che gli scienziati non siano influenzati da ciò che hanno ottenuto (ovvero, evitando la razionalizzazione post hoc).



Explanation.

Nel contesto di una valutazione scientifica forense, le spiegazioni vengono generate dopo che sono stati ottenuti i risultati forensi.

da: OSAC 2022-S-0024 Best Practice Recommendations for Evaluative Forensic DNA Testimony

Open question

- Quanto sono applicabili i «Bayesian Networks»?

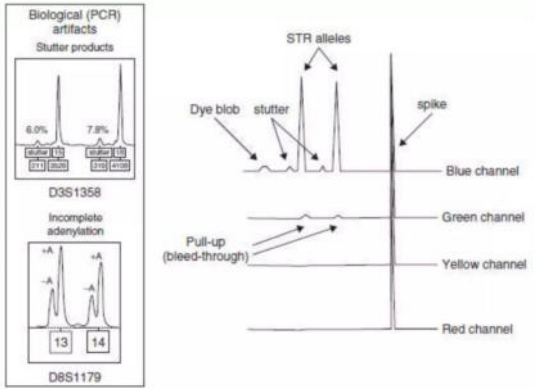
- La formulazione delle preposizioni è sempre corretta?

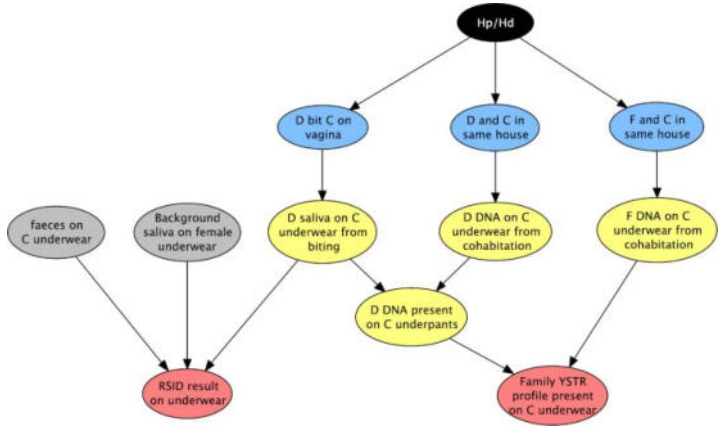
"La presenza del DNA sul coltello è più probabile se si è verificato un trasferimento diretto piuttosto che se si è verificato un trasferimento indiretto."

"La presenza del DNA sul coltello è più probabile se il sospettato impugnasse il coltello piuttosto che se avesse stretto la mano al colpevole."

da: OSAC 2022-S-0024 Best Practice Recommendations for Evaluative Forensic DNA Testimony

Open question



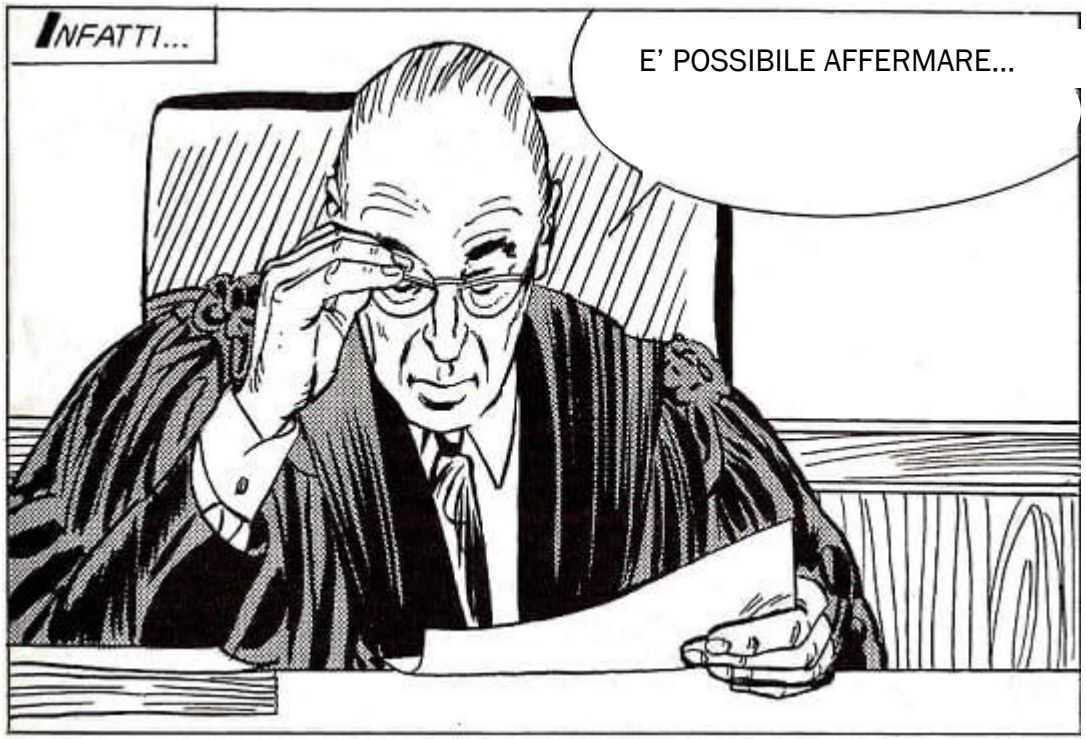


Open question

29° CONVEGNO NAZIONALE DEI GENETISTI FORENSI ITALIANI

LA GENETICA FORENSE È AL SERVIZIO DELLA PERSONA FRAGILE?

Take home message



"Come scienziato, posso occuparmi solo di probabilità poiché tutte le cose possono essere possibili.»

“Possibile è qualsiasi probabilità diversa da zero, ma ciò che è rilevante quando si valuta l’evidenza è considerare la probabilità relativa assegnata a quell’evidenza data ciascuna delle due diverse proposizioni”.

"Posso rispondere alla tua domanda solo se considero le probabilità relative delle prove considerando due opzioni, non affermando un valore intrinseco sconosciuto di una singola proposizione isolatamente.«

“L’unico modo per contestualizzare il termine “possibile” è confrontare le probabilità relative dell’evidenza data ciascuna di due diverse proposizioni. Non possiamo mai essere certi della probabilità dell’evidenza di un dato evento, ma possiamo fornire il contesto confrontando le probabilità date ciascuna di due proposizioni diverse e mutuamente esclusive”.

"Ci possono essere molti modi per spiegare come il DNA sia stato depositato da qualche parte. Non posso valutare adeguatamente ogni possibilità da sola. Il mio compito è confrontare le probabilità di ottenere questo tipo di profilo DNA in due diversi scenari che sono utili e ragionevole al caso. Il risultato può cambiare quando si confrontano diversi scenari, ma non ha molto valore considerare un solo scenario da solo."

da: OSAC 2022-S-0024 Best Practice Recommendations for Evaluative Forensic DNA Testimony

Conclusions

Future Directions

La definizione di studi sperimentali ben disegnati e l'utilizzo delle più moderne tecniche di estrazione e amplificazione consentiranno di definire i «Gold Standard Methods».

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 8 (2022) 268–270

Contents lists available at ScienceDirect

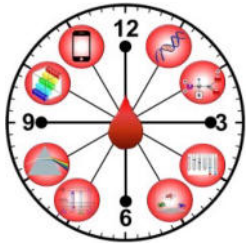
Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigss

Novel cellular signatures for determining time since deposition for trace DNA evidence

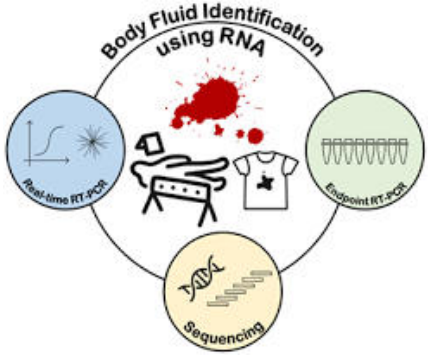
Sarah Ingram, M. Katherine Philpott, Christopher J. Ehrhardt *

Department of Forensic Science, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23284, USA

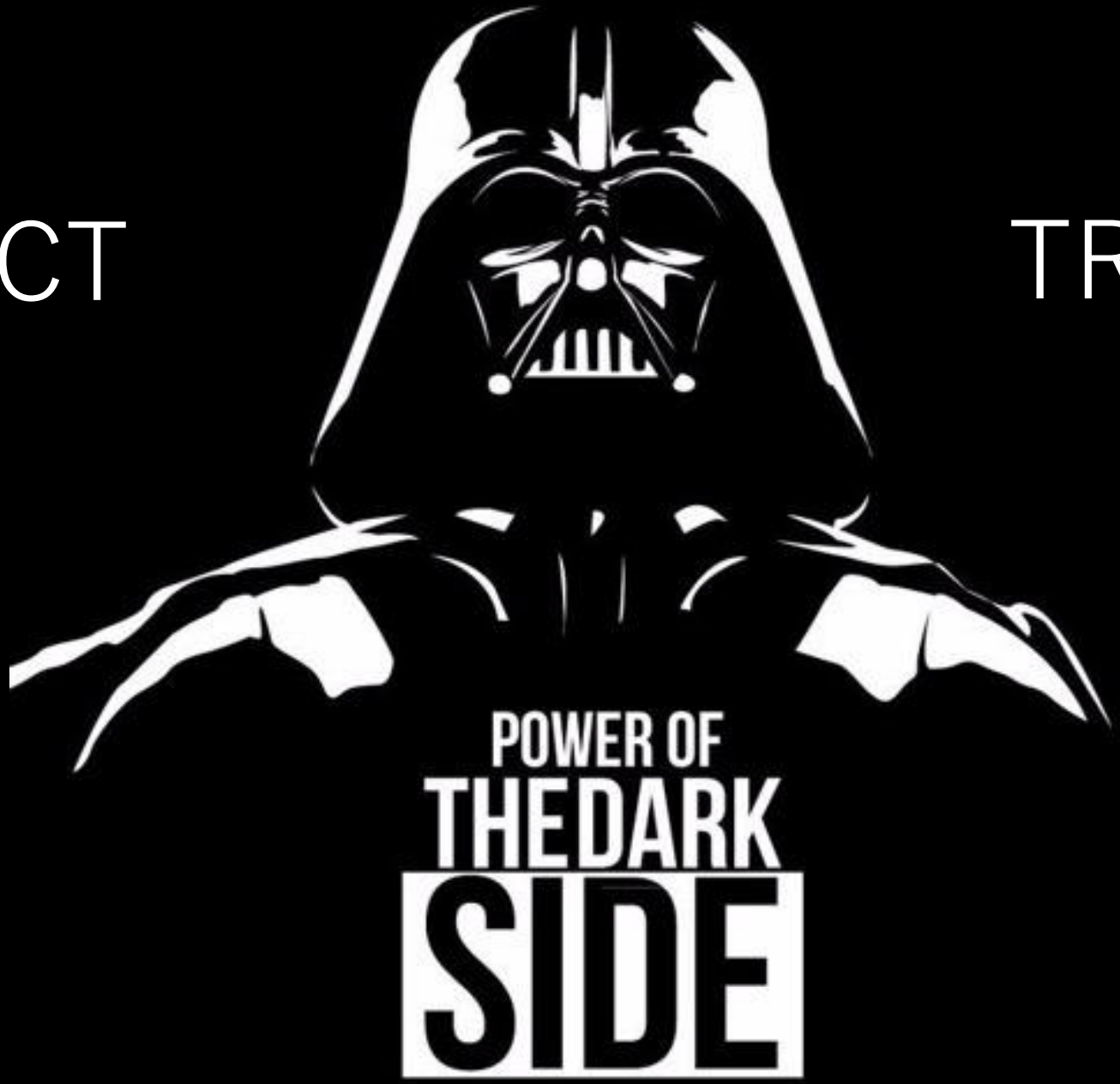


Epithelial cell populations could be classified with high accuracy (~90%) into one of three time-since-deposition groups: < 1 week, between 1 week and 2 months, and > 2months.

DNA investigations



INDIRECT TRANSFER



" What do we do with the ones exonerated by a new DNA test ? "

46° CONGRESSO
NAZIONALE
SIMLA
Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni
E DELLE SCIENZE FORENSI E CRIMINALISTICHE
3-5 GIUGNO WORKSHOPS
6-8 GIUGNO 2024
CATANIA
SAVE THE DATE

SAVE
THE
DATE

29° CONVEGNO NAZIONALE
DEI GENETISTI FORENSI ITALIANI
Messina, 9-11 novembre 2023

L'importanza del *pre-assessment*

e della corretta formulazione delle ipotesi

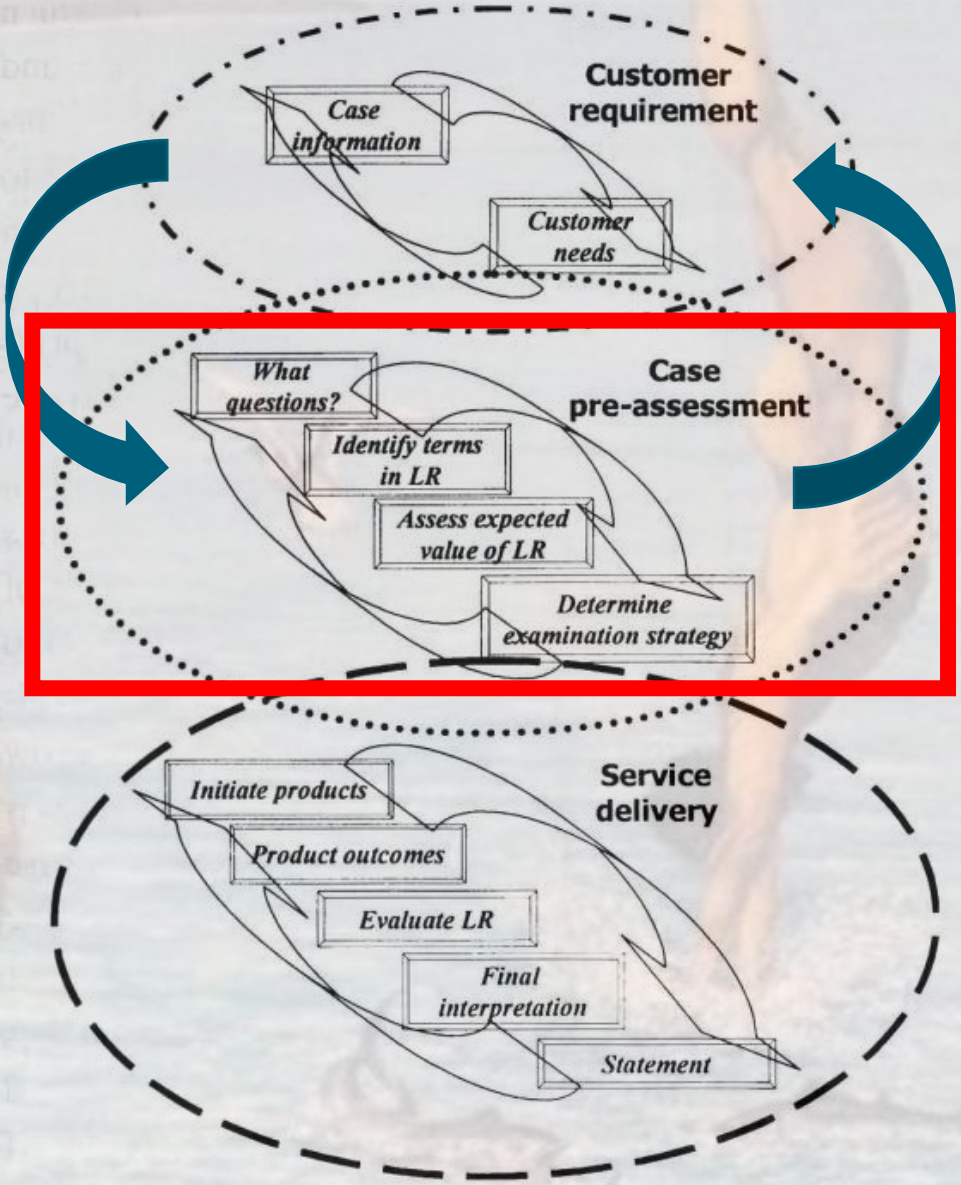
Federica Alessandrini,
Università Politecnica delle Marche
f.alessandrini@univpm.it

Case Assessment and Interpretation - CAI

Stage 1

Stage 2

Stage 3



European Network of Forensic Science Institutes

ENFSI

Case pre-assessment may not always be necessary for source level propositions, but **should be conducted in cases when activity level propositions are set**

Cook et al - A model for case assessment and interpretation (1998)

Customer Requirements

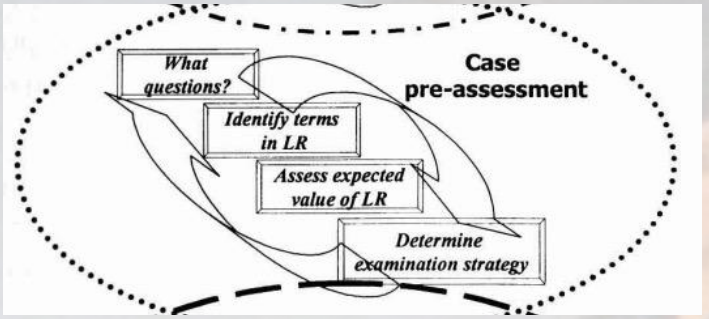
- Acquisire tutte le informazioni **rilevanti** del caso

  dove e come sono stati raccolti i reperti, accuse contestate/non contestate; tempistica degli eventi; eventuali dichiarazioni delle parti (se disponibili),…….

  questioni amministrative (scadenze e budget)

- Definire le **necessità** del richiedente

Case pre-assessment



- In che modo il genetista forense può essere utile?

  domande da rispondere (ruolo investigativo/valutativo?)
  test disponibili
  risultati attesi
  ipotesi
  livello nella gerarchia delle proposizioni
  LR

- Definire e concordare la strategia di analisi

Service delivery

- Analisi dei reperti
- Interpretazione dei risultati
- comunicazione e spiegazione dei risultati al cliente

Esempio

Informazioni

- ✓ abbandonato da un rapinatore in banca durante una rapina
- ✓ sequestrato immediatamente da un poliziotto
- ✓ sospettato

Ciò che vuole il PM

Collegamento tra il sospettato e il passamontagna

Acquisire tutte le informazioni rilevanti del caso

- ✓ Il rapinatore è stato nella banca per circa un'ora e ha indossato sempre il passamontagna
- ✓ Il rapinatore urlava frequentemente durante la rapina
- ✓ Sospettato fermato dopo 6 ore
- ✓ Il sospettato nega di essere il rapinatore
- ✓ Il sospettato ammette che il passamontagna è il suo, che lo indossava regolarmente fino a due mesi prima, poi lo ha perso. Qualcun altro lo ha preso e l'ha usato per la rapina.
- ✓ La decisione di indagare S dipende dai risultati sul passamontagna

Definire le necessità del cliente

Ciò che vuole il PM

Source/sub-source?

Collegamento tra il sospettato e il passamontagna

Ciò che necessita il PM

Activity

Il sospettato è la persona che indossava il passamontagna durante la rapina?

Case pre-assessment

- ✓ Test disponibili
- ✓ Risultati attesi
  - profilo genetico (compatibile/non compatibile)
  - quantità di DNA
  - qualità (singolo/misto/completo/parziale)
- ✓ Ipotesi

  Hp: Il sospettato indossava il passamontagna durante la rapina

  Hd: Un'altra persona indossava il passamontagna durante la rapina
- ✓ LR

Profilo genetico	**Pr(E|Hp, I)**	**Pr(E|Hd, I)**	**LR**
Nessun profilo	0,02	0,02	1
Profilo singolo compatibile con S	0,87	0,35	2,5
Profilo singolo non compatibile con S	0,01	0,04	0,25
Profilo misto (componente compatibile con S)	0,09	0,47	0,2
Profilo misto (componenti non compatibili con S)	0,01	0,12	0,08
	11%	**63%**	

- ✓ Definire e concordare la strategia di analisi
  - ✓ vale la pena effettuare il test del DNA sul passamontagna?
  - ✓ altri reperti?

Fibre compatibili col passamontagna	**Pr(E|Hp, I)**	**Pr(E|Hd, I)**	**LR**
Nessuna fibra	0,01	0,92	0,011
Poche fibre (1-5)	0,05	0,05	1
Alcune fibre (6-15)	0,24	0,02	12
Molte fibre (>15)	0,70	0,01	70
	94%	**3%**	

Conclusioni

- ✓ L'interpretazione non è l'ultima fase
- ✓ Pre-assessment permette di capire il problema e mettere a punto la strategia di analisi prima di fare l'analisi
- ✓ Pre-assessment è un processo iterativo
- ✓ Le aspettative non sono indirizzate dai risultati
- ✓ No razionalizzazione *post hoc*
- ✓ Imparzialità, trasparenza, approccio logico, rigore scientifico, robustezza
- ✓ Utilizzo efficiente ed efficace delle risorse economiche

- Un’anziana signora viene aggredita e uccisa a coltellate nel suo appartamento.
- La porta non ha segni di effrazione ed è stata verosimilmente aperta dalla vittima
- L’appartamento è a soqquadro.
- La vittima ha perso notevole quantità di sangue, lasciando presumere che anche l’assassino se ne sia macchiato.
- Sotto il corpo della vittima viene trovata una medaglietta ma non la collanina che la recava.
- Viene perquisita la casa della vicina di pianerottolo, in un portagioie della signora viene trovata una catenina spezzata con una targhetta.
- Una prima analisi preliminare su eventuale presenza di DNA su questa collana e su altri reperti trovati nell’abitazione della sospettata da esito negativo.
- Nonostante ciò il perito procede all’analisi di un potenziale profilo genetico su questi reperti ancora con esito negativo.
- Sui reperti prelevati sulla scena del crimine viene invece trovato Dna, l’analisi da esito positivo e non è mai presente il Dna della sospettata.
- Un secondo laboratorio effettua una nuova ricerca sulla collanina con esito positivo. La concentrazione media di Dna è indicata, nella relazione tecnica, in 3 picogrammi per microlitro. Il secondo laboratorio spiega il differente risultato con il fatto di avere utilizzato un lavaggio del campione in provetta e non il tamponamento come fatto dal primo laboratorio.

- Viene identificata l'autrice materiale del delitto, rea confessa e persona diversa dalla sospettata, la quale esclude la compartecipazione della sospettata. L'autrice materiale, il cui DNA viene rinvenuto sulla scena del crimine, cambia successivamente versione affermando che durante la sua azione sarebbe sopraggiunta la sospettata, la quale avrebbe partecipato al delitto. Queste dichiarazioni vengono giudicate non credibili dalla corte.
- Rimane dunque, come unico elemento a carico della sospettata, il possesso della collana. Scrive la corte di appello che è decisivo il rinvenimento "della collana recante materiale biologico della vittima XXX.. e quindi **della collana che non può non essere altra di quella strappata dal collo della vittima**" da ciò deriva "la correlativa e sicura partecipazione della imputata all'episodio criminoso, **non potendosi giustificare in altro modo quel possesso**".

Quindi la collana inchioda la sospettata.

Per quale prova genetica è pronta la corte?

STAR TREK™

- …….expert knowledge is required to consider factors such as transfer mechanisms, persistence and background levels of the material which could have an impact on the understanding of scientific findings relative to the alleged activities….

ERA ROTONDA, ROTONDA EH? MORTACCI TUA!

IQOS VS SIGARETTA TRADIZIONALE: analisi comparativa del DNA recuperato da sticks di tabacco e mozziconi di sigaretta per le applicazioni forensi

Amurri Sara, Fazio Giulia, Tangorra Elisabetta, Giorgetti Arianna, Susi Pelotti, Carla Bini

Laboratorio di Genetica Forense, sede di Medicina Legale, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC), Università di Bologna

MOZZICONI DI SIGARETTA

- frequentemente rinvenuti sulla scena di un crimine
- importanti elementi probatori

Esame della scena del crimine

Identificazione personale

(Intini A., Picozzi M, 2009)

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Dispositivi IQOS (*Heat-not-burn*) e sticks HEETS e TEREA

- Ampia diffusione di prodotti del tabacco Heat-not-burn" (HNB) tecnologia basata sul riscaldamento del tabacco senza combustione tramite lamina metallica

Diffuso utilizzo di dispositivi IQOS

sticks di tabacco sulla scena del crimine o in altri contest utili a fini identificativi

(Philip Morris website)

Effetti

healthcare

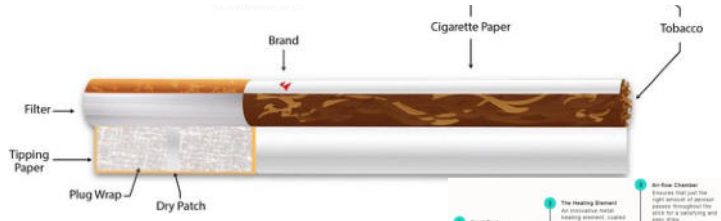
MDPI

Article

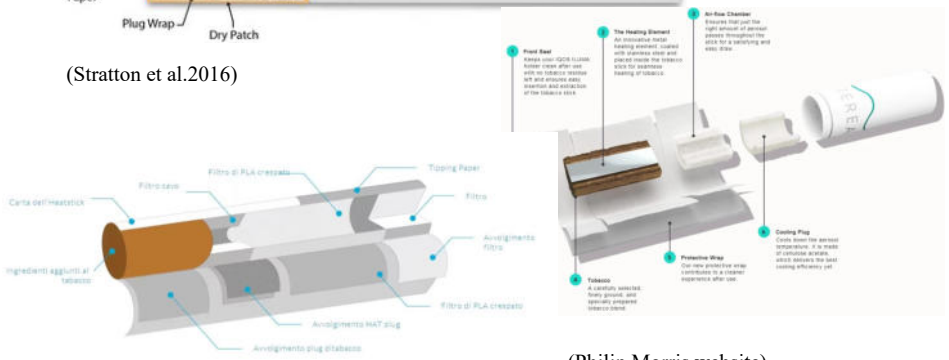
Effects of Heat-Not-Burn Cigarette Smoking on the Secretion of Saliva and Its Innate Immune System Components

Yukihiro Mori [1,2], Mamoru Tanaka [3], Hana Kozai [3], Yuka Aoyama [1,4], Yukihiro Shigeno [5], Kiyoshi Hotta [2], Makoto Aoike [1], Hatsumi Kawamura [1], Masato Tsurudome [1,6] and Morihiro Ito [1,6,*]

Diversa composizione



(Stratton et al.2016)



(Philip Morris website)

Diverse modalità e tempo di consumo

IN LETTERATURA NESSUNO STUDIO SUL RECUPERO DI DNA DA STICKS HEETS E TEREA

Obiettivi dello studio

- Valutare la **quantità** e la **qualità del DNA** ottenuto da mozziconi di sigaretta tradizionale e da sticks di tabacco HEETS e TEREA fumati da volontari

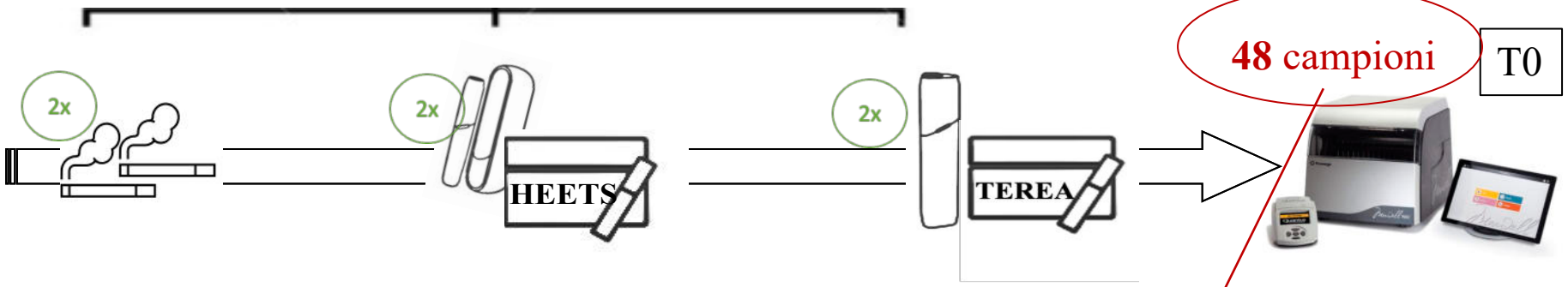
- Valutare l'**influenza del fattore tempo** sul recupero del DNA

- **DNA profiling**

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DISEGNO DELLO STUDIO

Tampone buccale per profilo di riferimento



48 campioni

T0

1 mese

96 campioni totali

48 campioni

T1

Campionamento: prelevati ¾ **della sezione più esterna della carta di rivestimento dei mozziconi**

WORKFLOW

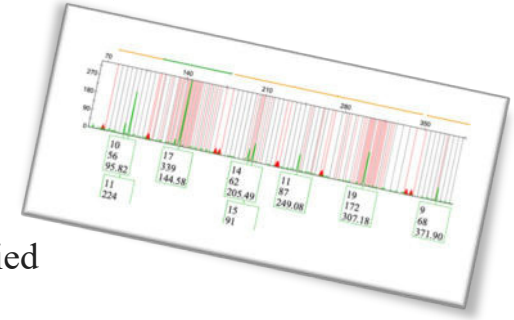
Estrazione

Maxwell® RSC
Maxwell® FSC DNA
IQ™ Casework (Promega)

Kit ReadyAMP TM Genomic DNA purification System (Promega)

Quantificazione

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific)
PowerQuant® System (Promega)



Amplificazione

GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems™)

Elettroforesi capillare e analisi dei frammenti ottenuti

SeqStudio™ Genetic Analyzer System
GeneMapper® ID-X v 1.6 (Thermo Fisher Scientific)

Analisi statistica

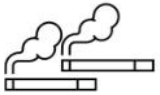
GraphPad Prism v. 8.2.1

Software LRmix Studio v. 2.1.5

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Risultati di quantificazione DNA

SIGARETTA TRADIZIONALE



T0 - a fresco -	T1 - dopo un mese-
0,265 ng/µl -**7,43** ng/µl	**0,121** ng/µl -**3,35** ng/µl

STICKS HEETS

T0 - a fresco -	T1 - dopo un mese-
0,0013 ng/µl -**2,57** ng/µl	**0,0037** ng/µl -**6,47** ng/µl

STICKS TEREA

T0 - a fresco -	T1 - dopo un mese-
0,0008 ng/µl -**2,91** ng/µl	**0,011** ng/µl -**2** ng/µl

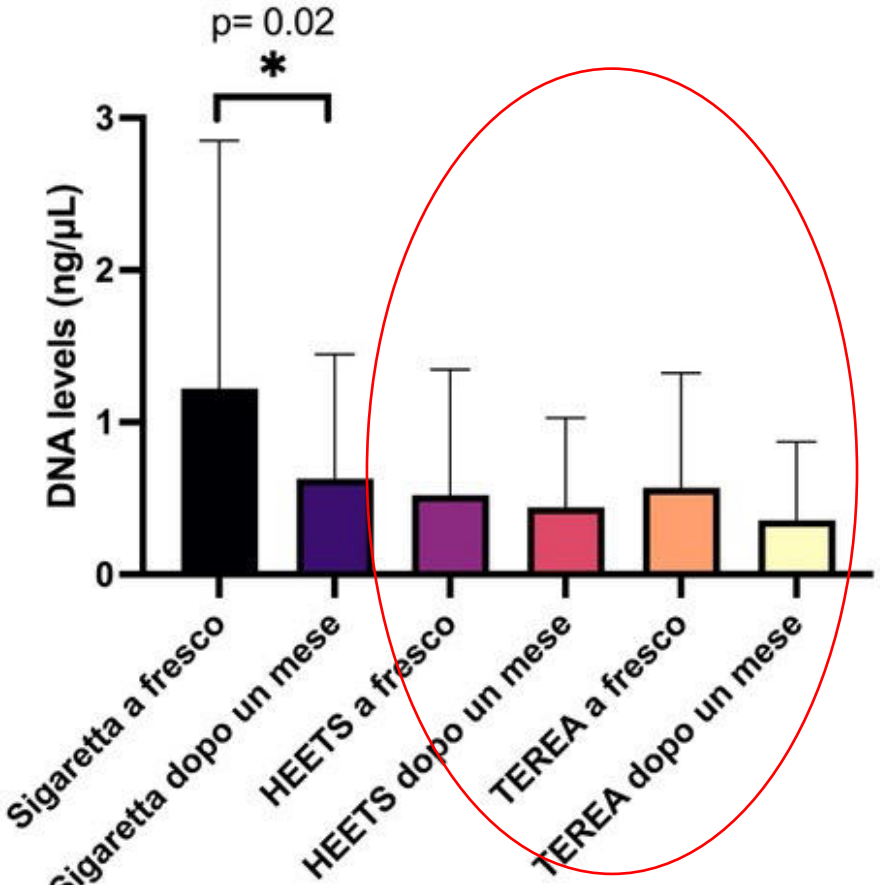
- **4 campioni**: [DNA] < 6 pg /µl (Heets e Terea)
- **4 campioni femminili** mistura con [Y] < 7pg
- **1 campione** (Terea al T1) DI 4,35

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Risultati analisi statistiche

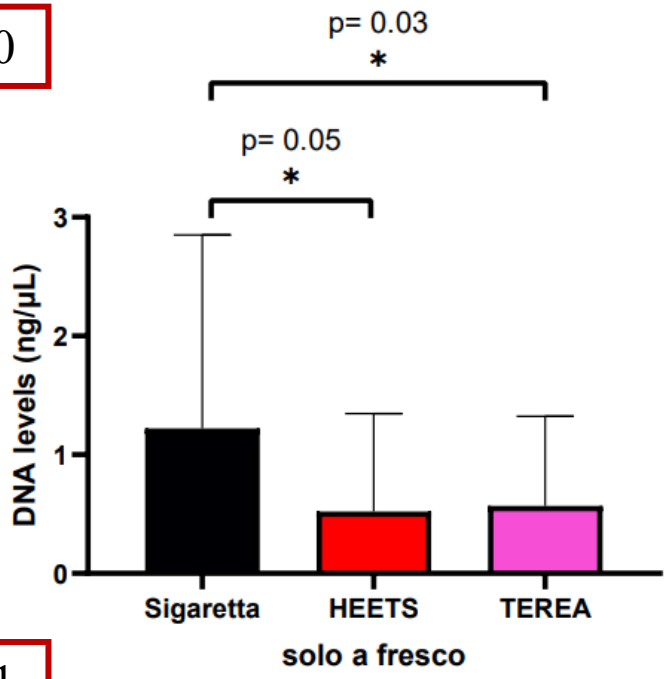
- ***Test di Mann Whitney*:** differenze non statisticamente significative tra maschi e femmine nella quantità di DNA depositata per tutte le possibili variabili

- ***Test di Wilcoxon***



- ***Confronto multiplo (test di Dunn)***

T0



T1

Confronto dei 3 gruppi → **no statisticamente significativo**

* = statisticamente significativo

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Risultati di genotipizzazione

Cut-off di amplificazione:
DNA ≥ 6 pg/µl

Totale : **92 campioni (95.83%)**

PROFILI COMPLETI
86 (93.48%)

PROFILI PARZIALI
6 (6.52%)
effetti stocastici : locus e allelic drop-out
1 sigaretta tradizionale
4 HEETS
1 TEREA

Tutti idonei al confronto
> 10 loci tipizzati

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Classificazione profili genetici

Singolo contributore

86 profili
(93.48%)

Più contributori

Con contributore maggioritario

2 profili
(33.33%%)

Senza contributore maggioritario

4 profili
(66.67%)

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CONFRONTO CON REFERENCE

↓

Calcolo del *Likelihood Ratio* (*LR*)

PROFILI COMPLETI e PARZIALI

range da **10^{20} a 10^{30}**

PROFILI MISTI

range da **10^{14} a 10^{27}**

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DISCUSSIONE

Quantità di DNA

Inferiori in Heets e Terea VS sigaretta tradizionale
dato statisticamente significativo

Riduzione **NON statisticamente significativa** tra T0 e T1 per Heets e Terea

Diverse modalità di consumo e riduzione salivazione

Composizione degli sticks di tabacco

LR > 10^6 per il 100 % dei campioni

Nessuna interferenza **sulla tipizzazione**

CONCLUSIONI

L'analisi del DNA profiling resiste alle nuove tecnologie del fumo confermandosi uno strumento utile a fini identificativi per ciò che riguarda il *sub-source level.*

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

XXIX Congresso Nazionale
Messina, 9-11 Novembre 2023

Predizione dell'età biologica da cadavere carbonizzato: applicazione di un modello di previsione mediante analisi di metilazione del DNA

Bertoglio B, Grignani P, Onofri M, Carnevali E, Ricci U, Fattorini P, Previderè C

Barbara Bertoglio

Laboratorio di Genetica Forense
Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense
Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy

UNIVERSITÀ DI PAVIA

In ambito forense,

la stima dell'età biologica è uno dei quesiti principali nella definizione del profilo biologico.

	PREADOLESCENTE
	ADOLESCENTE
	ADULTO SOTTO I 20 ANNI
	ADULTO SOTTO I 30 ANNI
	ADULTO SOTTO I 40 ANNI
	ADULTO SOTTO I 50 ANNI
	ADULTO SOTTO I 60 ANNI
	ADULTO SOTTO I 70 ANNI
	ADULTO SOTTO GLI 80 ANNI
	ADULTO SOTTO I 90 ANNI

NTA		RANGE DI PESO (KG)	DA	A

		COLORE	

Ai metodi antropologici standard, si stanno considerando modelli di predizione sviluppati mediante studio dei livelli di metilazione del DNA

Forensic Science International 311 (2020) 110267

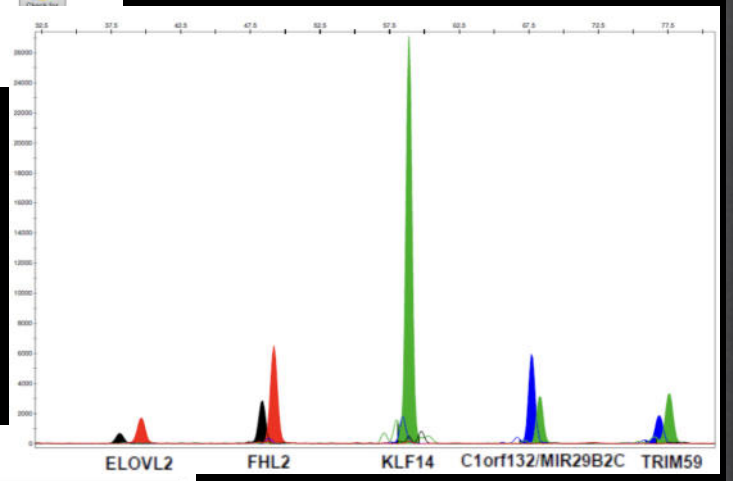
Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

DNA methylation age estimation in blood samples of living and deceased individuals using a multiplex SNaPshot assay

Helena Correia Dias[a,b,c], Cristina Cordeiro[c,d], Janet Pereira[e], Catarina Pinto[e], Francisco Corte Real[c,d], Eugénia Cunha[b,c], Licínio Manco[a,*]

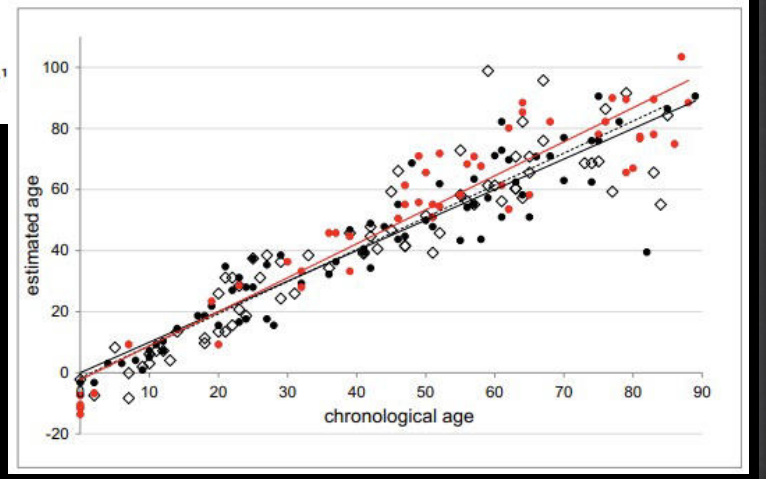


International Journal of Legal Medicine (2021) 135:167–173
https://doi.org/10.1007/s00414-020-02360-7

METHOD PAPER

Postmortem age estimation via DNA methylation analysis in buccal swabs from corpses in different stages of decomposition—a "proof of principle" study

Barbara Elisabeth Koop[1] · Felix Mayer[1] · Tanju Gündüz[1] · Jacqueline Blum[1] · Julia Becker[1] · Wolfgang Wagner[2] · Yang Han[2] · Petra Boehme[1] · Stefanie Ritz-Timme[1]



Piano sperimentale

1. Sviluppo modello di predizione dell'età

- Sangue periferico di 72 soggetti
- Età: 18-95 anni

Analisi pattern di metilazione di ELOVL-2, FHL-2, KLF-14, C1orf-132 e TRIM-59 (SNapShot)

Valutazioni statistiche (R Studio)

Piano sperimentale

1. Sviluppo modello di predizione dell'età

- Sangue periferico di 72 soggetti
- Età: 18-95 anni

Analisi pattern di metilazione di ELOVL-2, FHL-2, KLF-14, C1orf-132 e TRIM-59 (SNapShot)

Valutazioni statistiche (R Studio)

2. Analisi di campioni ematici da soggetti carbonizzati

- 27 soggetti deceduti ed esposti ad azione lesiva termica
- Età: 25-75 anni

Analisi pattern di metilazione di ELOVL-2, FHL-2, KLF-14, C1orf-132 e TRIM-59 (SNapShot)

Piano sperimentale

1. Sviluppo modello di predizione dell'età

- Sangue periferico di 72 soggetti
- Età: 18-95 anni

Analisi pattern di metilazione di ELOVL-2, FHL-2, KLF-14, C1orf-132 e TRIM-59 (SNapShot)

Valutazioni statistiche (R Studio)

2. Analisi di campioni ematici da soggetti carbonizzati

- 27 soggetti deceduti ed esposti ad azione lesiva termica
- Età: 25-75 anni

Analisi pattern di metilazione di ELOVL-2, FHL-2, KLF-14, C1orf-132 e TRIM-59 (SNapShot)

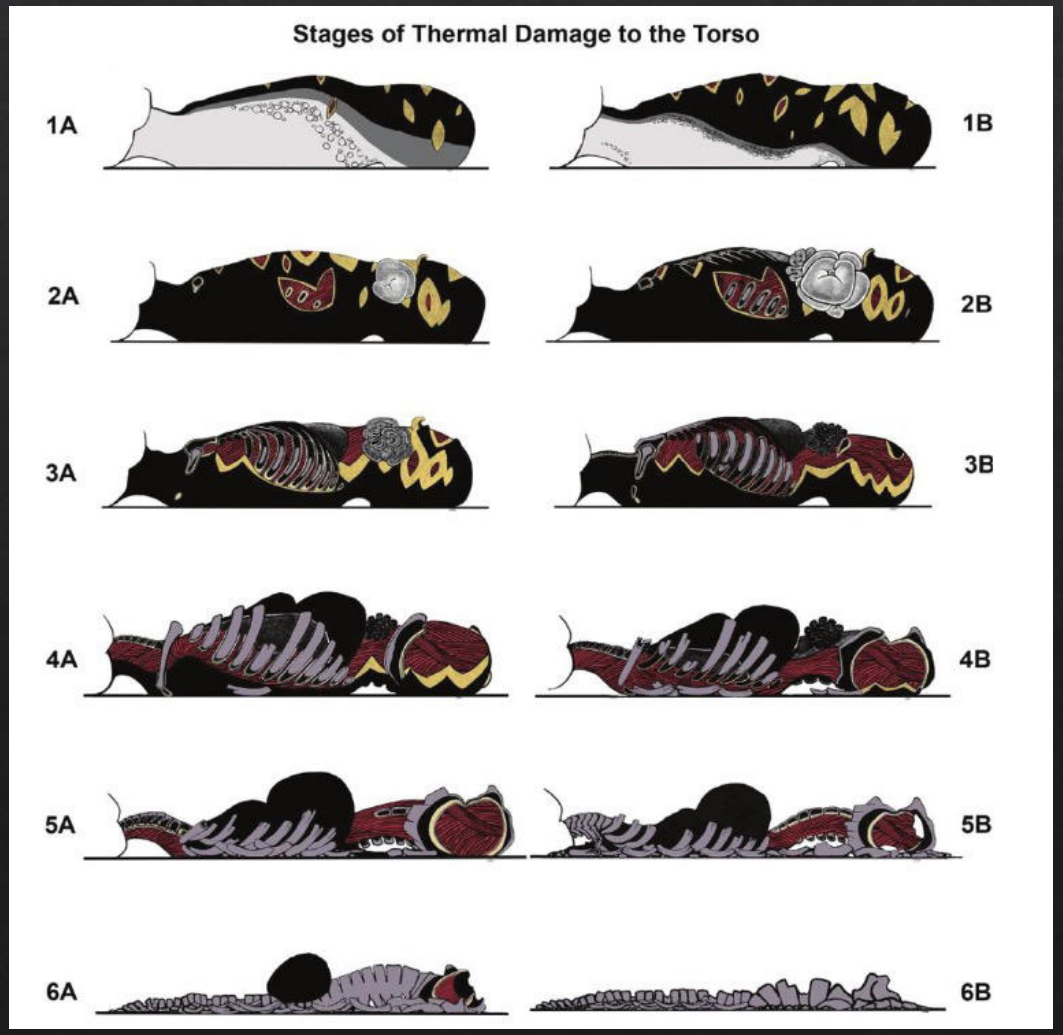
Valutazione di:

- stato di conservazione del corpo
- qualità del prelievo ematico
- quantità/qualità del materiale genetico

Glassman and Crow (1996)

1. Burns typical in a smoke death with epidermal blistering and hair singeing.
2. Recognizable body form, but with varying degrees of charring. Elements of the hands and feet may be lost along with the genitalia and ears.
3. Major portions of the arms and/or legs no longer present; the head, while present, cannot be used in visual identification.
4. Extensive burning with skull fragmentation, which may be absent from the body; portions of the arms and legs may be attached to the charred torso.
5. Cremated remains with little or no tissue present.

Pope et al. (2022)

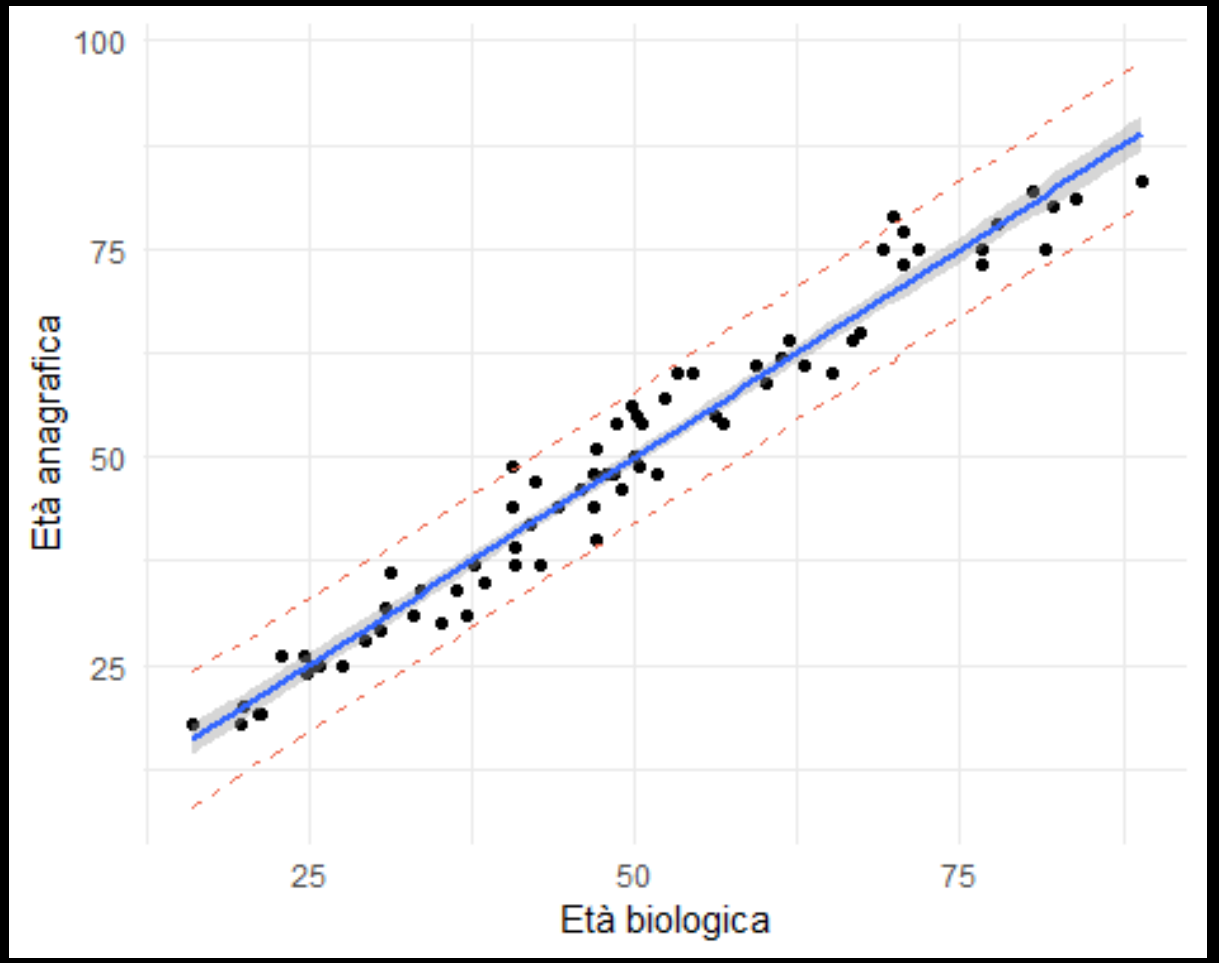


1. Modello di predizione dell'età biologica

Sviluppo del modello

Parameter	Coefficient	SE	95% CI	t(65)	p
(Intercept)	18.22	5.69	(6.86, 29.58)	3.20	0.002
ELOVL	63.03	12.23	(38.60, 87.45)	5.15	< .001
FHL	27.20	12.65	(1.93, 52.48)	2.15	0.035
C1orf	-26.90	4.60	(-36.10, -17.71)	-5.84	< .001
KLF	139.81	29.98	(79.93, 199.69)	4.66	< .001
TRIM	40.72	14.31	(12.15, 69.29)	2.85	0.006

Model: Eta ~ ELOVL + FHL + C1orf + KLF + TRIM (71 Observations)
Residual standard deviation: 3.835 (df = 65)
R2: 0.960; adjusted R2: 0.957

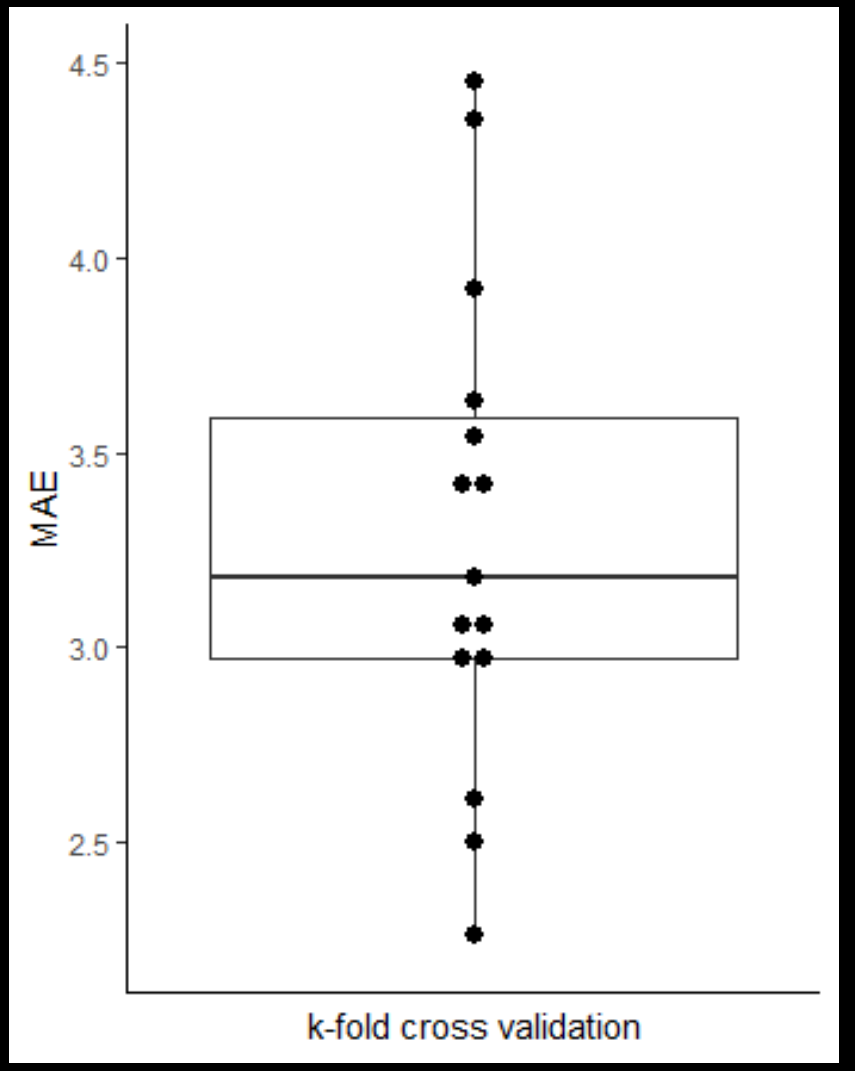


1. Modello di predizione dell'età biologica

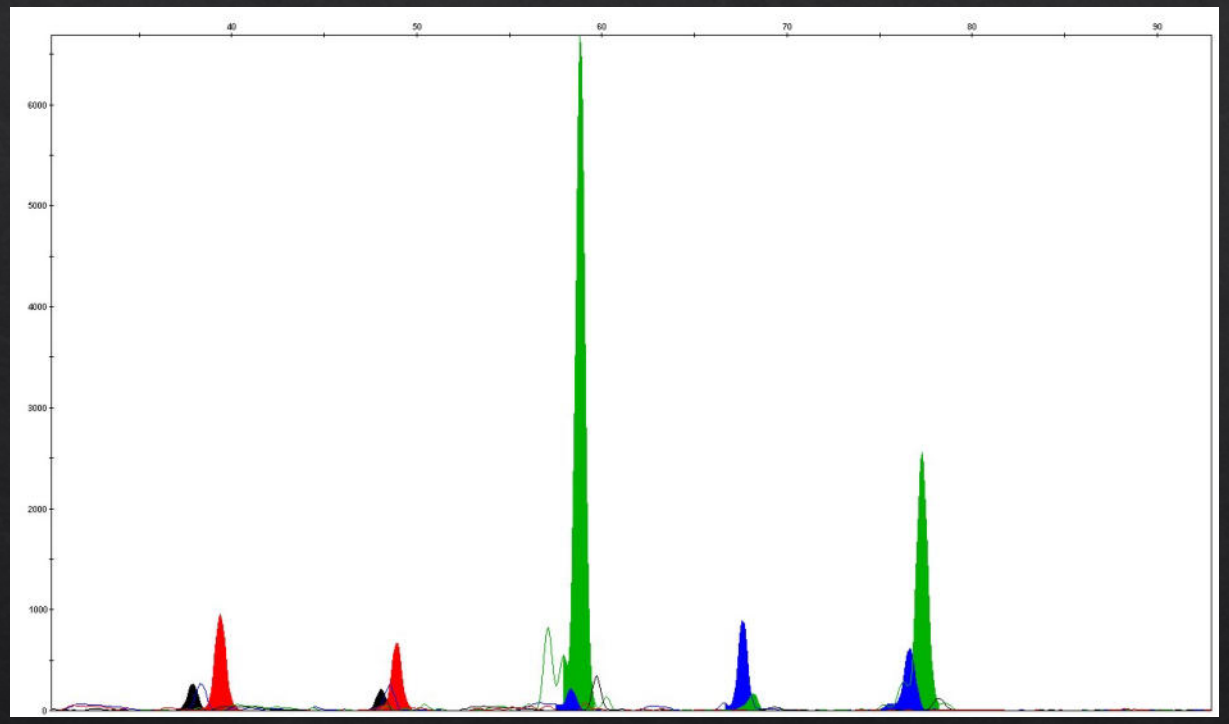
Sviluppo del modello

Repeated k-fold cross validation

	Modello	K-fold cross validation
R-squared	0.9605	0.9551
RMSE	3.6690	4.1202
MAE	2.9334	3.2905

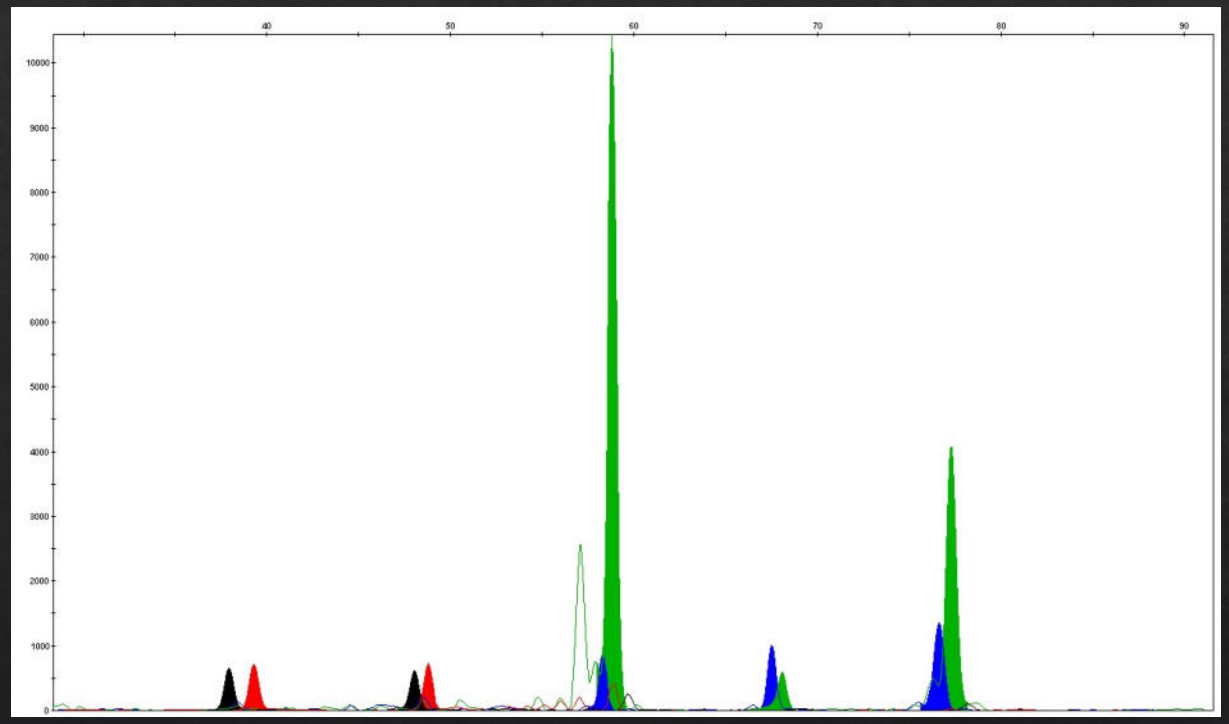


2. Analisi di campioni ematici da cadaveri carbonizzati



Campione 1
Età: 26 anni

Grado di carbonizzazione: 2 (Glassman and Crow)
1A (Pope et al.)

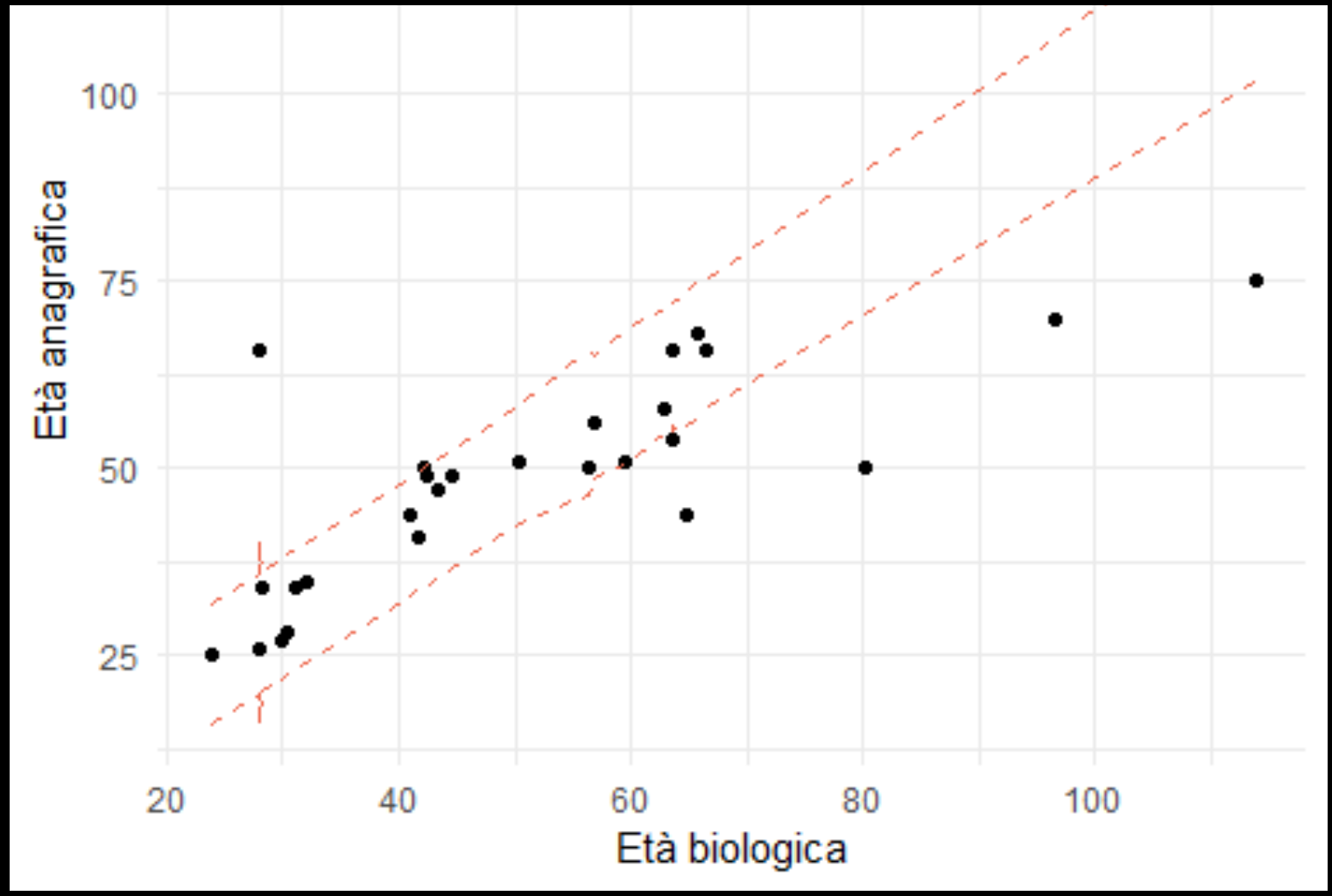


Campione 4
Età: 66 anni

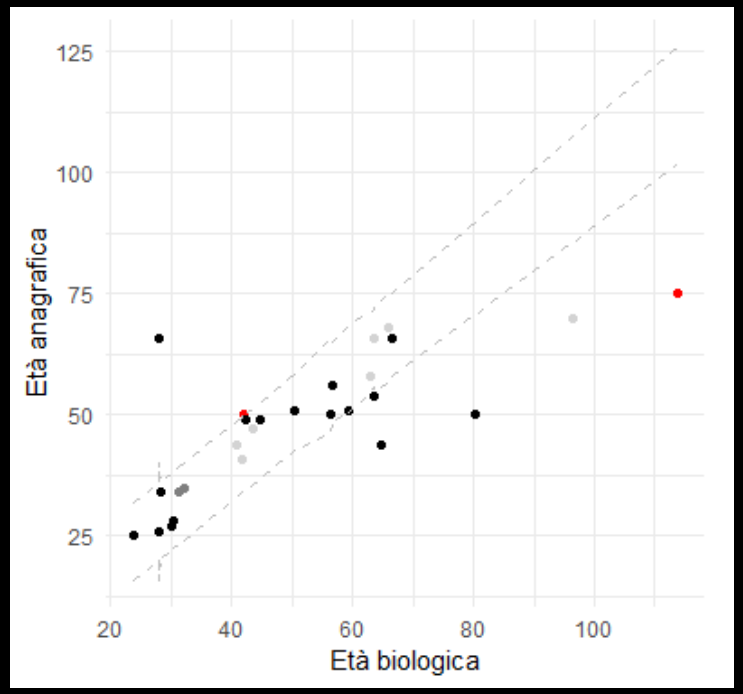
Grado di carbonizzazione: 3 (Glassman and Crow)
3A (Pope et al.)

Predizione corretta in 78% dei casi

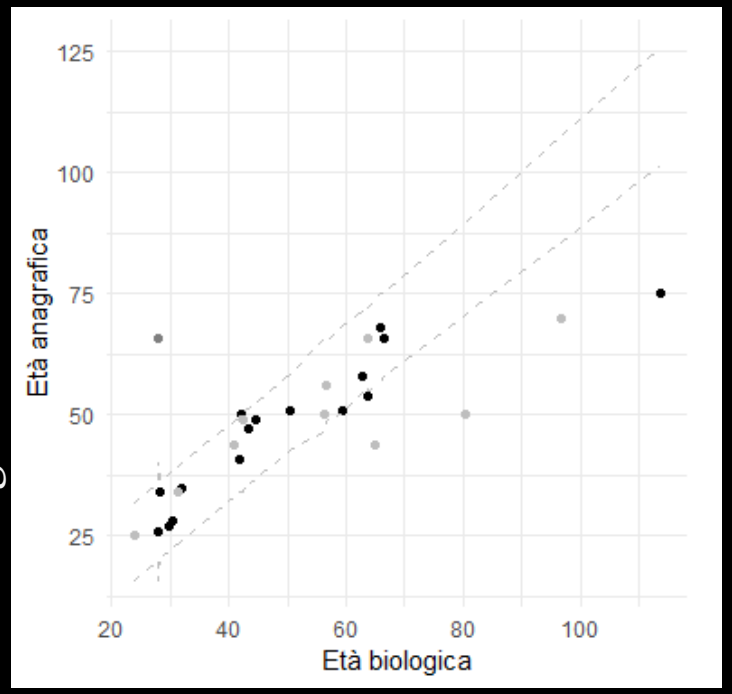
(MAE=3.4 anni)



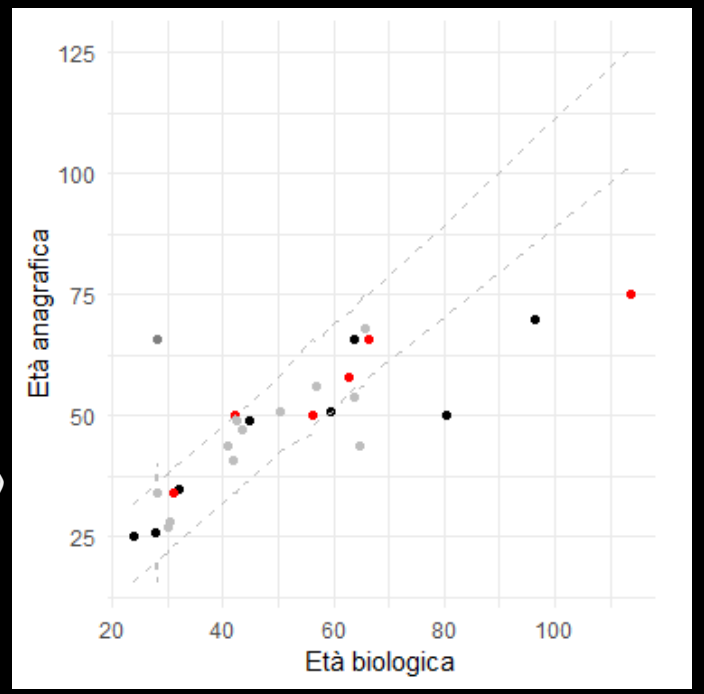
Prelievo ematico



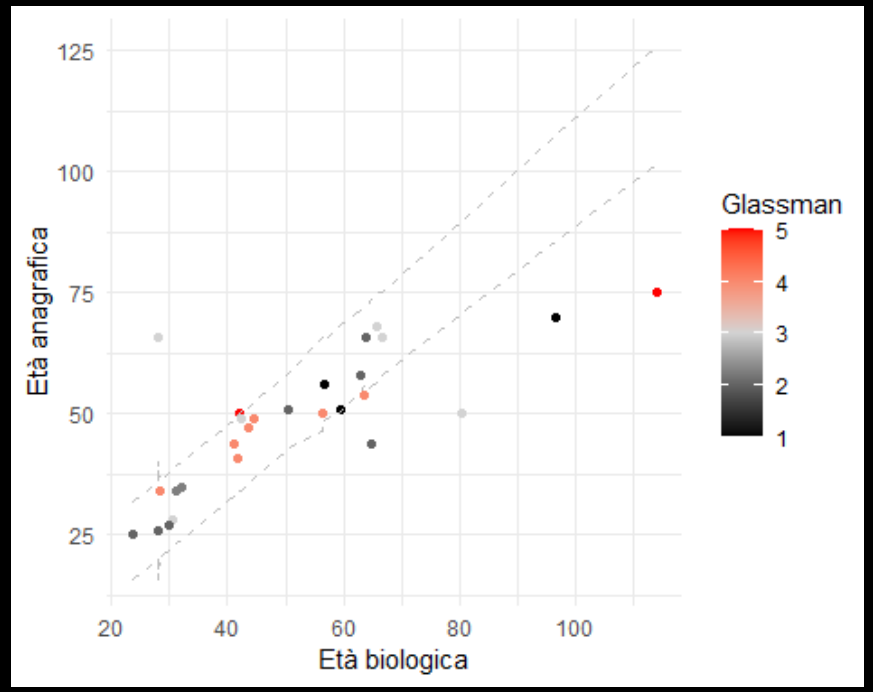
Degradation index



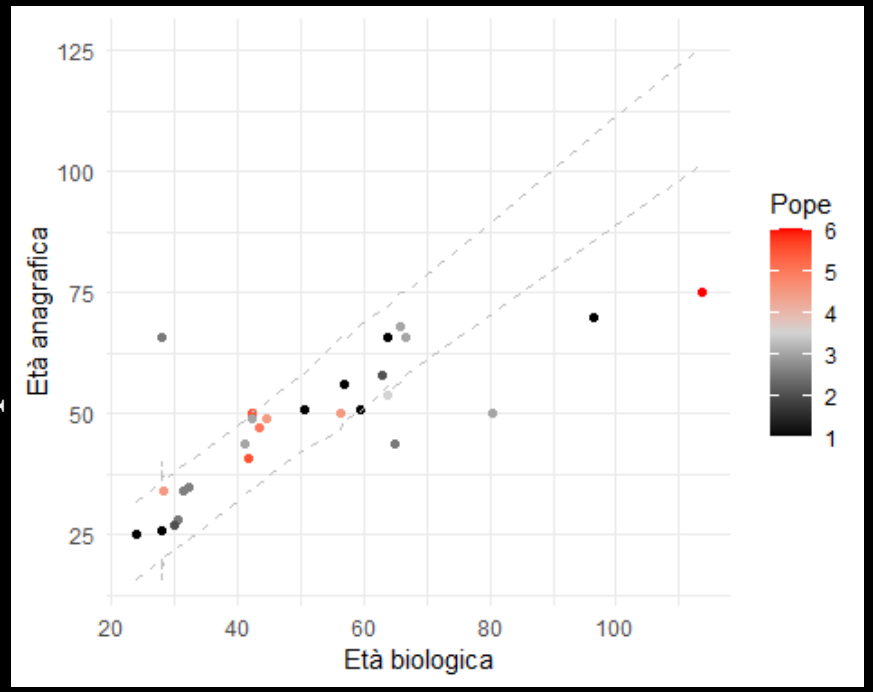
Quantità DNA



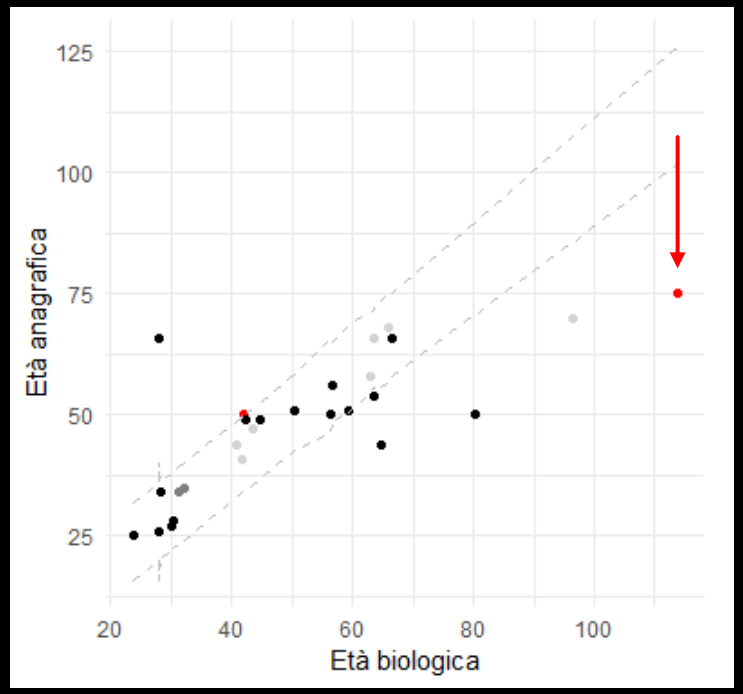
Glassman and Crow



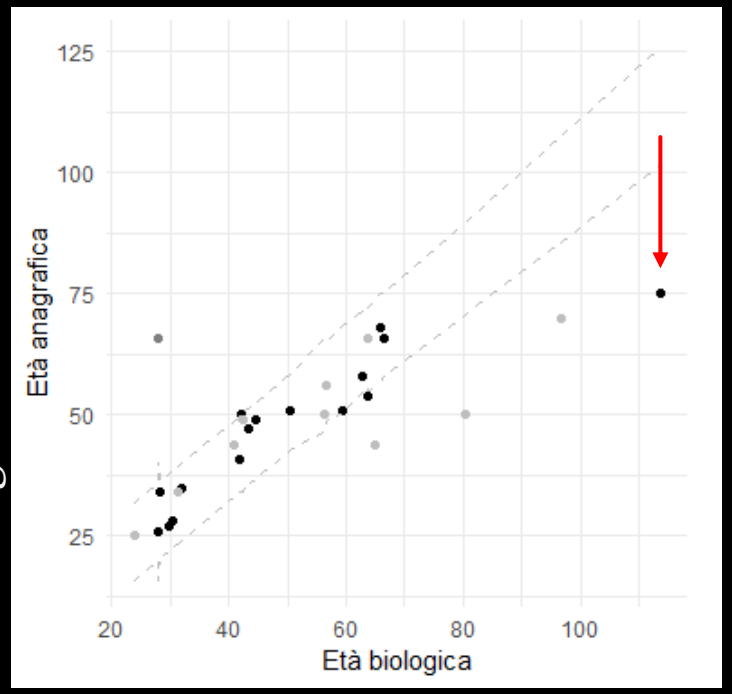
Pope et al.



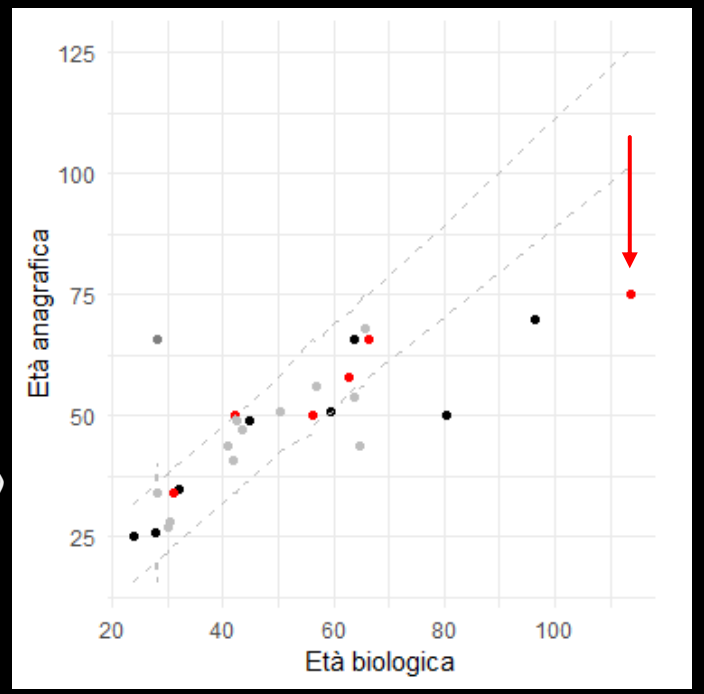
Prelievo ematico



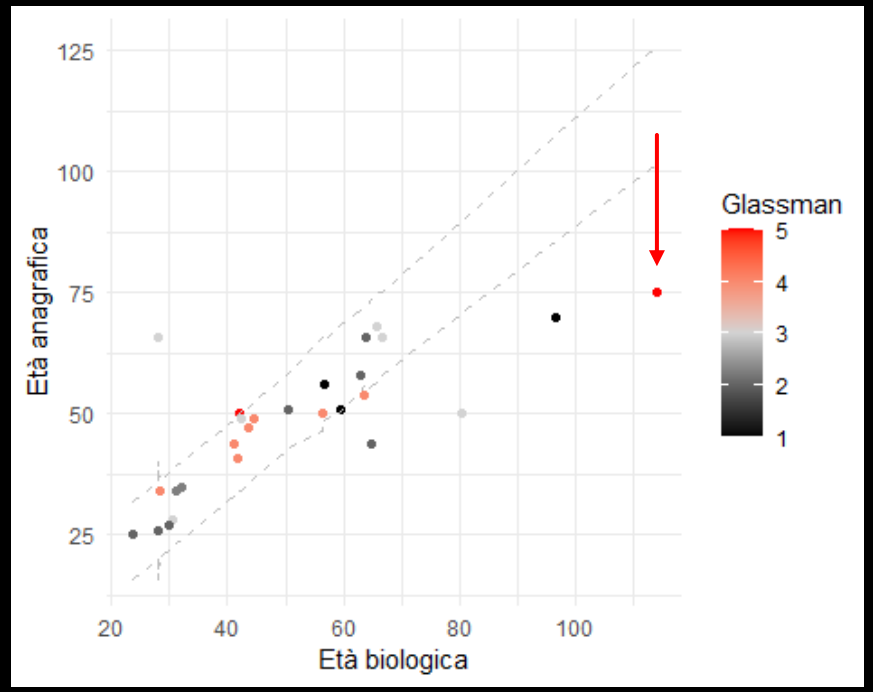
Degradation index



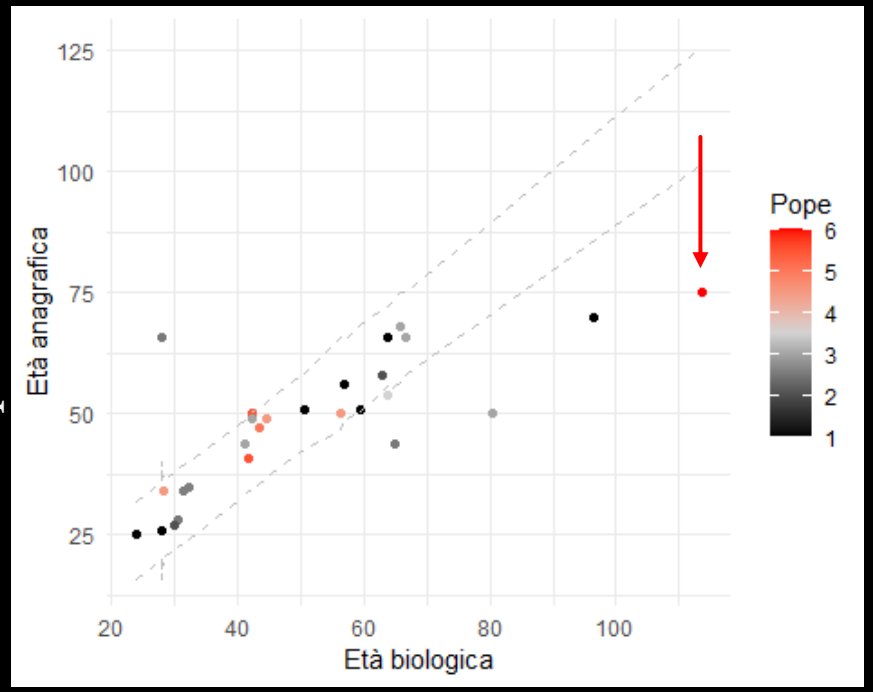
Quantità DNA



Glassman and Crow



Pope et al.



Conclusioni

- Possibilità di ottenere dati molecolari utili per la predizione dell'età biologica da un campione di cadaveri carbonizzati

- Applicabilità del modello sviluppato anche in condizioni post-mortali compromesse

In futuro:

ampliare il campione in analisi per standardizzare la metodica e approfondire l'influenza delle variabili considerate

Grazie per l’attenzione

XXIX Congresso Nazionale Ge.F.I. – Messina, 9-11 novembre 2023

Valutazione dell'intra-locus allele e "iso-allele" balance ai marcatori Y-STRs in multi-copy DYS385 a/b e DYF387S1 a/b

Chiara Saccardo
Stefania Turrina, Francesco Ausania, Domenico De Leo

Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale
Laboratorio di Genetica Forense, Università degli Studi di Verona, Verona

Materiali e Metodi

Validazione MPS: comparazione dati MPS con CE

Tipizzazione di **152** soggetti maschi del Nord-Est Italia

MPS

- 1 kit di amplificazione:
  - **ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit** (FSSP):
    DNA Primer Mix A (DPMA)
    24 Y-STRs: DYS385 a/b, DYF387S1 a/b

- **MiSeq FGx™ Forensic Genomics System:**
  - Universal Analysis Software (**UAS**)

    ***STR allele identification tool (**STRait Razor**)

CE

- 2 kits di amplificazione:
  - **PowerPlex® Y23 System** (PP23Y):
    22 Y-STRs: DYS385 a/b
  - **Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit** (YFP):
    25 Y-STRs: DYS385 a/b, DYF387S1 a/b

- **SeqStudio™ Genetic Analyzer for HID:**
  - GeneMapper ID-X v1.6

Valutazione **intra-locus allele** e **"iso-allele" balance** ai marcatori Y-STRs in multi-copy
DYS385 a/b e **DYF387S1 a/b**
MPS: calcolo **allele coverage ratio** (ACR) percentuale, **imbalance < 60%**
CE: calcolo **peak height ratio** (PHR) percentuale, **imbalance < 65%**

Risultati

Y-STR multi-copy locus	DYS385 a/b		DYF387S1 a/b	
Tecnica	**MPS**	**CE**	**MPS**	**CE**
Eterozigoti	130		112	
Omozigoti	22		40	
Iso-alleli	-	-	24 in soggetti omozigoti 1 in soggetto eterozigote	-
Intra-locus allele imbalance	16 con ACR di 52-59% 1 con ACR di 46% 2 con ACR di 11% e 17%	1 con PHR di 64% 1 con PHR di 45% -	3 con ACR di 54-55% 1 con ACR di 57% 1 con ACR di 35%	- 1 con PHR di 61% 1 con PHR di 35%
Intra-locus iso-allele imbalance	-	-	3 con ACR di 48%, 49% e 58%	-
Intra-locus allele/iso-allele imbalance	-	-	1 con ACR di 52%	-

DYS385 a/b: 2 imbalances in MPS con ACR di 11% e 17%

MPS - FSSP

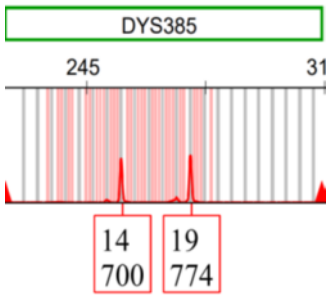
- in MPS imbalance **11%:**
  - **FALSA OMOZIGOSI** (14, 14)

- in MPS imbalance **17%:**
  - **ETEROZIGOSI** (12, 17)

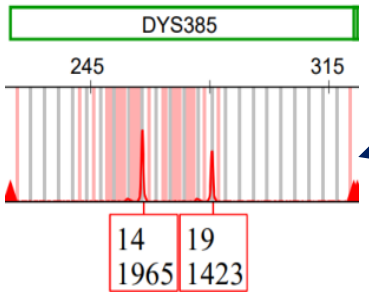
MPS - FSSP

- in CE (PP23Y/YFP) **balance**:
  - **ETEROZIGOSI**

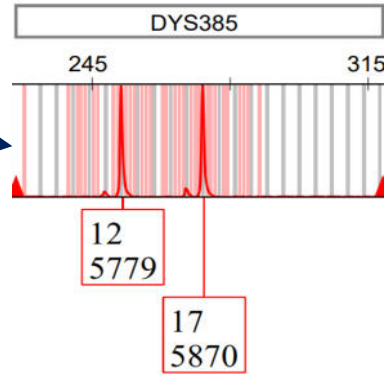
CE - PP23Y



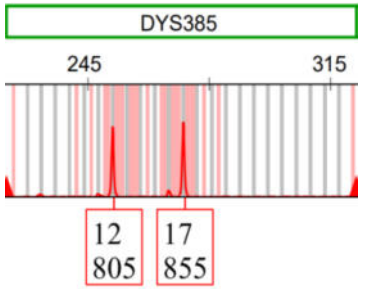
CE - YFP



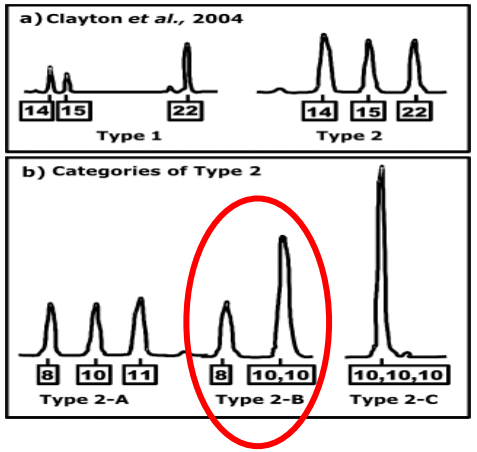
CE – PP23Y



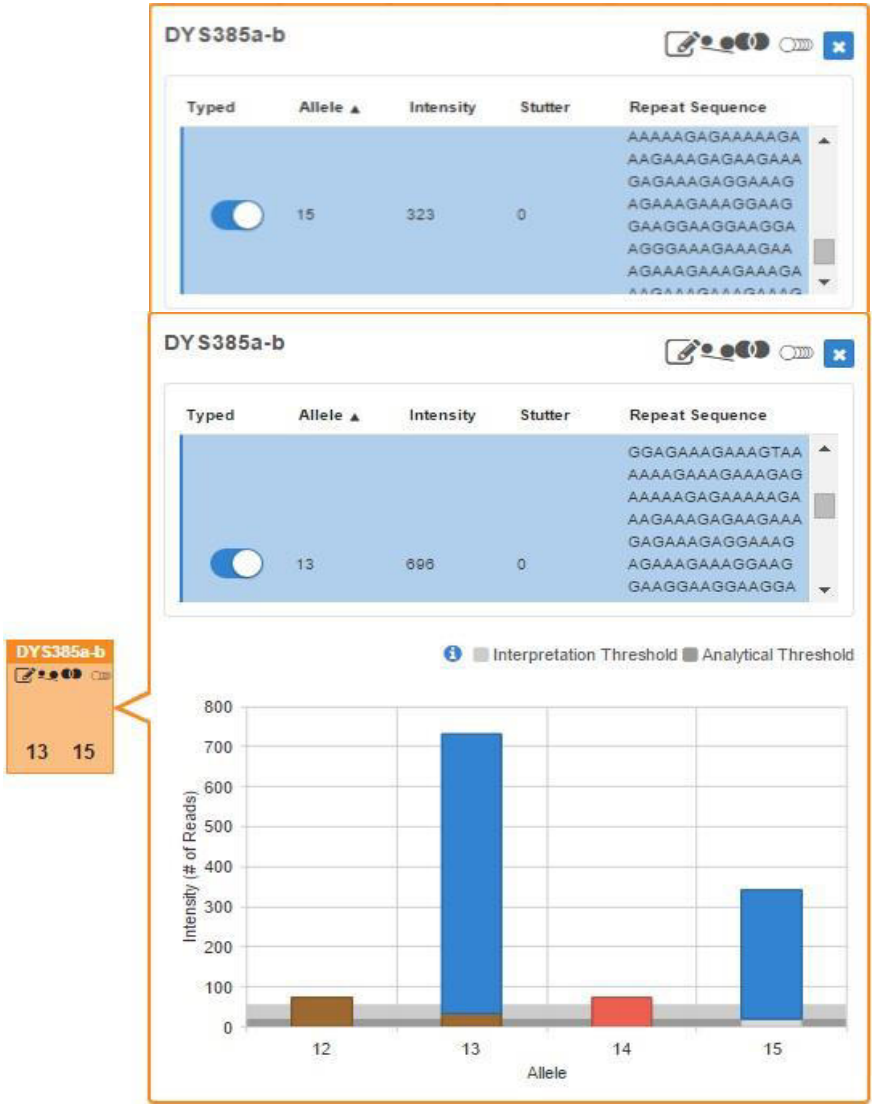
CE - YFP



DYS385 a/b: imbalance 45- 46% in MPS e CE



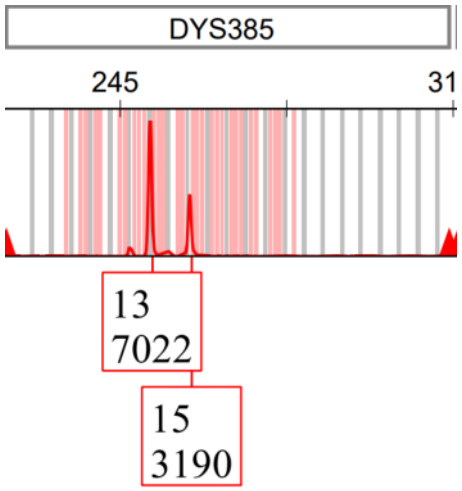
MPS - FSSP



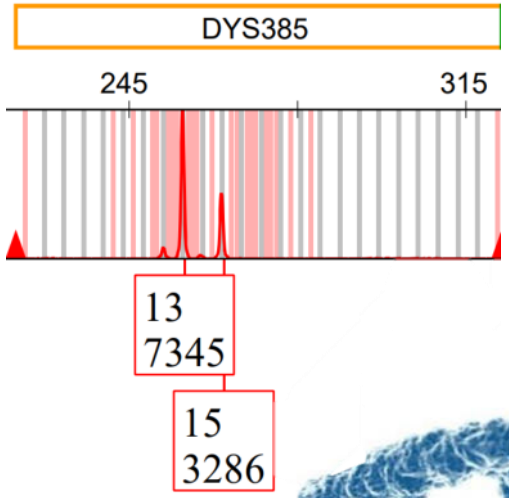
Pattern **TRI-allelico** (13, 13, 15) di **tipo 2-B**:

- allele 13 duplicato in reads/RFU rispetto all'allele 15
- non descritto in letteratura per il DYS385 a/b

CE - PP23Y

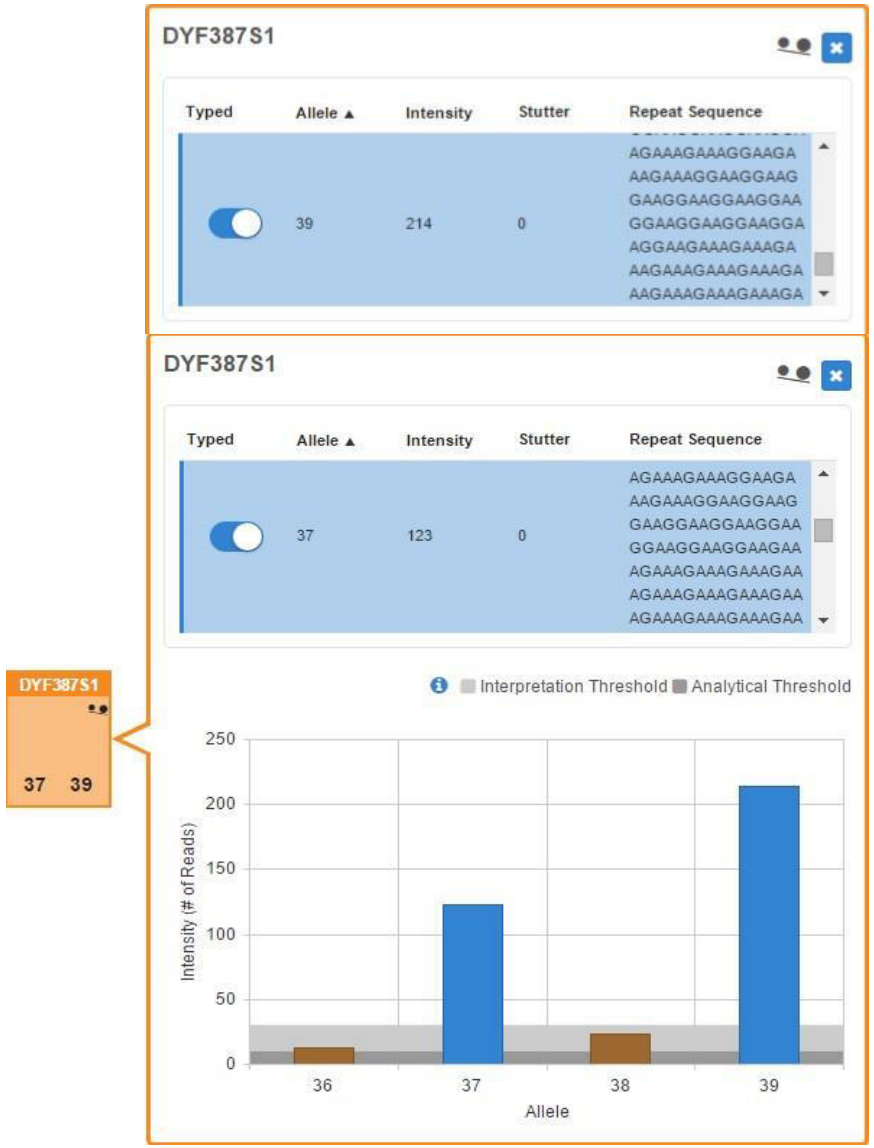


CE - YFP



DYF387S1 a/b: intra-locus allele imbalance in MPS e CE

MPS - FSSP

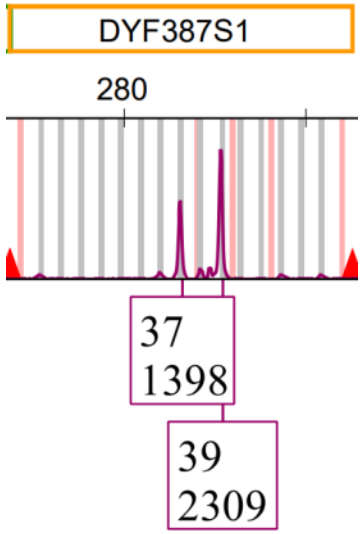


Imbalance in MPS e CE con ACR e PHR di **57%** e **61%**

Ipotesi di pattern **TRI-allelico** (37, 39, 39) di **tipo 2-B**:

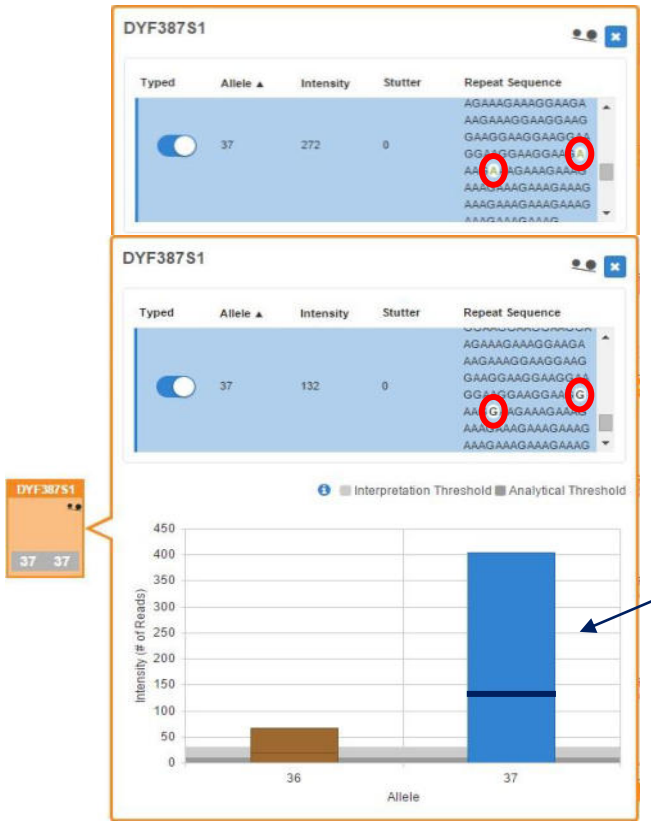
- allele 39 con reads/RFU quasi doppie rispetto all'allele 37

CE – YFP



DYF387S1 a/b: intra-locus "iso-allele" imbalance in MPS

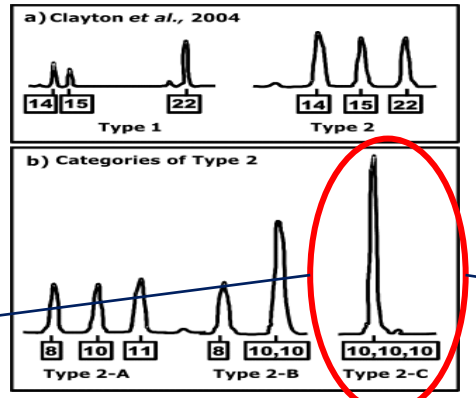
MPS - FSSP



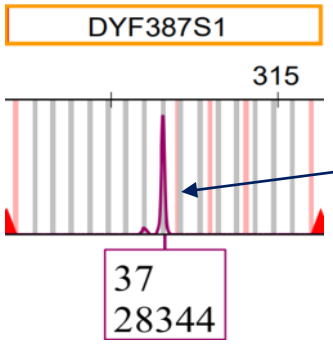
- 2 intra-locus iso-allele imbalances con ACR di **49%** e **58%:**
  - pattern **TRI-ISO-allelico** in MPS

MPS - FSSP

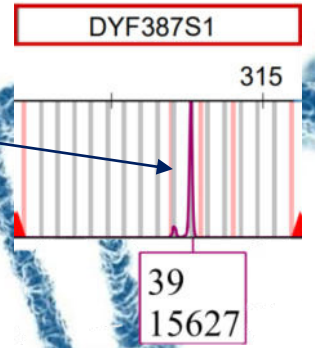
- Pattern **TRI-allelico** di **tipo 2-C** in CE



CE – YFP

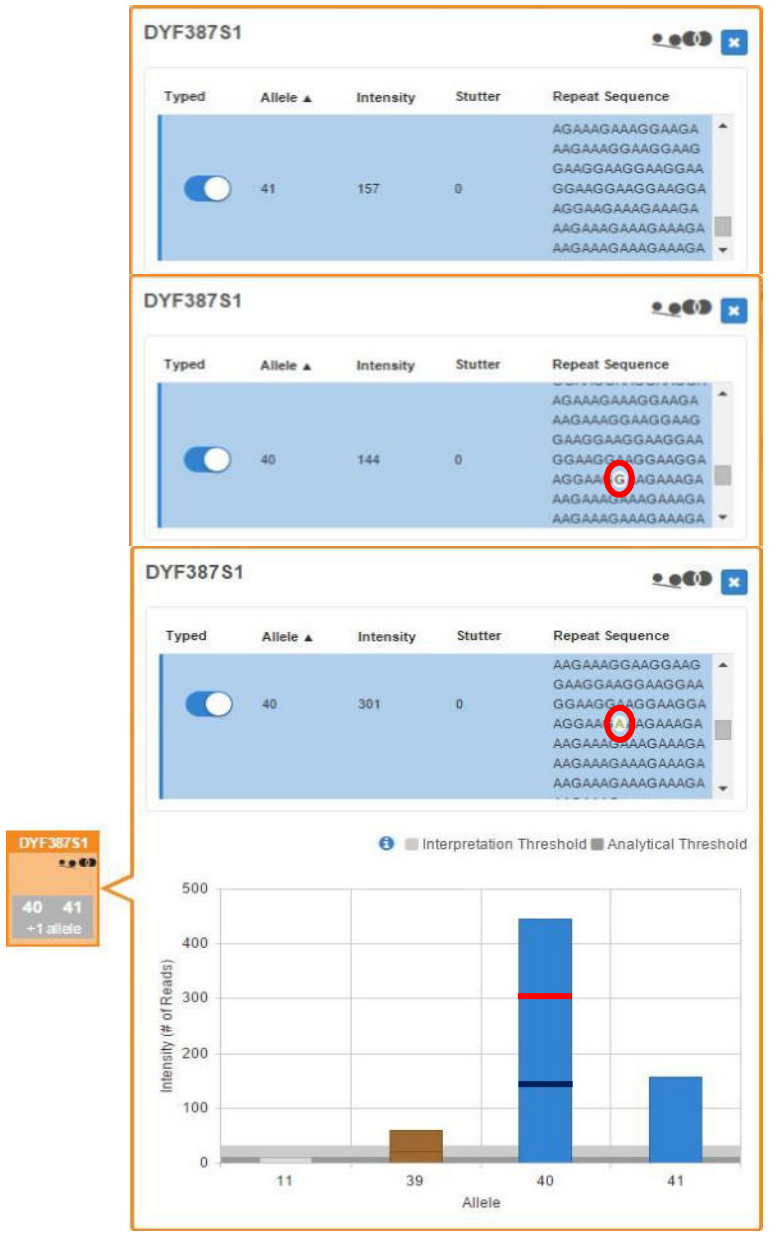


CE – YFP



DYF387S1 a/b: intra-locus allele, "iso-allele" e "allele/iso-allele" imbalance in un pattern TETRA-allelico

MPS - FSSP



- **in MPS e CE**

Allele imbalance:

- valori di ACR e PHR (40, 41) di **35%**

- **in MPS**

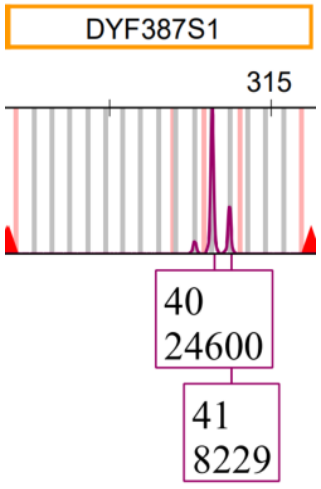
Iso-allele imbalance:

- allele 40 con due diverse sequenze iso-metriche (40-G, 40-A)
- iso-allele 40-A con reads doppie rispetto all'iso-allele 40-G, ACR di **48%**

Allele/iso-allele imbalance:

- iso-allele 40-A con reads doppie rispetto all'allele 41, ACR di **52%**

CE – YFP

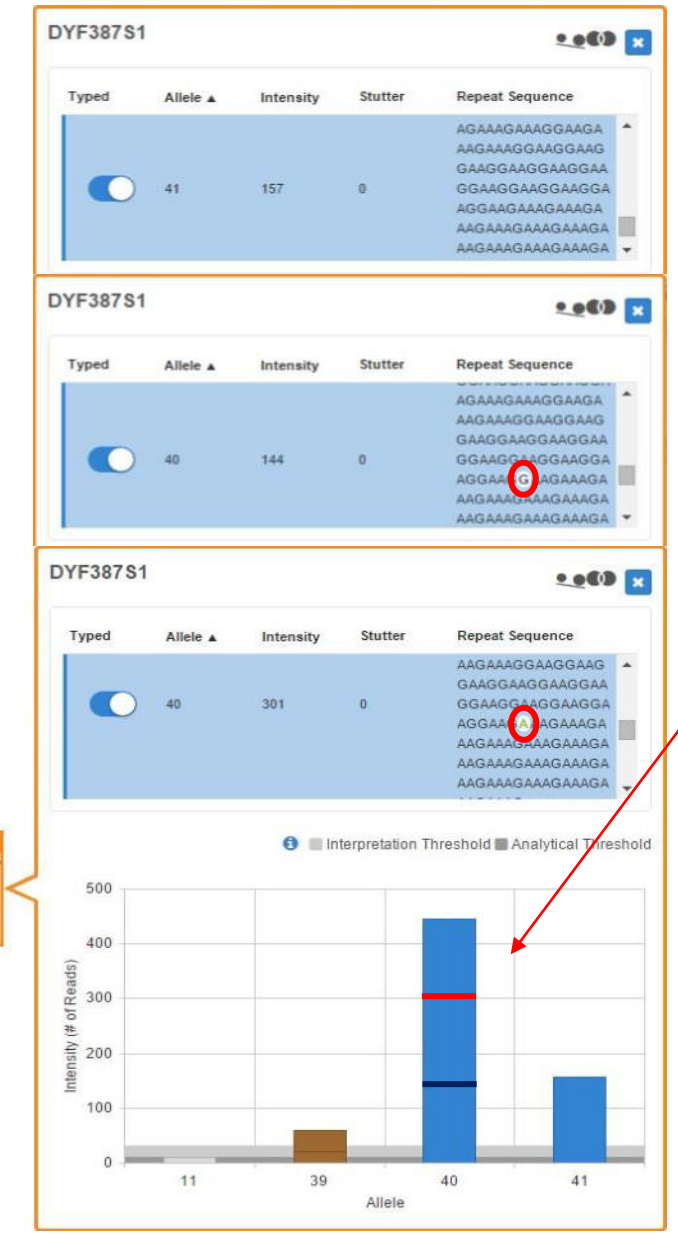


Pattern TETRA-allelico: 40-G, 40-A, 40-A, 41

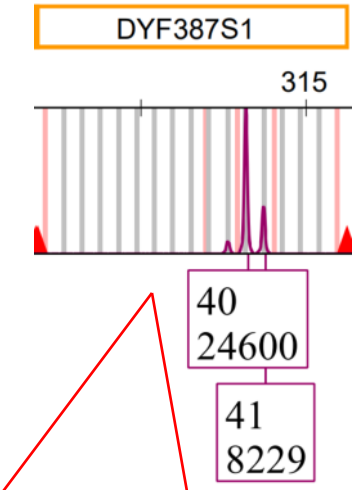
Chiara Saccardo

➢ In CE pattern **TRI-ALLELICO**
di **tipo 2-B**

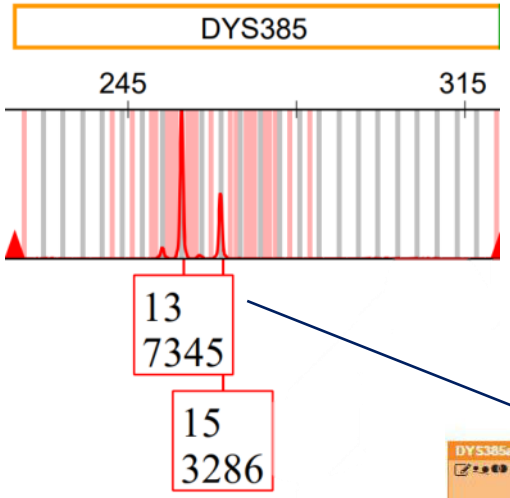
MPS - FSSP



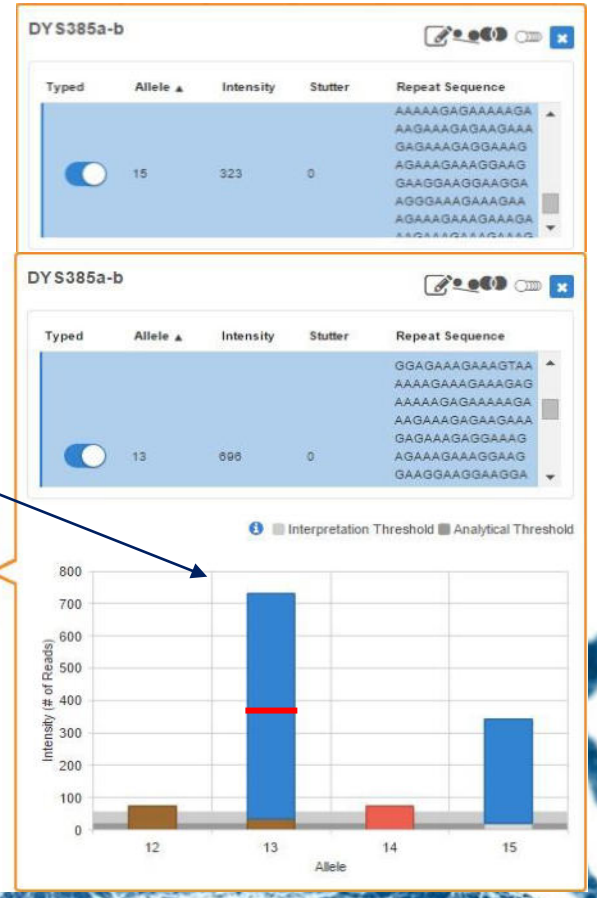
PHR = 35%
CE – YFP



PHR = 45%
CE – YFP



MPS - FSSP



➢ In MPS pattern **TETRA-ALLELICO**
per presenza di **iso-alleli**

Chiara Saccardo

Grazie per l'Attenzione

IDENTIFICAZIONE DI RESTI OSSEI RINVENUTI IN UNA FOSSA COMUNE DELLA SECONDA GUERRA MONDIALE

UNIVERSITÀ DI PAVIA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Di Stefano Barbara[1], Bertoglio Barbara[2], Concato Monica[1], Previderè Carlo[2], Fattorini Paolo[1]

[1] Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e della Salute, Università di Trieste;

[2] Dipartimento di Medicina Pubblica, Sperimentale e Forense, Sezione di Medicina Legale e Scienze Forensi, Università di Pavia

Fonti storiche

21 Aprile 1945

27 soldati italiani furono catturati, torturati e uccisi.
I loro corpi, privati di uniformi e indumenti, furono sepolti in fosse comuni.

2019

Esumazione dei resti scheletrici da una fossa comune (Isola di Cres, Croazia).

Fattori cruciali per la tipizzazione del DNA da elementi scheletrici

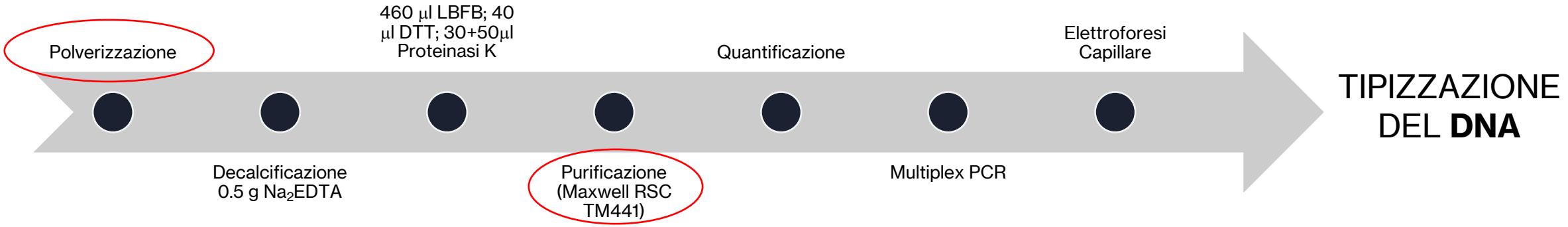
Messa a punto del **protocollo di estrazione**

Identificazione dell'**elemento scheletrico** più performante

MESSA A PUNTO DEL **PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE**

Automatizzazione del processo di purificazione del DNA

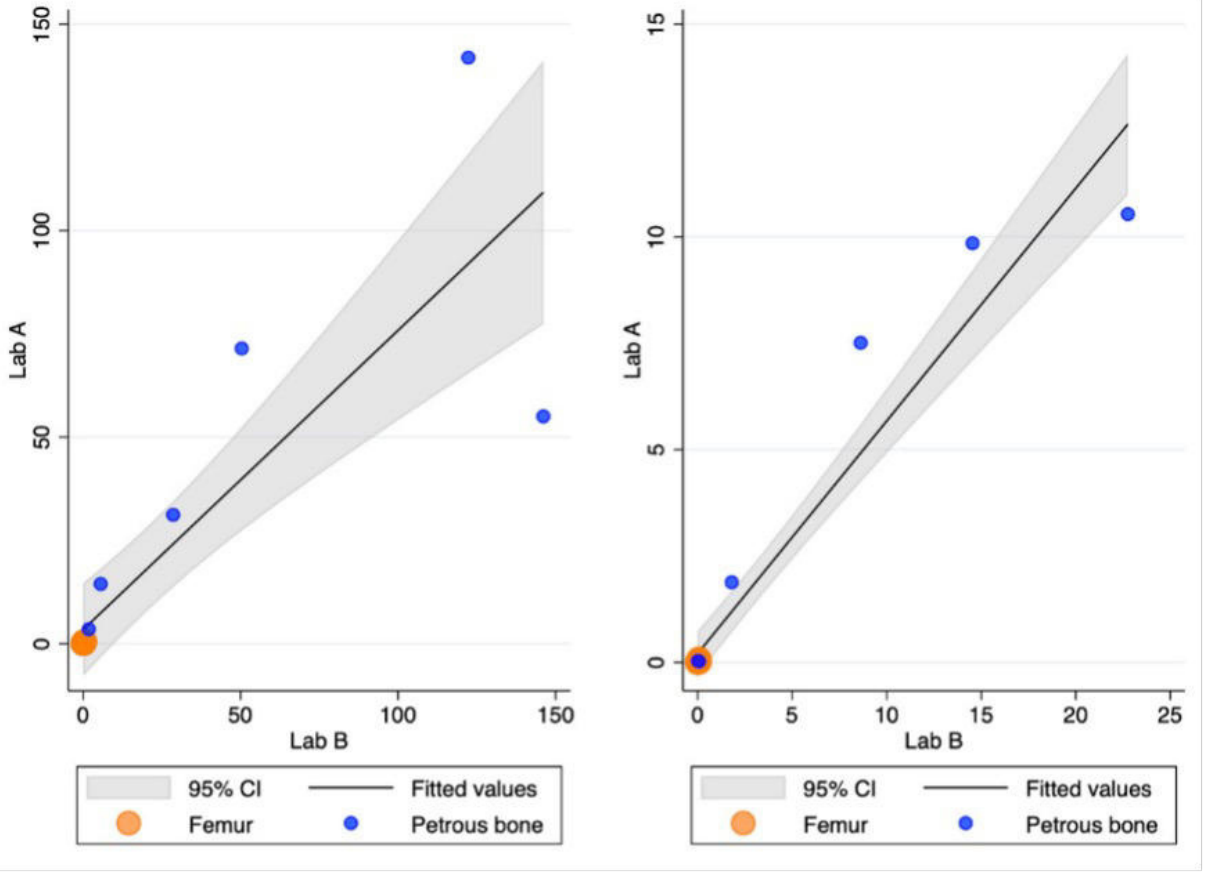
- Maxwell® FSC DNA IQ™ Casework Kit (Promega)

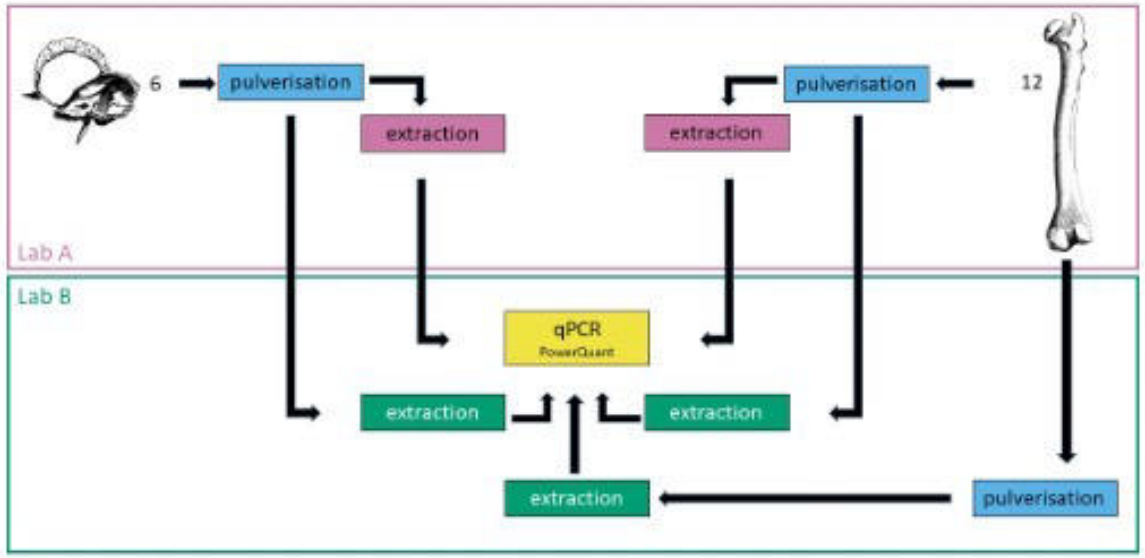


Polverizzazione dell'osso

Pajnič, I.Z. Extraction of DNA from Human Skeletal Material. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 2016, 1420, 89–108, doi:10.1007/978-1-4939-3597-0_7.

VALIDAZIONE DEL **PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE**





Lab A vs Lab B	
Auto probe	p-value= 0.709; r^2=0.833
Deg probe	p-value= 0.176; r^2= 0.824
[Auto/Deg]	p-value= 0.548; r^2=0.919
IPC probe	p-value= 0.754

Pajnič, I.Z. Extraction of DNA from Human Skeletal Material. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 2016, 1420, 89–108, doi:10.1007/978-1-4939-3597-0_7.

IDENTIFICAZIONE DELL' **ELEMENTO SCHELETRICO** PIU' PERFORMANTE

2019:

Esumazione di resti scheletrici da una fossa comune risalente alla Seconda Guerra Mondiale (Isola di Cres, Croazia)

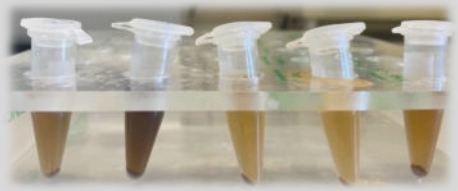
2022:

Analisi antropometriche:

- n° soggetti > 27 (32?)
- Resti commisti

2022/2023:
Indagini genetiche:

- 12 femori di sinistra
- 29 femori di destra
- 19 rocche petrose
- 12 metacarpi
- 16 elementi dentari

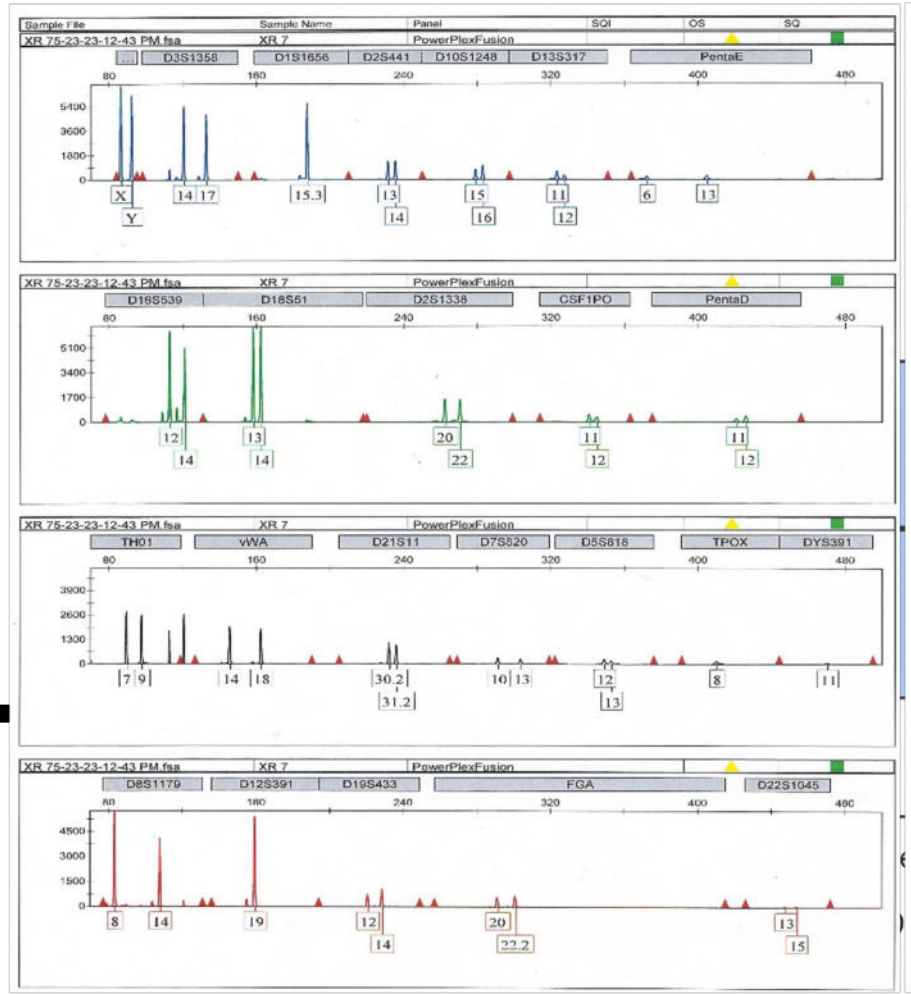


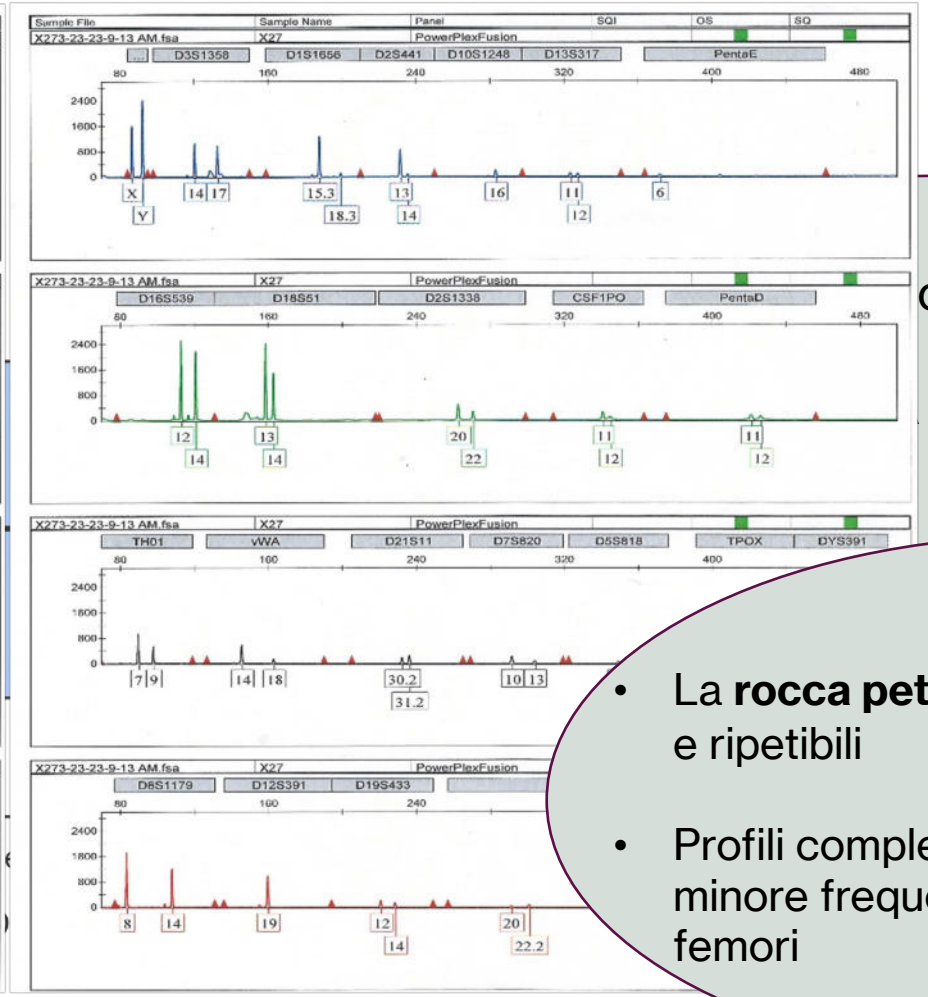
IDENTIFICAZIONE DELL' **ELEMENTO SCHELETRICO** PIU' PERFORMANTE

	Elemento osseo	n	>LOD	>ILOQ	pg/µl
	Femori sinistra	12	25.0 %	0 %	1.2±2.3
	Femori destra	29	21.7 %	3.4 %	5.9±16.8
	Rocca petrosa	19	100 %	100 %	440±343
	Metacarpi	12	54.2 %	0 %	5.0±7.2
	Denti	16	15.6 %	0 %	1.0±2.2

Kit Quantifiler (LOD: 0,001 ng/µL; ILOQ: 0,023 ng/µL)

IDENTIFICAZIONE DELL' **ELEMENTO SCHELETRICO** PIU' PERFORMANTE





ornisce rese più elevate

sono rilevabili anche in

- La **rocca petrosa** fornisce profili completi e ripetibili
- Profili completi sono stati ottenuti (con minore frequenza) anche da metacarpi e femori

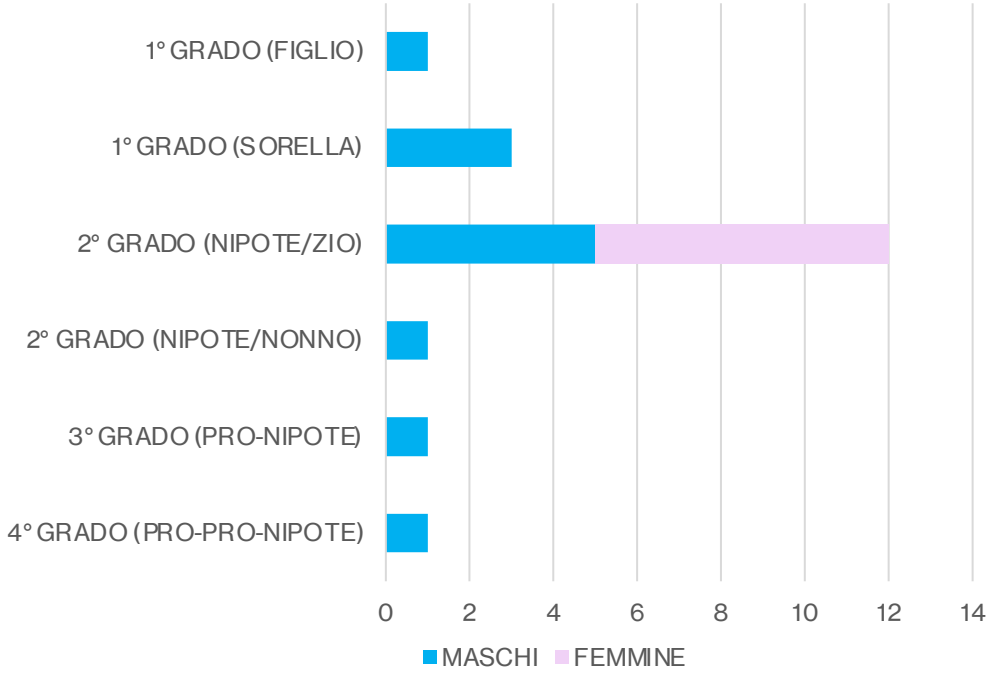
IDENTIFICAZIONE DELL' **ELEMENTO SCHELETRICO** PIU' PERFORMANTE

	Elemento osseo	n	>LOD	>ILOQ	pg/µl	STR typing	markers	S. F.
	Femori sinistra	12	25.0 %	0 %	1.2±2.3	2/7 (0)	18	8.3 %
	Femori destra	29	21.7 %	3.4 %	5.9±16.8	10/16 (1)	20	13.9 %
	Rocca petrosa	19	100 %	100 %	440±343	38/38 (32)	16	1.9 %
	Metacarpi	12	54.2 %	0 %	5.0±7.2	8/12 (5)	18	2.3 %
	Denti	16	15.6 %	0 %	1.0±2.2	1/5 (1)	-	n.a.

IDENTIFICAZIONE PERSONALE DI RESTI SCHELETRICI RISALENTI ALLA SECONDA GUERRA MONDIALE

Campioni di riferimento ***Ante-mortem*** (n=21):

- 19 consanguinei di 14 soldati (di cui 8 per via paterna);
- 2 madri di consanguinei.



- POWERPLEX FUSION (22 markers autosomici);
- POWERPLEX Y23 (22 markers Y-STRs).

			Probabilità a posteriori	Likelihood ratio STRs auto
1° GRADO	1	Padre/figlio	>99.99%	1.12E+08
	2	Fratello/sorella	>99.99%	1.97E+07
	3	Fratello/sorella	99.99%	4.17E+05
	4	Fratello/sorella	99.61%	3.06E+03
2° GRADO	5	Zio/Nipote 1 Zio/Nipote 2 Madre (1 e 2) Zio/Nipote 3	99.94%	2.26E+04
	6	Zio/Nipote Zio/Nipote	93.18%	1.66E+02
	7	Nonno/Nipote	76.97%	6.77E+01
2° GRADO	8	Zio/Nipote	<35.00%	2.0
	9	Zio/Nipote	<35.00%	2.51E+01
3° GRADO	10	Prozio/Pronipote	<35.00%	0.521

CONCLUSIONI

Il **PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE** è efficiente e ripetibile.

La **ROCCA PETROSA** è l'elemento scheletrico che fornisce le migliori rese dal punto di vista quantitativo e qualitativo;

I risultati ottenuti confermano il ruolo promettente dei **metacarpi** (54.2% dei campioni > LOD)

CRITICITA'!

- **Commistione e frammentazione** dei reperti (ruolo dell'antropologo forense e/o medico legale nelle operazioni di riesumazione).

IDENTIFICAZIONE PERSONALE dei resti scheletrici rinvenuti nella fossa comune:

PUNTI DI FORZA:

- Disponibilità di un **elenco** di soldati italiani/dati storici;
- Disponibilità di **campioni di riferimento** AM;
- Esito delle **indagini antropometriche.**

CRITICITA'!

- Elevato **numero** di soggetti da identificare;
- **Degradazione** del DNA;
- **Grado di parentela** (e limiti PCR-STRs CE).

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

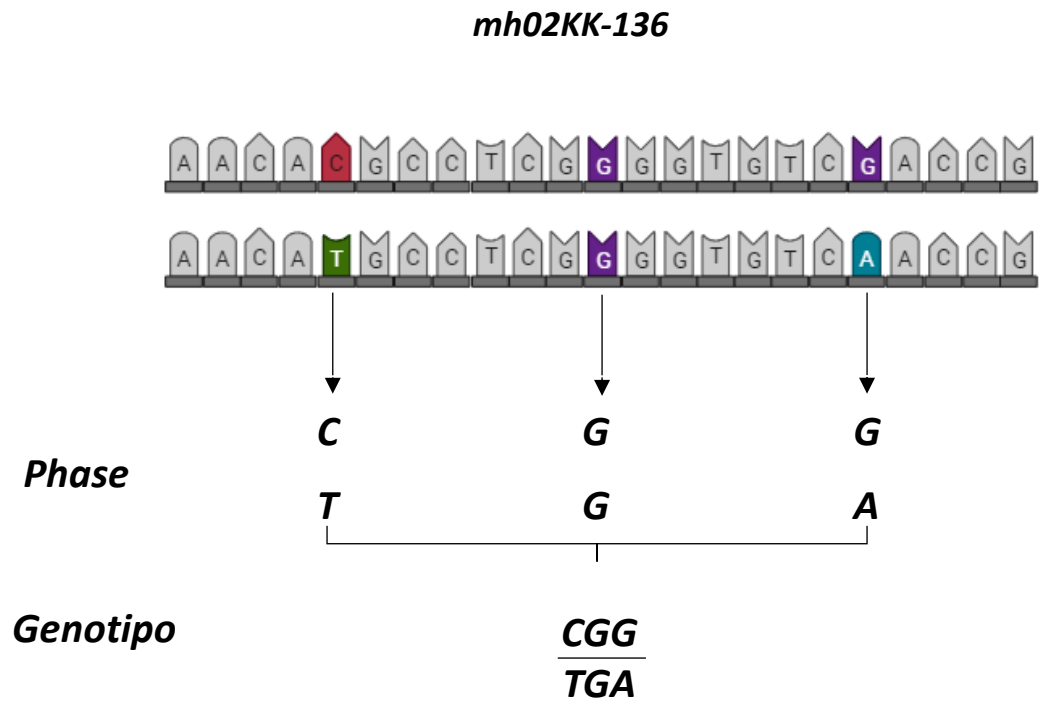
Si ringraziano:

Dott.ssa Solange Sorcaburu Ciglieri; Prof.ssa Serena Bonin; Dott.ssa Raffaella Vetrini; Dott.ssa Yasmine Addoum; Capitano Federico Scopinich; Dott. Riccardo Maculan; Dott.ssa Licia Giadrossi; Generale D'Aguanno Enzo M.; Capitano Pierini Ebe (Onorcaduti).

Dipartimento
di Scienze
Biomediche
e Sanità Pubblica
DISBSP

Microaplotipi:

Sviluppo e validazione di pannelli MPS utili per applicazioni forensi



Dr.ssa Filomena Melchionda

f.melchionda@staff.univpm.it

Università Politecnica delle Marche- Dipartimento Scienze Biomediche e Sanità Pubblica

Cosa sono?

"A microhaplotypes locus is defined by at least two single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the length of a sequence read and the expectation of very low recombination rate"

K. Kidd et al., Forensic Sci. Int. Genet. 29 (2017)

Utilità?

Identificazione umana

Multi-allelici, potere discriminativo elevato

Relazioni parentali

Deconvoluzione tracce miste

No stutter

DNA degradato

Size ridotto

Predizione origine biogeografica

Identificazione popolazione di appartenenza

Come studiarli?

mh02KK-140

TTAGGGCCT**C**GGATTGCTGTTCCACG**CA**TTCTGTCTGGAACTT**C**GGATTCTTTT
TAGGGCCTCAGATTGCTGTTCCACGCATTCTGTCTGGAACTTGGG
AGGGCCTCAGATTGCTGTTCCACGCATTCTGTCTGGAACTTGGGG
GGCCTCGGATTGCTGTTCCACGCGTTCTGTCTGGAACTTCGGAT
GCCTCGGATTGCTGTTCCACGCGTTCTGTCTGGAACTTCGGATT

ACAG
GCGC

Pannello 89MH

Scopo → Identificazione e caratterizzazione di un set di microaplotipi particolarmente informativi per l'identificazione individuale, l'analisi di relazioni parentali e la deconvoluzione di tracce miste

Quale parametro analizzare?

Ae è un parametro statistico definito come *"the corresponding number of evenly frequent neutral alleles, based on population dynamics, that would produce the same heterozygosity as the locus with several alleles at different frequencies"*

F. Oldoni et al., Forensic Sci. Int. Genet. 38 (2019)

Maggiore è il numero di ***Ae, maggiore*** è il ***potere informativo*** di un dato microaplotipo e ***maggiore*** è la ***probabilità*** che venga ***rilevata*** una ***traccia mista***

Pannello 89MH

C. Turchi et al., Forensic Sci. Int. Genet. 41 (2019)

Selezione dei microaplotipi

Fonte dei dat → ALlele FREquency Database (ALFRED)

Criteri →
i) Composto da *3*, *4* o *5*- *SNPs*;
ii) Composto da *2-SNPs* ma con un alto valore di *Ae*

Disegno pannello MPS

Ion Ampliseq Designer tool (TFS)

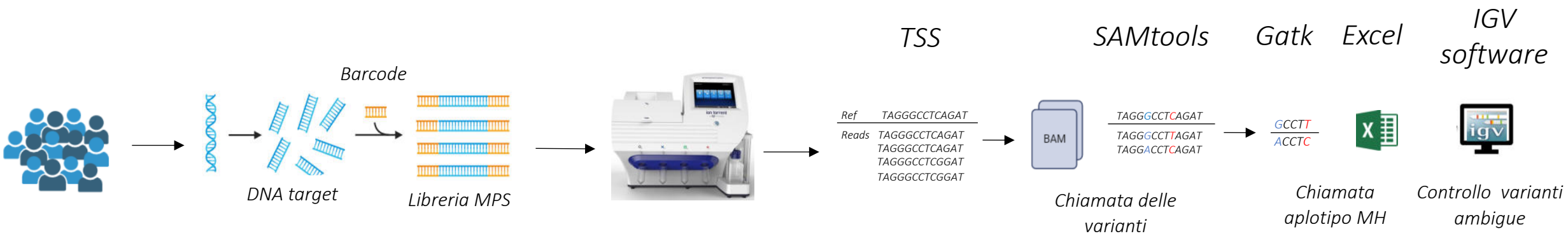
Amplicon range: *125-375bp*

Dimensioni MH selezionati: *18-279bp*

2 pool di primer

Amplicon size: *199 - 374bp*

Workflow



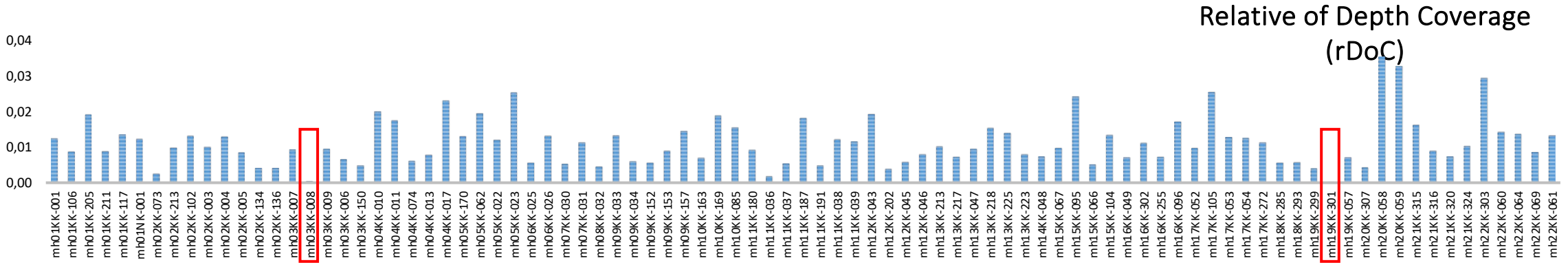
100 individui Italiani

Preparazione libreria MPS

Sequenziamento

Analisi dei dati

Pannello 87MH

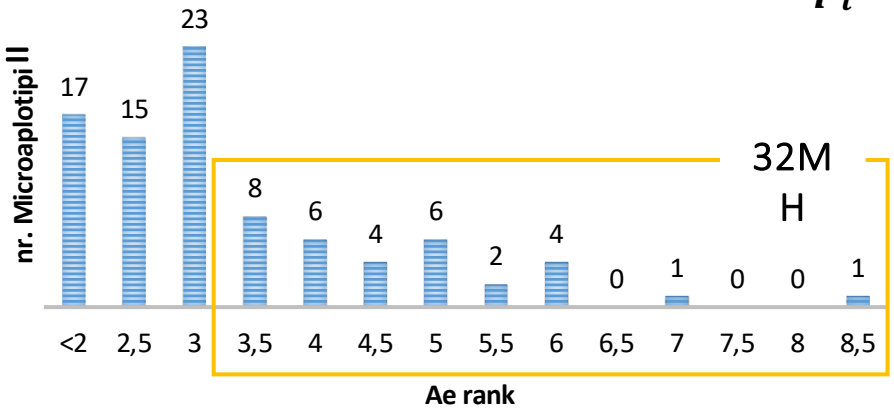


Performance pannello

Analisi genetiche

Parametri statistici valutati

Numero Effettivo degli Alleli **(Ae)** $\sum \frac{1}{p_i^2}$ ⟶ **Ae = Probabilità che una traccia mista possa essere rilevata**



Frequenza allelica (p_i)

Calcolata la probabilità teorica di rilevare più di due alleli in una miscela per il subset da 32MH

0,999999999999973

Matching Probability (PI) $\sum_i^n x_i^2$ ⟶ Combined Matching Probability ⟶ *87MH = **5,7x 10^{-63}***

*Subset 32MH= **1,6x 10^{-33}***

=

Pannello 29MH

C. Turchi et al., Minerva Medicoleg. 140 (2020)

Scopo → Applicazione di un pannello MPS di microaplotipi per DNA degradato

Selezione dei microaplotipi

Fonte dei dati → Pannello *87MH*

Criteri →
i) Composto da *2* a *5 SNPs*;
ii) Microaplotipi con ***Ae ≥ 1,8***;
iii) Microaplotipi amplificabili con taglia *< 180bp*

Disegno pannello MPS

Ion Ampliseq Designer tool (TFS)

Amplicon range: *125-175bp*

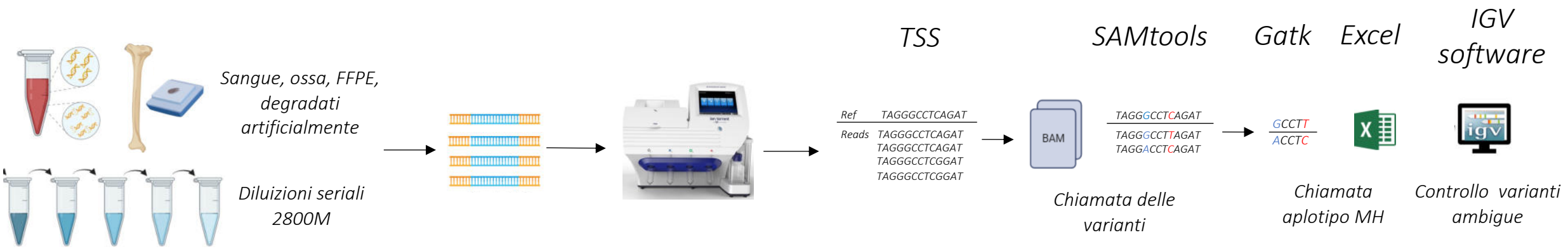
Dimensioni MH selezionati: *18-115bp*

↓

1 pool di primer

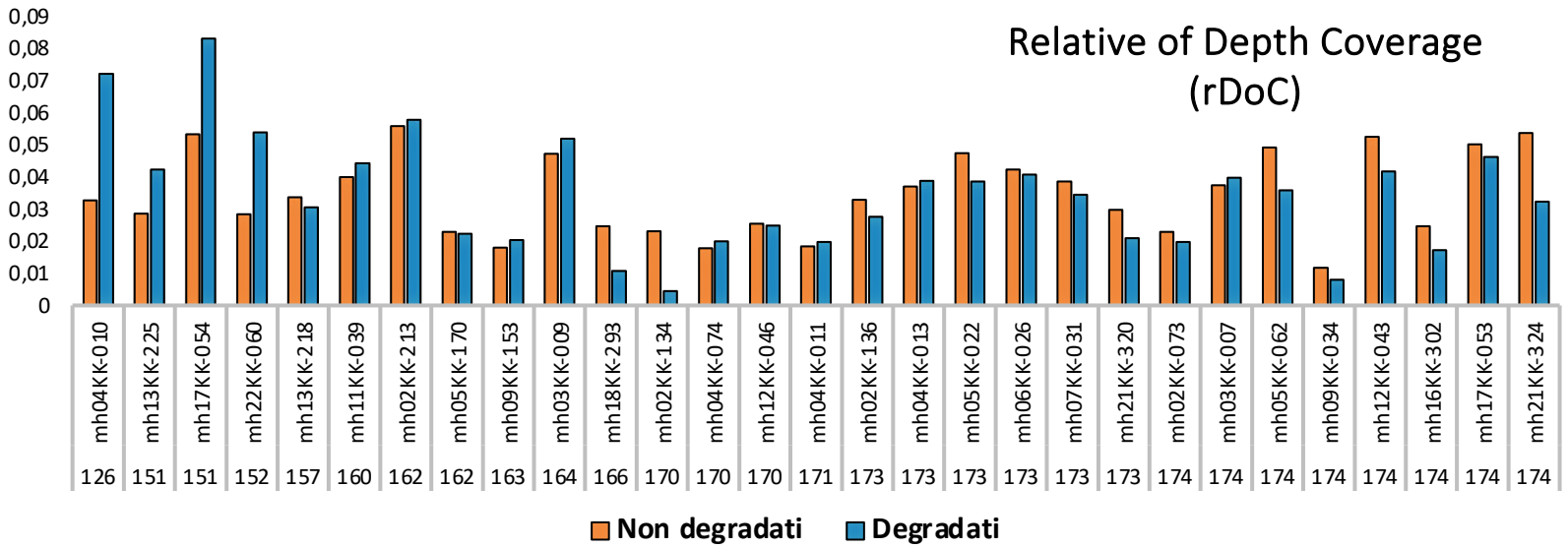
Amplicon size: *126 - 174bp*

Workflow



Pannello 29MH

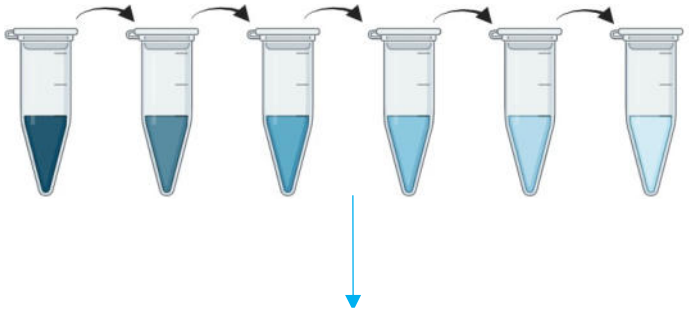
Performance pannello



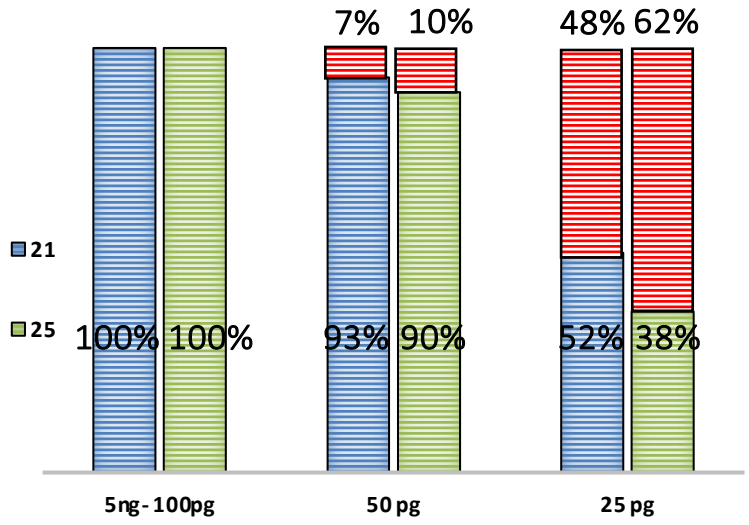
Test di sensibilità

5ng/µl - 25pg/µl

21 e 25 cicli PCR

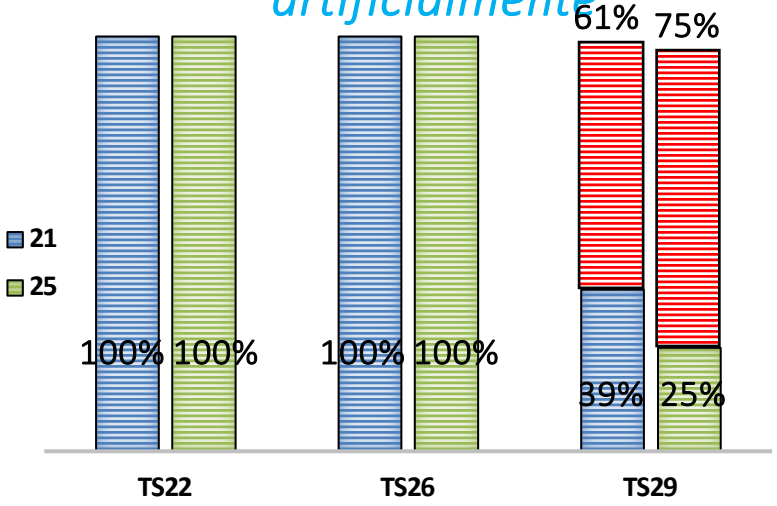


Corretta genotipizzazione fino a 100pg input DNA



% Genotipizzazione corrette

Campioni degradati artificialmente



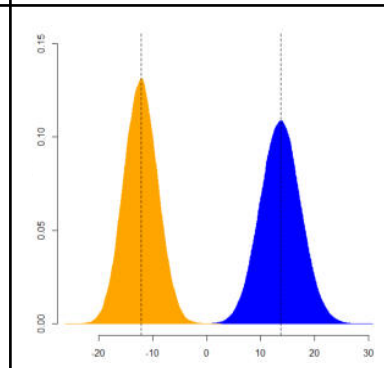
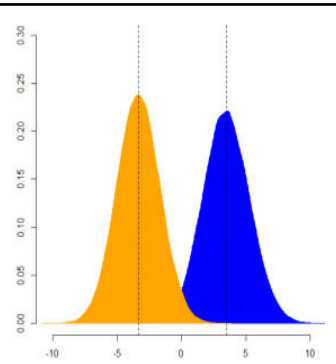
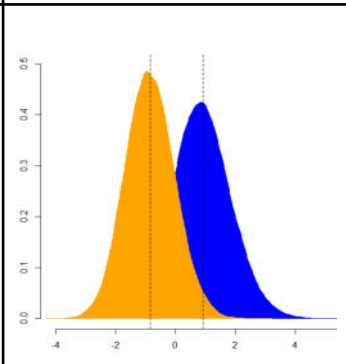
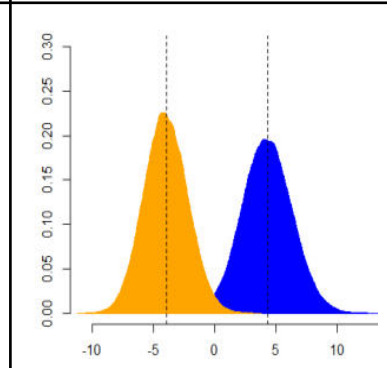
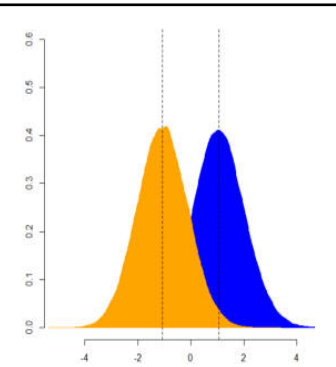
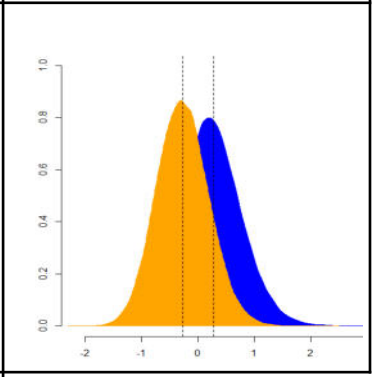
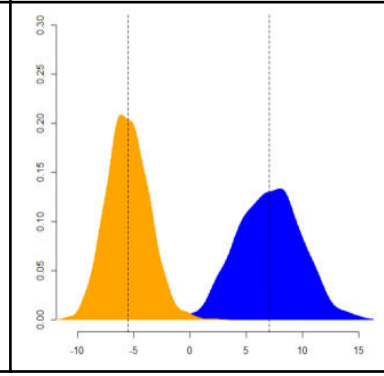
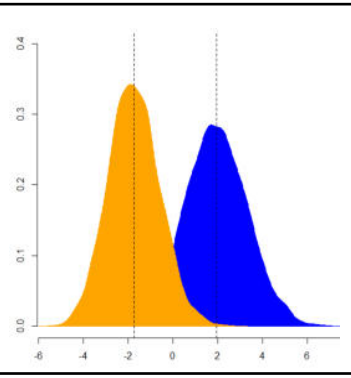
TS22: Riferimento

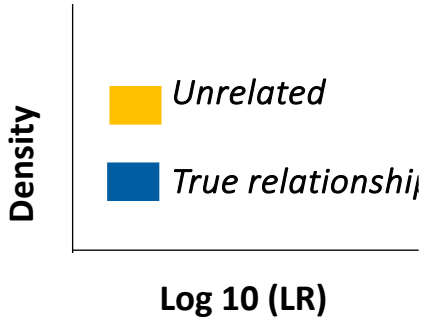
TS26: [0,5ng/ul]; DI=non misurabile

TS29: <loq; DI=non misurabile

<loq= [DNA] al di sotto della soglia minima rilevabile dal kit di quantizzazione.*

Applicazione pratica- Kinship analysis

	Full sibling	*Half Sibling*	*First Cousin*
87MH			
29MH			
F6C			



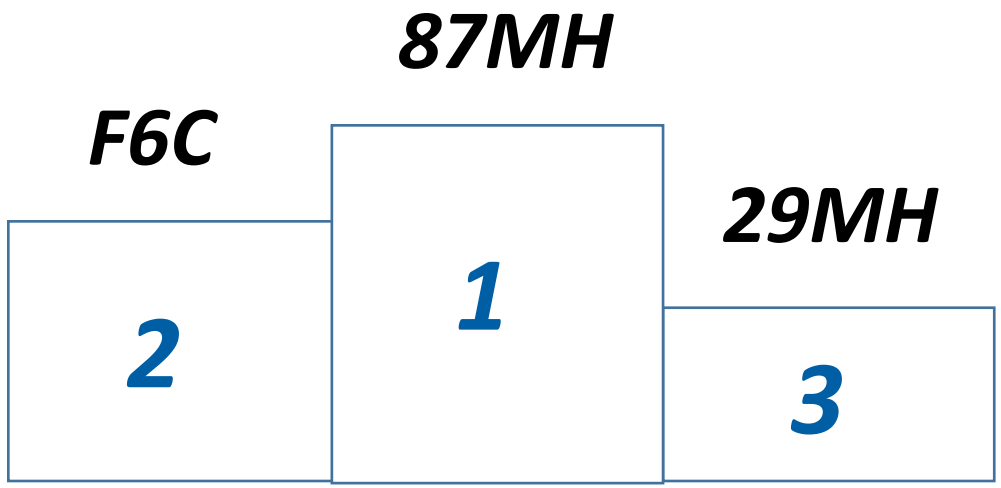
Valutazione informatività pannelli

Microaplotipi vs Powerplex Fusion 6C

Software: *Familas v3.2.6*

Simulazioni pedigree= *100000*

Confronto: *87MH vs 29MH vs Powerplex*



C. Turchi et al., Minerva Medicoleg. 140 (2020)

Grazie per l' attenzione!

XXIX Congresso Ge.F.I.
La genetica forense al servizio della persona fragile
9 - 11 novembre 2023 | Messina

PERSISTENZA DEL DNA SU SUPPORTI NON POROSI IN PLASTICA:

Analisi delle caratteristiche qualitative e quantitative di campioni di touch DNA e valutazione della composizione e comparabilità nel tempo.

Martina Onofri,[1] Federica Tommolini,[2] Simona Severini,[2] Eugenia Carnevali[2]

1 **Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Sezione di Medicina Legale, Università degli Studi di Perugia, Terni**

2 **Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Azienda Ospedaliera S. Maria, Università degli Studi di Perugia, Terni**

TRANSFER, PERSISTENCE, AND RECOVERY

On DNA transfer: The lack and difficulty of systematic research and how to do it better

Annica Gosch, Cornelius Courts

"Variables should ideally represent what could **realistically** be expected under casework conditions.

[...] other factors such as **casework-relevant persistence scenarios** or the impact of **interindividual differences in handling an item** have rarely been studied or never been taken into consideration at all."

DNA commission of the International society for forensic genetics: Assessing the value of forensic biological evidence - Guidelines highlighting the importance of propositions. Part II: Evaluation of biological traces considering activity level propositions

Peter Gill[a,b,*,1], Tacha Hicks[c,d,1], John M. Butler[e], Ed Connolly[f], Leonor Gusmão[g,h,i], Bas Kokshoorn[j], Niels Morling[k], Roland A.H. van Oorschot[l,m], Walther Parson[n,o], Mechthild Prinz[p], Peter M. Schneider[q], Titia Sijen[j], Duncan Taylor[r,s]

"**7. Research and data relevant to the case**

Expert opinion must be **underpinned by experimental data**.

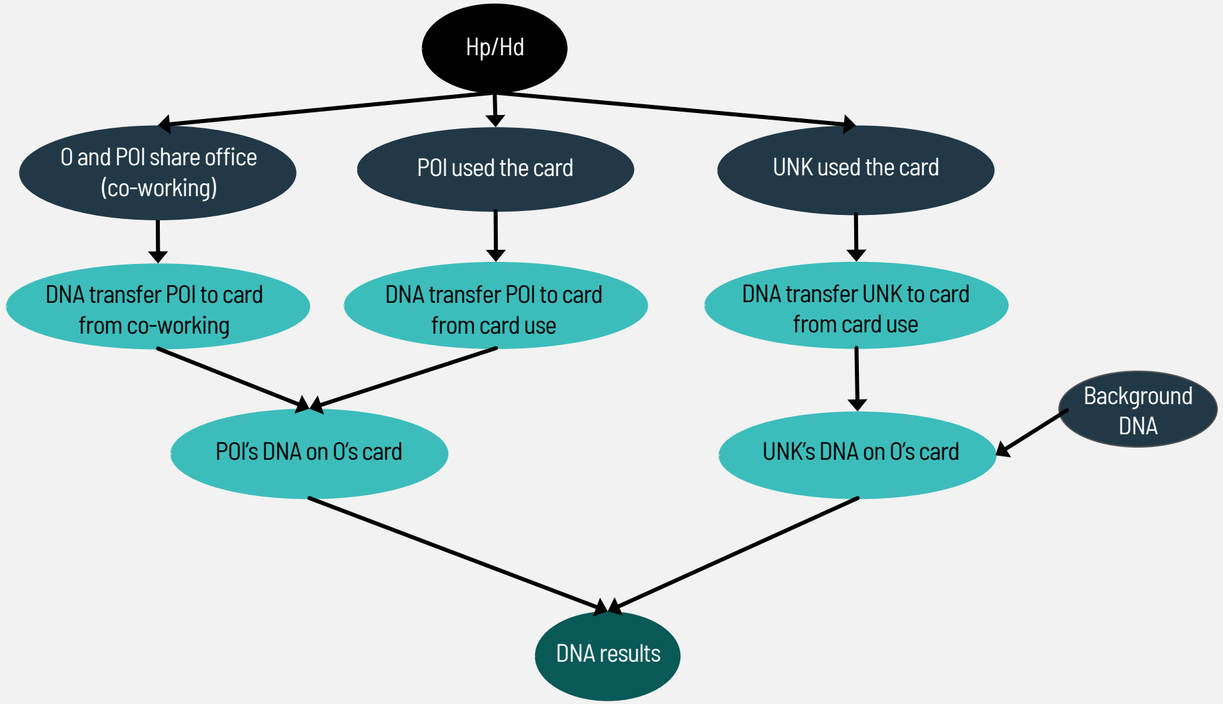
[...]

The source of the knowledge should be disclosed and the limits of the data discussed. In the absence of published data, calibrated experience, **case tailored experiments**, peer consultation can be used."

Article

Direct and Secondary Transfer of Touch DNA on a Credit Card: Evidence Evaluation Given Activity Level Propositions and Application of Bayesian Networks

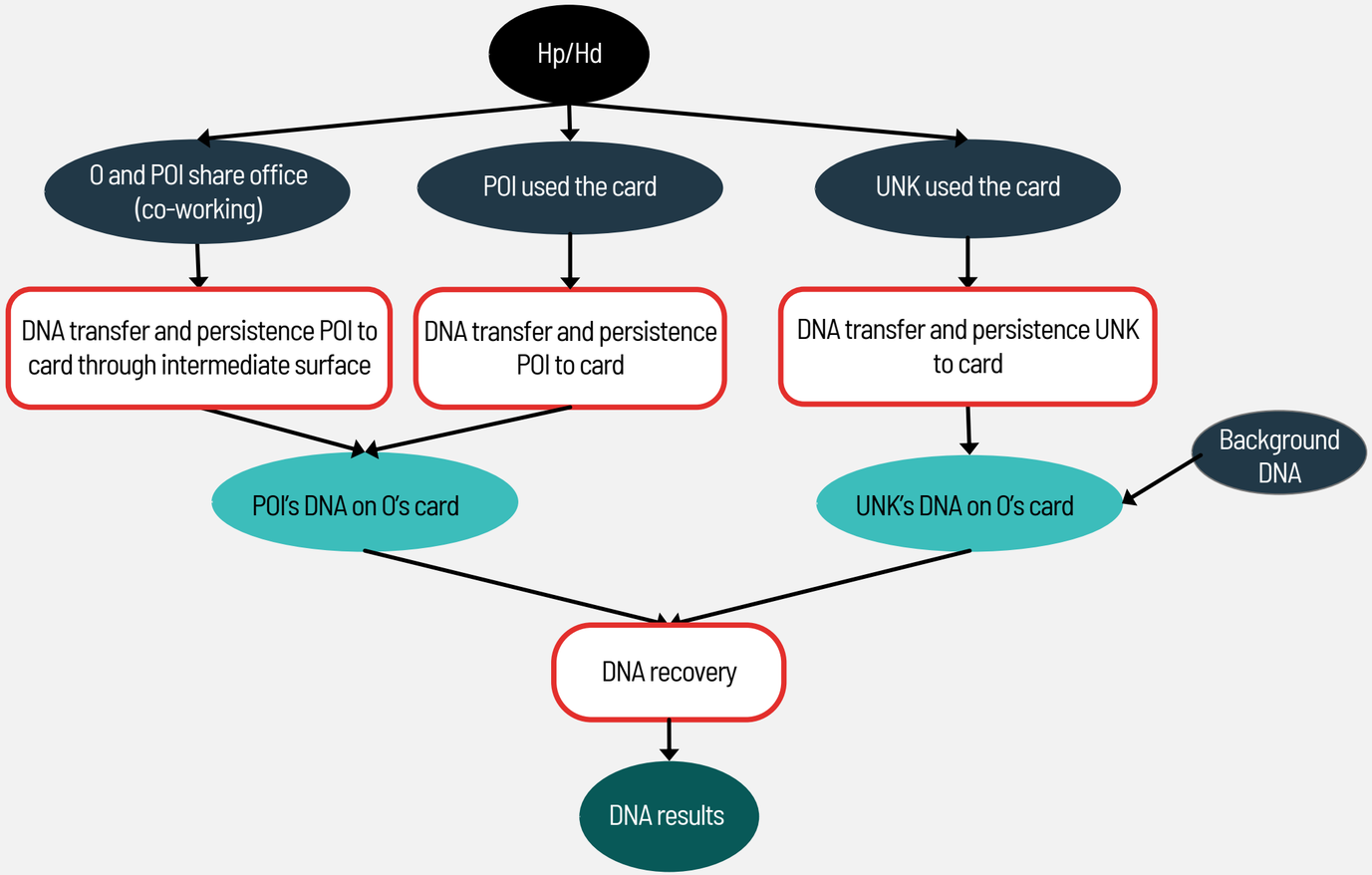
Martina Onofri [1,*], Cristina Altomare [1], Simona Severini [2], Federica Tommolini [2], Massimo Lancia [1], Luigi Carlini [1], Cristiana Gambelunghe [1] and Eugenia Carnevali [2]

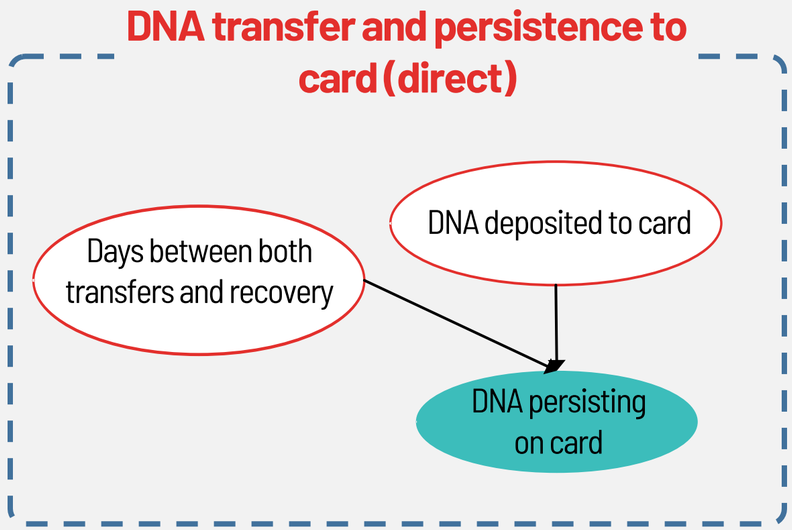


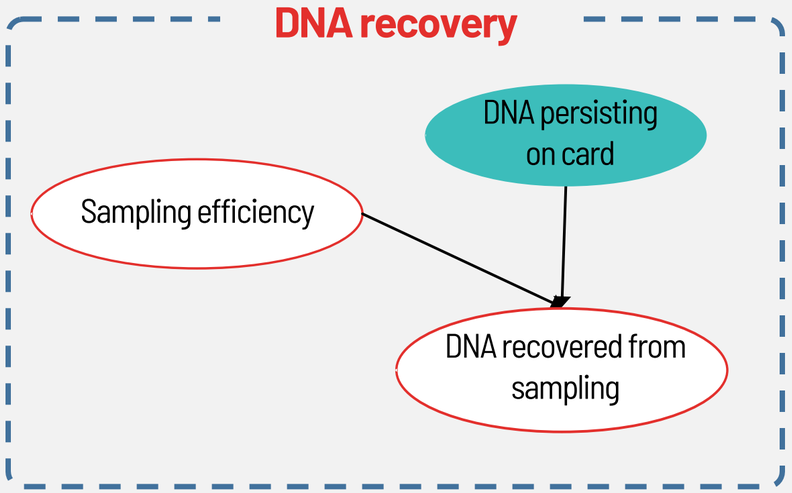
TRANSFER, PERSISTENCE, AND RECOVERY

D1: *Qual è il metodo di campionamento ottimale per massimizzare la* recovery*?*

D2: *Come cambiano nel tempo le caratteristiche qualitative e quantitative di tracce di* touch DNA *e la loro comparabilità?*







MATERIALI E METODI

PULIZIA

3 x

Candeggina: **10 min**

Luce UV: **30 min** x lato

✓ NO DNA

RECOVERY

5 x

I partecipanti hanno maneggiato ciascuno almeno una carta.

double swab — ***tape lifting***

✓ *double swab + tape lifting*

PERSISTENZA

4 x

Per ciascun partecipante sono state utilizzate 8 carte suddivise in due modalità di trasferimento:

4 x — **DIRETT O**

4 x — **SECONDARIO**

Campionamento effettuato agli intervalli di tempo:

t0	***t1***	***t2***	***t3***
deposizione	15 gg	1 mese	2 mesi

Conservazione:

Disposte su porta vetrini specifici per ciascun partecipante per minimizzare trasferimenti e contaminazioni

In scatole di cartone precedentemente sterilizzate con luci UV, luogo buio, fresco e asciutto

Workflow di laboratorio:

Estrazione: fenolo/cloroformio, eluizione in 30 uL

Quantizzazione: PowerQuant® System (Promega).

PCR kit: PowerPlex® ESX 17 Fast System (Promega).

Sequenziatore: SeqStudio Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific).

Data analysis: EuroForMix, EFMex, and EFMrep.

Variabilità intra-individuale e persistenza

Partecipante C

3 x

t0 — *t1, t2, t3*

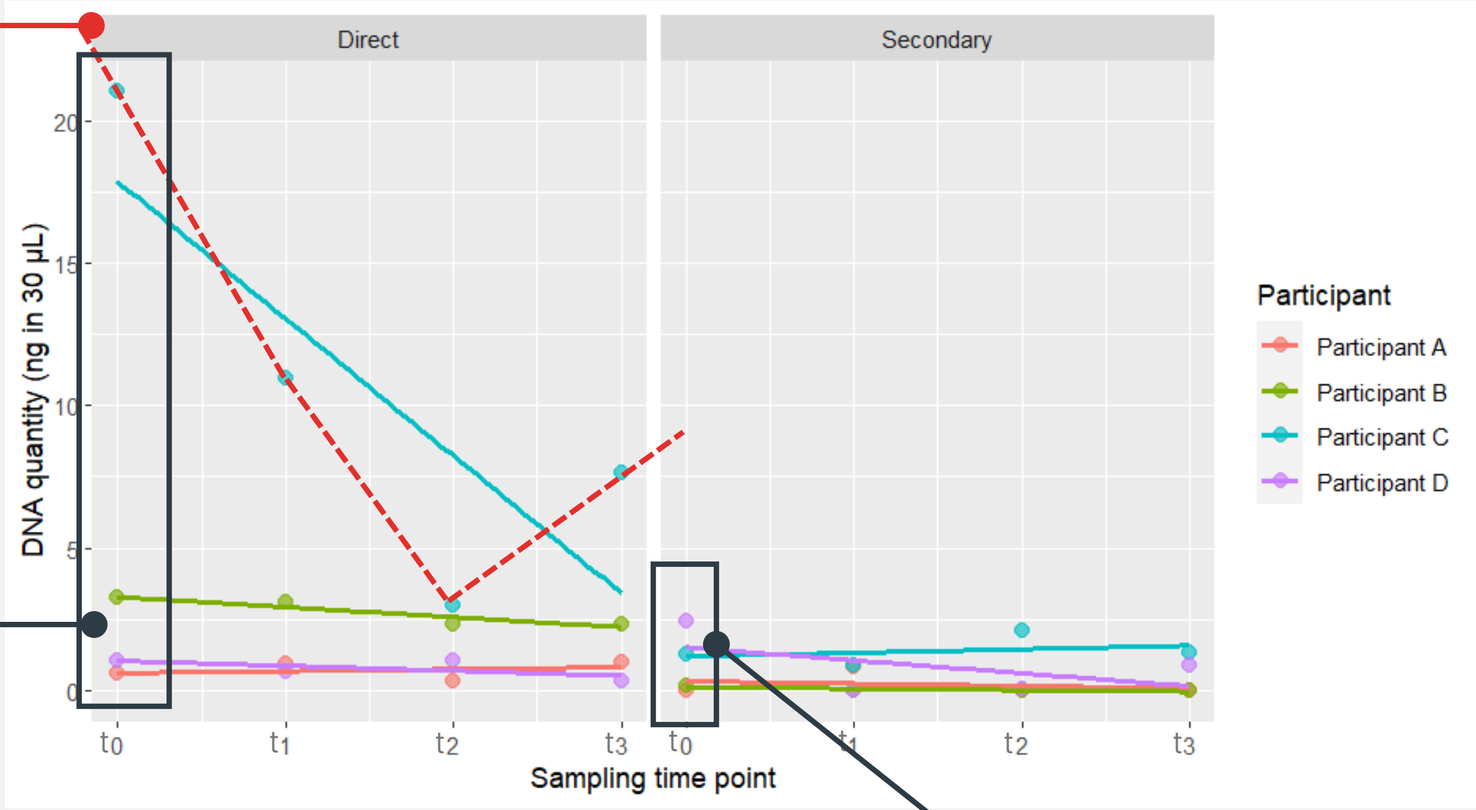
RISULTATI

Variabilità
intra-individuale

? Quantità di DNA inizialmente depositata

Variabilità
inter-individuale

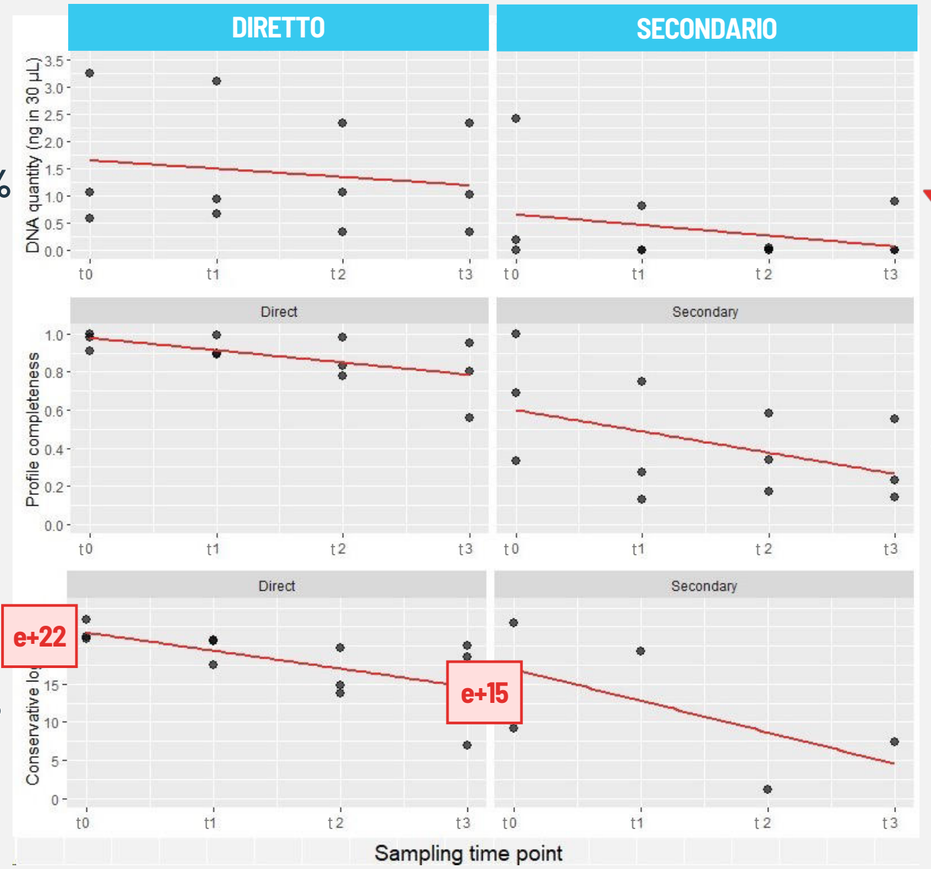
Shedder status



Maggiore omogeneità nella quantità di DNA di partenza

RISULTATI

Partecipante C escluso



24.5%

20%

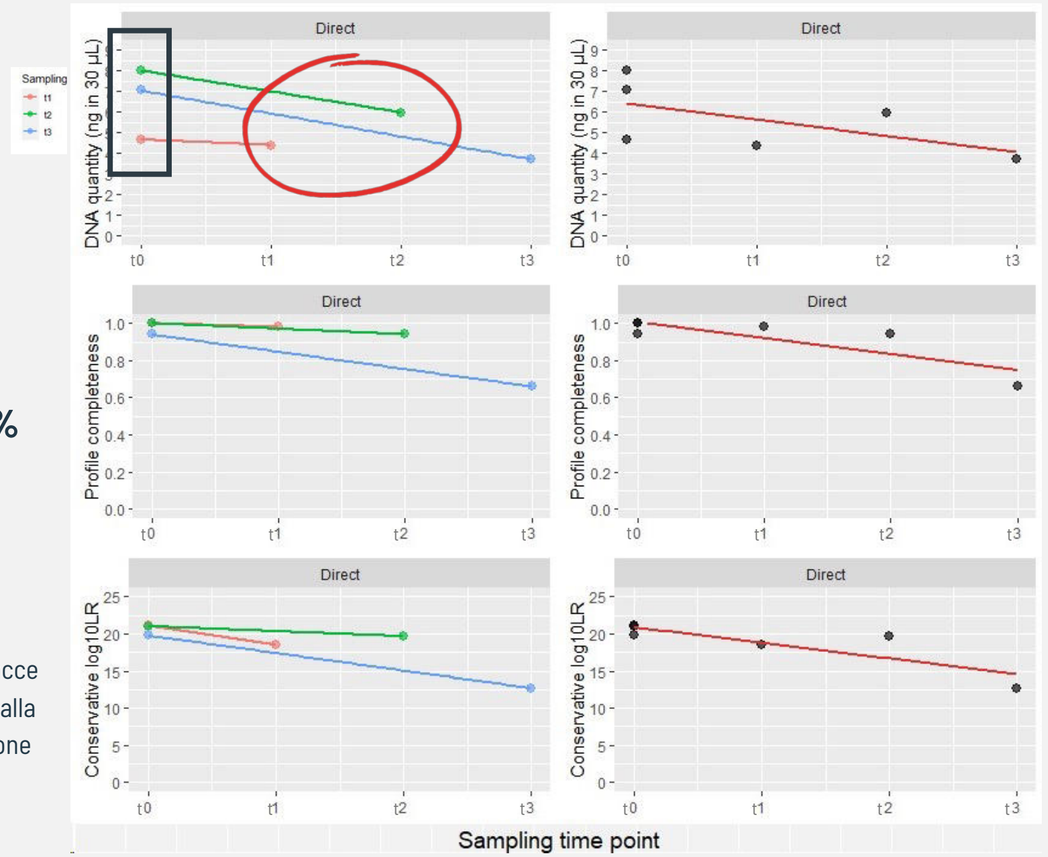
31.7%

51.2%

54.4%

2/3 delle tracce non idonee alla comparazione

Partecipante C
variabilità e persistenza



42.8%

32.7%

38.5%

CONCLUSIONI

- Diminuzione della quantità e qualità del DNA recuperato - riduzione del potere di attribuzione:
  - Variabilità **inter**-individuale
  - Variabilità **intra**-individuale
  - Effetto più pronunciato nel trasferimento **secondario**

! LA **QUANTITA' DI DNA INIZIALMENTE DEPOSITATA** È DETERMINANTE

PER OTTENERE VALORI PIÙ COMPLETI DI **PROBABILITÀ** DI RINVENIMENTO DI UNA TRACCIA CON DETERMINATE CARATTERISTICHE QUANTITATIVE E QUALITATIVE A UN TEMPO ***tx*** SONO NECESSARI:

- Maggior numero di esperimenti + simulazioni
- Maggior numero di partecipanti
- Studio di variabilità di *shedding*
- Valutazione di altre variabili caso-specifiche: condizioni ambientali, background DNA, prevalenza

XXIX Congresso Ge.F.I.
La genetica forense al servizio della persona fragile
9 - 11 novembre 2023 | Messina

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

MARTINA ONOFRI
martina.onofri@live.it

Selena Cisana*[1]

Monica Omedei [1], Aurora Desogus [2], Giorgia Ferrero [2], Eugenio Alladio [1,2], Paolo Garofano [1]

1 Centro Regionale Antidoping e di Tossicologia “A. Bertinaria”, Orbassano (TO)

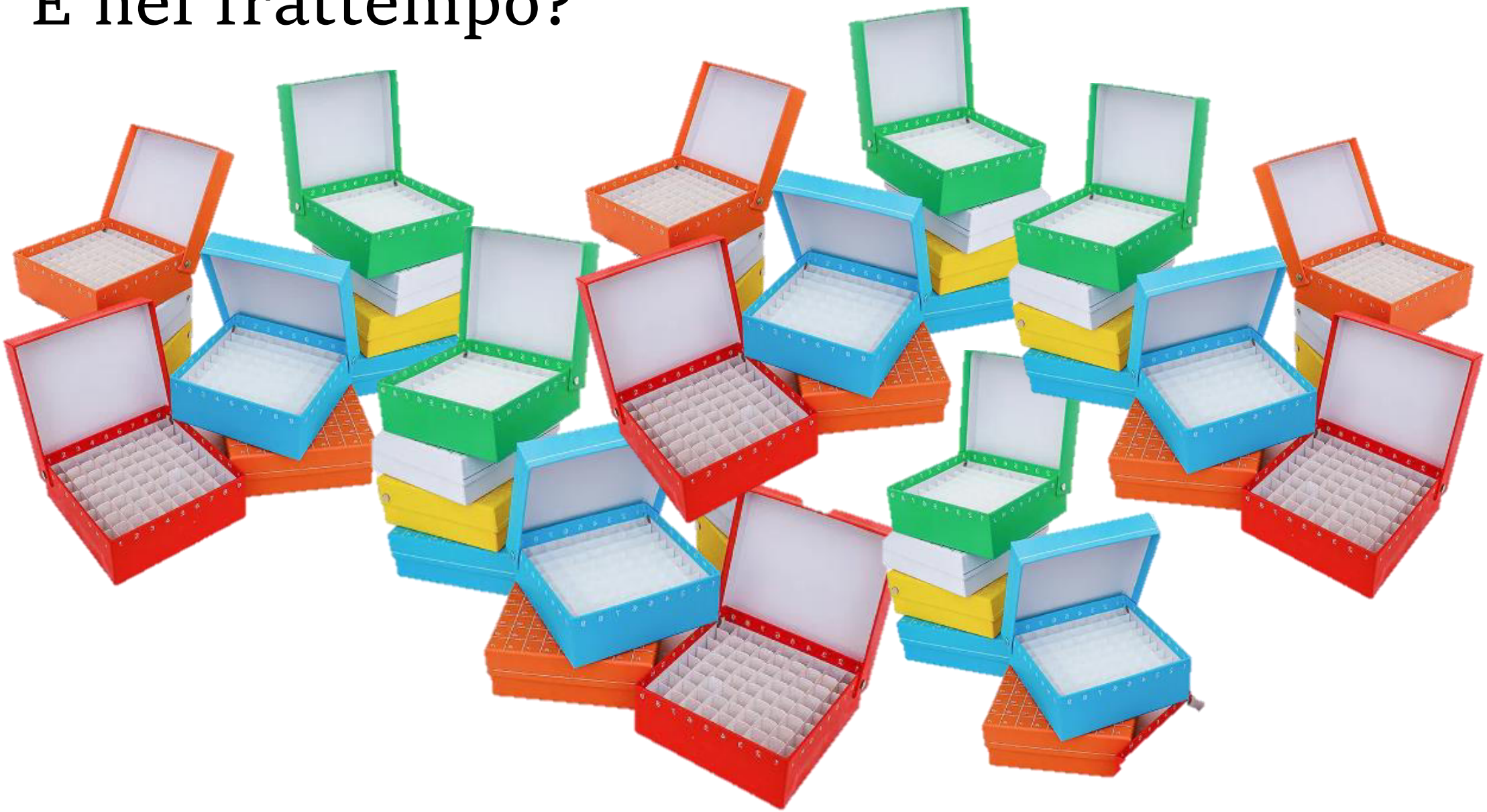
2 Università degli Studi di Torino-Dipartimento di Chimica

Freeze-drying: una buona soluzione

«Tutti i file generati, i fogli di lavoro, i dati grezzi, le fotografie, relativi ad un unico procedimento, dovranno essere conservati secondo le modalità stabilite o condivise con l'autorità giudiziaria. Gli estratti di DNA dovranno essere messi nella disponibilità dell'autorità giudiziaria, che ne dovrà autorizzare la distruzione, la conservazione o la restituzione"

Criterio 2 de "Criteri minimi di qualità delle analisi di Genetica Forense ad uso identificativo" Gruppo di Lavoro SIGU – Genetica Forense, 2016

E nel frattempo?



E nel frattempo?

Centro Regionale Antidoping
Alessandro Bertinaria
LABORATORIO REGIONALE DI TOSSICOLOGIA
Direttore: Dott.ssa Raffaella Salvo

ACCREDIA
L'ENTE ITALIANO DI ACCREDITAMENTO
LAB N° 0949 L

Regione Gonzole 10/1
10043 Orbassano (TO)
Tel 011/9022401
Fax 011/90224261
info@antidoping.piemonte.it

RAPPORTO DI PROVA

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018

8.5 Azioni per affrontare i rischi e le opportunità

ISO 17025
ACCREDITED LABORATORY

8.5.1 Il laboratorio deve prendere i considerazione i rischi e le opportunità associati alle attività di laboratorio al fine di:

a) Assicurare che il sistema di gestione raggiunga i risultati previsti;

b) Accrescere le opportunità di conseguimento degli scopi e obiettivi del laboratorio

c) Prevenire o ridurre impatti indesiderati e potenziali criticità nelle attività di laboratorio

d) Conseguire il miglioramento

Miglioramento: Liofilizzazione (Freeze-drying)

Fasi operative

- Estrazione campioni di riferimento
- Quantificazione (QuantiFilier Trio®)
- Diluizione a concentrazione nota in volume finale di 30 µL

Campioni	Concentrazione
Soggetto A (A) Soggetto B (B) Soggetto C (C)	5 ng/µL
	2.5 ng/µL
	1 ng/µL
	0.5 ng/µL
	0.05 ng/µL
	0.005 ng/µL

SOGLIA DECISIONALE INTERNA

Fasi operative

- Liofilizzazione e risospensione a diversi volumi

Campioni	Volumi
Soggetto A (A)	30 µL
Soggetto B (B)	20 µL
Soggetto C (C)	10 µL

- Quantificazione (QuantiFilier Trio®)
- Amplificazione (GlobalFiler®) in half volume
- Elettroforesi (3500 Genetic Analyzer)

Risultati
Concentrazione: pre-post trattamento

- il test di Shapiro-Wilk mostra che i dati non sono distribuiti in modo gaussiano
- t-test: p-value = 0.97
- Wilcoxon test: p-value = 0.097
- Anova test: p-value = 0.99

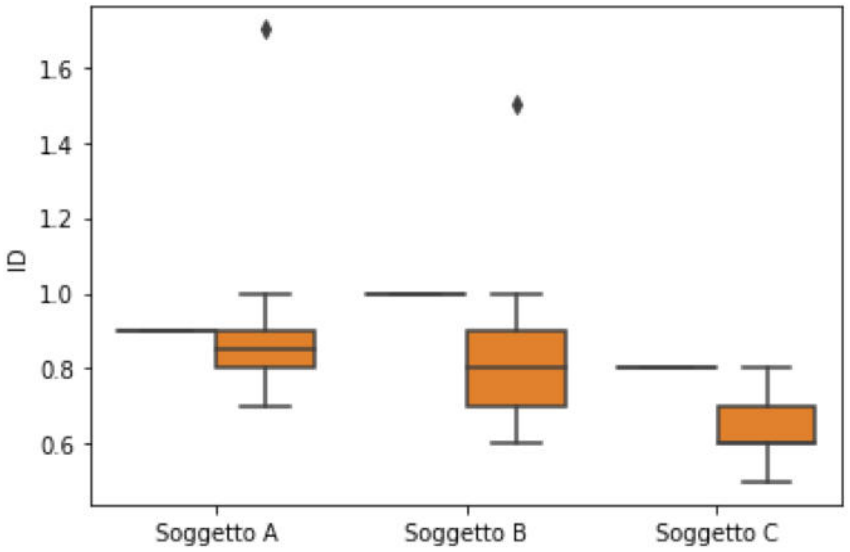
GRAZIE EUG!

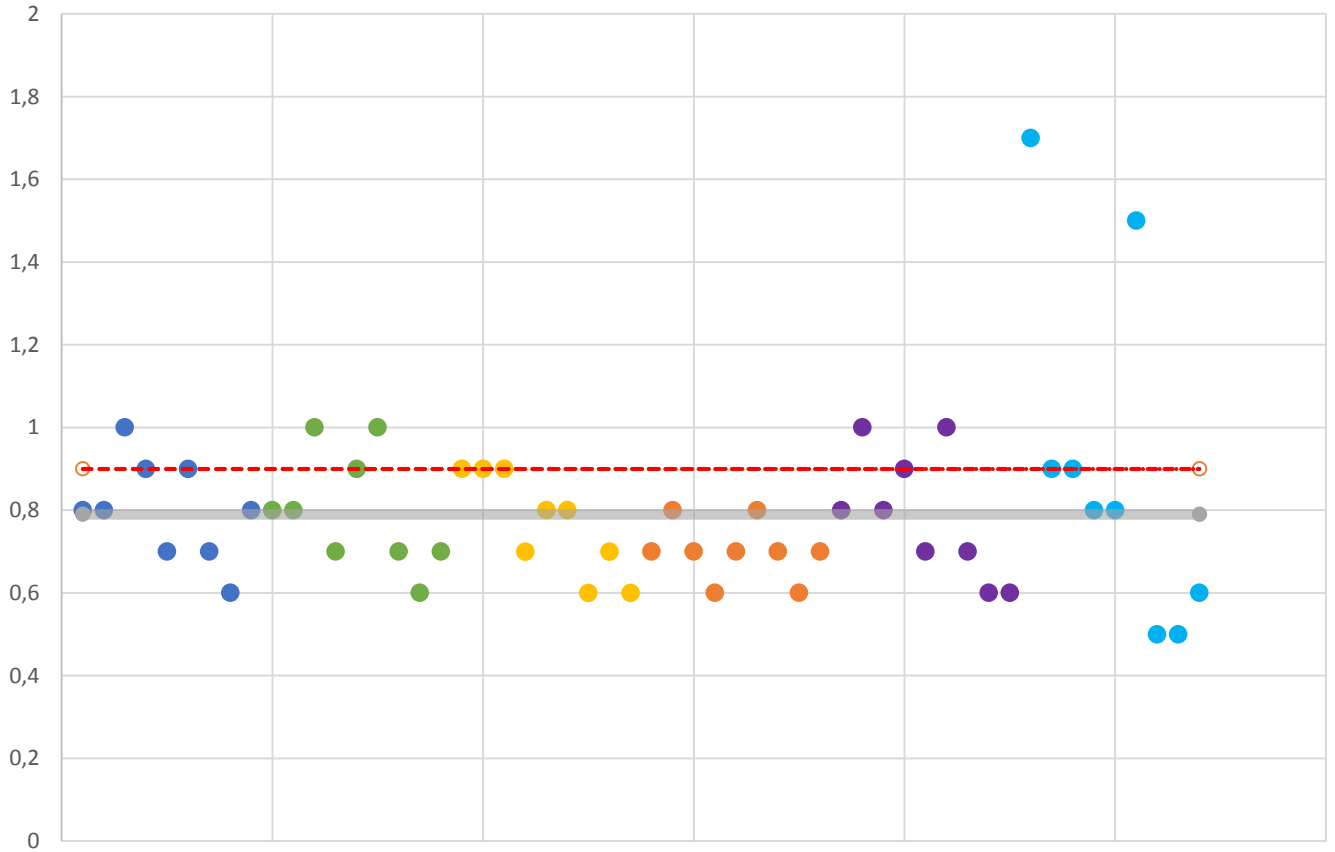
Risultati
Concentrazione: pre-post trattamento

I valori di p-value NON non sono inferiori a 0.05

È quindi valida l'ipotesi H0 per cui non vi sono differenze pre-post trattamento

Risultati
Indice di degradazione: pre-post trattamento





Risultati
Indice di degradazione: pre-post trattamento

l'ID rimane complessivamente (*) inferiore a 1

IPCCT flag triggered?	Degradation Index	Quality Index interpretation†
No	<1	Typically indicates that DNA is not degraded or inhibited.
	1 to 10	Typically indicates that DNA is slightly to moderately degraded. PCR inhibition is also possible, however not enough to significantly suppress IPC amplification.
	>10 or blank (no value)	Typically indicates that DNA is significantly degraded. PCR inhibition is also possible, however not enough to significantly suppress IPC amplification. Highly degraded samples that cannot be recovered by STR can be analyzed with HID-Ion AmpliSeq™ Panels and the Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) (see "Degraded sample studies: GlobalFiler™ STR Kit and HID-Ion AmpliSeq™ Identity and Ancestry Panel" on page 103).

(*) due campioni a [0.005 ng/µL] mostrano rispettivamente ID 1.7 e 1.5, probabilmente influenzato dalla ridotta concentrazione. L'analisi del profilo elettroforetico permette di escludere effetti di degradazione significativi

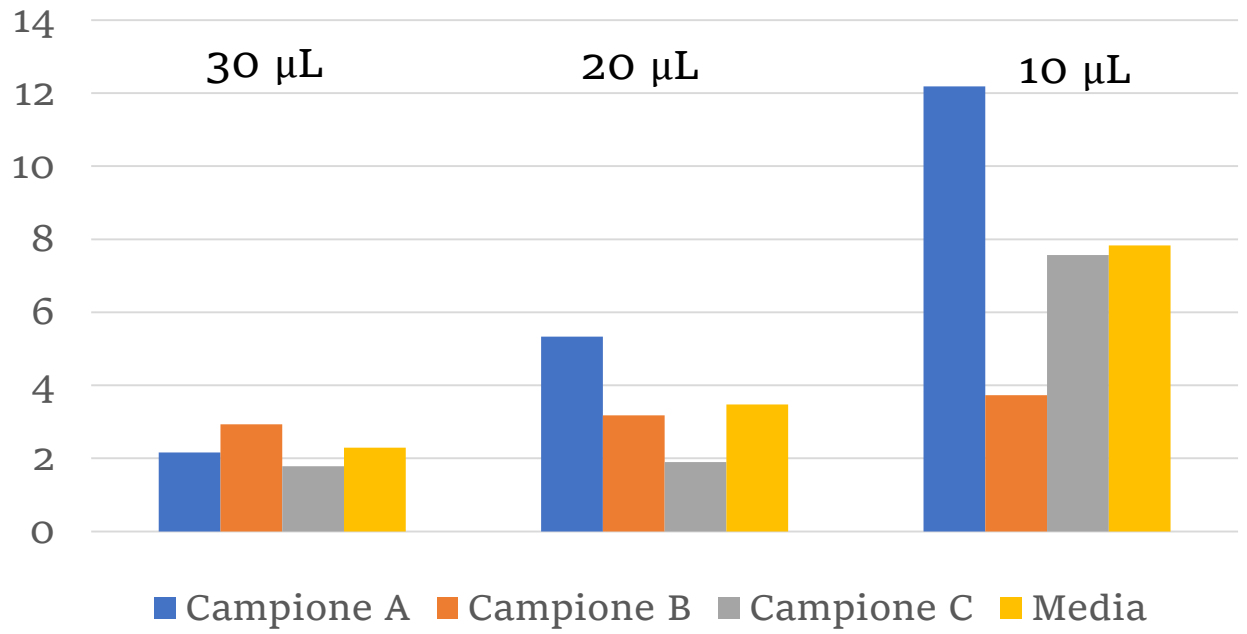
Risultati
profilo elettroforetico

- NO Ski-slope effect, NO Drop-in
- Altezze medie e % Drop-out dipendente dalla quantità di DNA input (come atteso)

Campione	Concentrazione teorica	Volume di sospensione	DNA Input effettivo	% DROP OUT	% DROP IN
1	5 ng/µL	30 µL	0.25 ng	0%	0%
2	5 ng/µL	20 µL	0.25 ng	0%	0%
3	5 ng/µL	10 µL	0.25 ng	0%	0%
4	2.5 ng/µL	30 µL	0.25 ng	0%	0%
5	2.5 ng/µL	20 µL	0.25 ng	0%	0%
6	2.5 ng/µL	10 µL	0.25 ng	0%	0%
7	1 ng/µL	30 µL	0.25 ng	0%	0%
8	1 ng/µL	20 µL	0.25 ng	0%	0%
9	1 ng/µL	10 µL	0.25 ng	0%	0%
10	0.5 ng/µL	30 µL	0.25 ng	0%	0%
11	0.5 ng/µL	20 µL	0.25 ng	0%	0%
12	0.5 ng/µL	10 µL	0.25 ng	0%	0%
13	0.05 ng/µL	30 µL	0.125 ng	0%	0%
14	0.05 ng/µL	20 µL	0.203 ng	0%	0%
15	0.05 ng/µL	10 µL	0.25 ng	0%	0%
16	0.005 ng/µL	30 µL	0.0075 ng	42%	0%
17	0.005 ng/µL	20 µL	0.015 ng	25%	0%
18	0.005 ng/µL	10 µL	0.015 ng	79%	0%

Quantità di DNA input

- La liofilizzazione consente di concentrare il campione e poter avere quindi maggiore DNA input per la successiva PCR



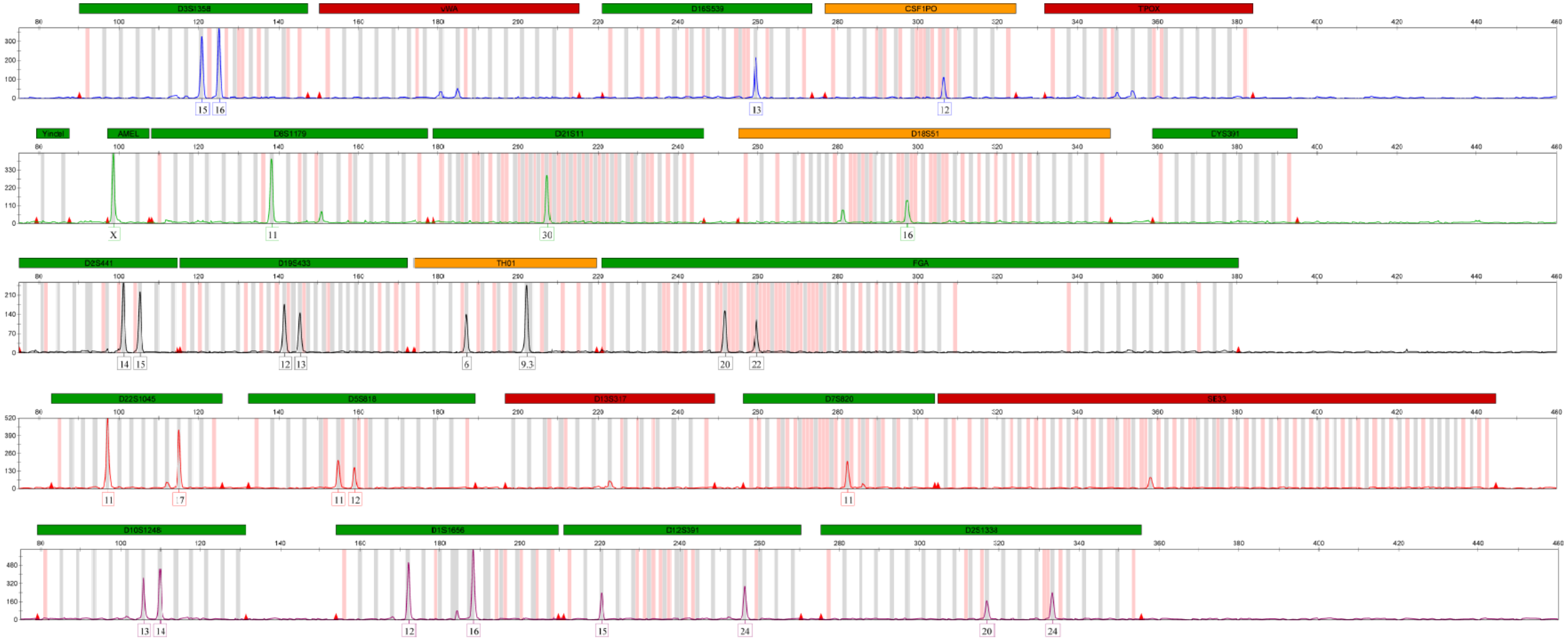
Quantità di DNA input

- Spesso otteniamo campioni Low-Template, con concentrazioni che non consentono di ottenere profili completi
- La liofilizzazione consente di utilizzare tutto il DNA a disposizione
- Preparando la miscela di reazione direttamente nella provetta contenente il DNA liofilizzato

- Il processo di amplificazione diretta in seguito a concentrazione mediante liofilizzazione risulta non utile per campioni con concentrazioni favorevoli. Infatti la quantità di DNA input è eccessiva e si osservano profili elettroforetici con tali caratteristiche (sdoppiamento dei picchi, non amplificazione di marcatori...)

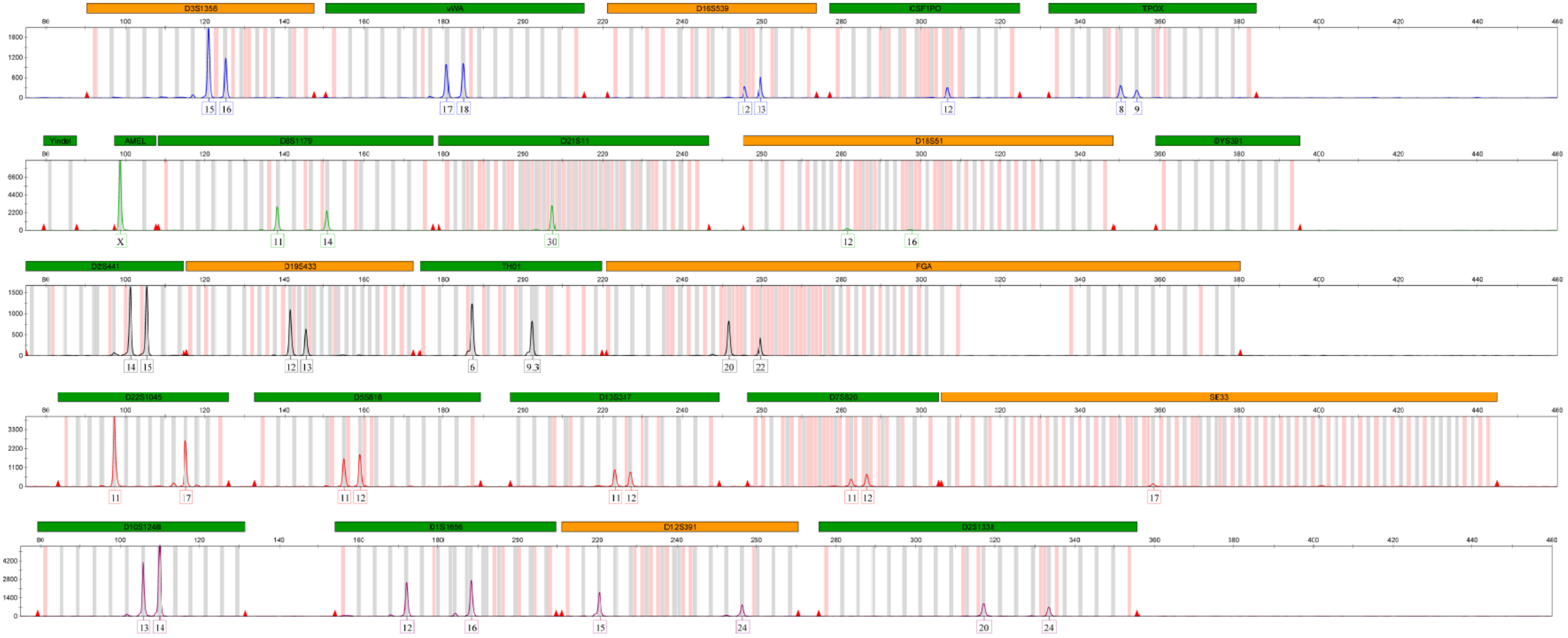
Concentrazione teorica 0.005 ng/µL
volume di DNA = 7.5 µL
volume di reazione = 12.5 µL
DNA input effettivo = 0.015 ng

Altezza media	% Drop-Out
252	29%



Concentrazione teorica 0.005 ng/µL
volume di reazione = 12.5 µL
DNA input effettivo = 0.06 ng

Altezza media	% Drop-Out
1501	2%



Conclusioni

- NO effetti sulla CONCENTRAZIONE
- NO effetti sull'INDICE DI DEGRADAZIONE
- NO effetti sulla ‘‘qualità’’ del profilo genetico

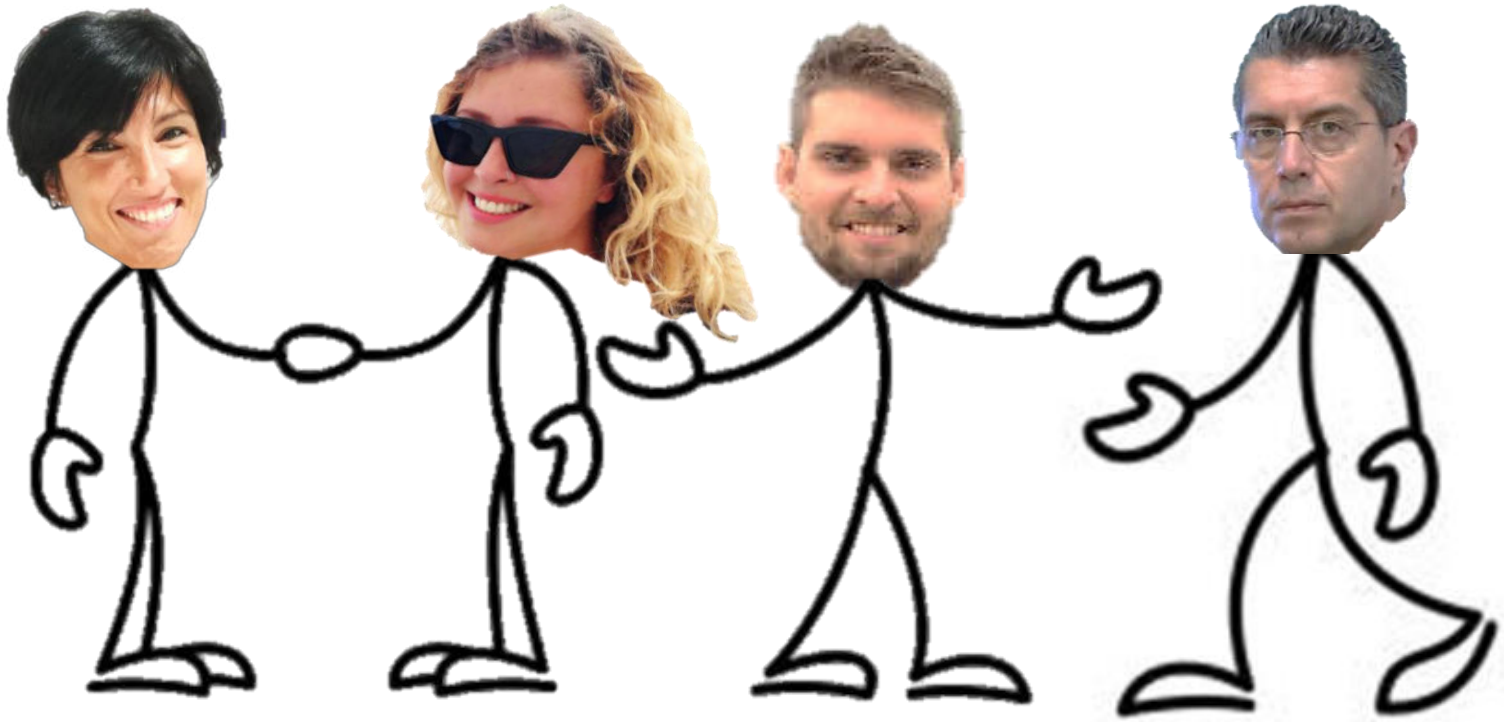
- Possibilità di concentrare il campione
- Utilizzo effettivo della totalità del DNA disponibile (per campioni Low Template)

- NO problemi di stoccaggio (T. ambiente)
- Riduzione spazio necessario per la conservazione

Conclusioni

- BUONA SOLUZIONE
- Valutata l’introduzione del processo di liofilizzazione in PROCEDURA ISO17025

Grazie



- selena.cisana@gmail.com
- eugenio.alladio@unito.it

XXIX Congresso Nazionale Ge.F.I. – Messina, 9-11 novembre 2023

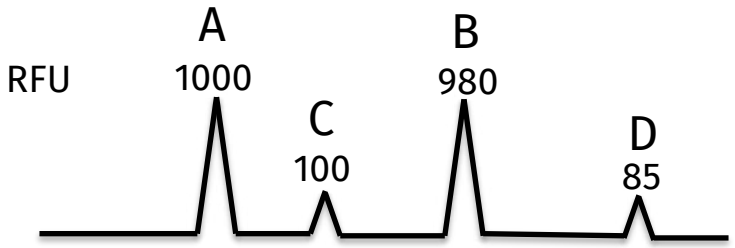
Contributo alla costruzione di un prototipo di interpretazione di misture biologiche mediante analisi di tipizzazione di aplotipi del cromosoma Y

Giulia Soldati

Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Unità di Medicina Legale - Laboratorio di Genetica Forense, Università degli Studi di Verona

CONCETTI GENERALI – misture di DNA

- Le **misture biologiche** contengono DNA proveniente da **più di un individuo**
- Uno o più individui contributori partecipano all'**activity level** di un reato
- Un' evidenza mista è **difficile** da utilizzare come **prova** ed ha bisogno di essere **interpretata**



Evidenza mista
aSTRs

1 INTERPRETAZIONE QUALITATIVA O SEMICONTINUA

LRmix Studio

Per il **modello semicontinuo** i genotipi che si possono generare dalla mistura hanno la stessa probabilità di esistere al netto delle differenze delle frequenze genotipiche.

Possibili combinazioni genotipiche: **AB, AC, AD, CB, CD, BD**

2 INTERPRETAZIONE QUANTITATIVA BAYESIANA O CONTINUA

EuroForMix

STRmix

Per il **modello continuo** alcune combinazioni genotipiche che si possono generare dalla mistura sono quantitativamente più probabili di altre.

$$\text{POI 1 (AB)} \quad \text{PhR} = \frac{980}{1000} = \mathbf{0,98}$$

$$\text{POI 2 (AC)} \quad \text{PhR} = \frac{100}{1000} = \mathbf{0,1}$$

$$\text{POI 3 (AD)} \quad \text{PhR} = \frac{85}{1000} = \mathbf{0,085}$$

Combinazioni genotipiche più probabili: **AB, CD**

MISTURE APLOIDI DI DNA MASCHILE

Mistura biologica di DNA analizzata mediante marcatori aploidi del **cromosoma Y**:

- L'elaborazione di metodi di interpretazione di questa evidenza è in **grave ritardo** rispetto ai molto più sviluppati metodi qualitativo/quantitativo autosomici

- **Nessun software** è ancora disponibile per facilitare l'interpretazione di tale evidenza

PERCHÉ È DIFFICILE INTERPRETARE LE MISTURE DI DNA MASCHILE?

- Ottenere veri **campioni random** da una popolazione per studiare le frequenze degli aplotipi Y è molto **difficile**
- Un modello **unico** di stima delle **frequenze aplotipiche non esiste** («*Counting Method*» con o senza applicazione della «*K Correction*», Distribuzione Discreta, Simulazioni)
- Combinare coppie, triplette, quadriplette di **aplotipi** è molto più **complesso** che combinare coppie triplette e quadriplette di **genotipi singoli**
- Molti **aplotipi** generati da una potenziale deconvoluzione **non** sono poi **rinvenuti** nelle indagini popolazionistiche disponibili e **potrebbero non esistere**
- La costruzione di **LR Bayesiani** quantitativi basati su dati di misture Y provenienti da molti loci richiede un **potere di calcolo** che **eccede** la capacità dei personal/home computers esistenti

FINALITÀ DEL PROGETTO

- Ottenere veri **campioni random** da una popolazione per studiare le frequenze degli aplotipi Y è molto **difficile**

- Un modello **unico** di stima delle **frequenze aplotipiche non esiste** («*Counting Method*» con o senza applicazione della «*K Correction*». Distribuzione discreta di Laplace. Simulazioni)

1) Combinare coppie, triplette, quadriplette di **aplotipi** fino ad un massimo equivalente alla collezione di **10 genotipi**

coppie triplette e quadriplette di **genotipi** singoli

- Molti **aplotipi** generati da una potenziale deconvoluzione **non** sono poi **rinvenuti** nelle indagini popolazionistiche disponibili e **potrebbero non esistere**

2) Costruire **LR Bayesiani** quantitativi basati su:

- Due indici quantitativi originali (**il-PhR; Chi Quadrato della MR**)
- **Dati di popolazione** basati su frequenze ottenute mediante la «**Correzione K**»

MATRICE E CALCOLI

1

Obbiettivo 1:
Combinazione di n loci Y in misture a due contributori

Locus	Aplotipo contributore 1	Altezza picco (RFU)	Aplotipo contributore 2	Altezza picco (RFU)
DYS576	A	***	M	***
DYS389II	B	***	N	***
DYS627	C	***	O	***
DYS458	D	***	P	***
DYS19	E	***	Q	***
DYS448	F	***	R	***
DYS391	G	***	S	***
DYS390	H	***	T	***
DYS438	I	***	U	***
DYS392	L	***	V	***

N. loci	Possibili APLOTIPI	APLOTIPO contributore 1	APLOTIPO contributore 2
2	4	A,B	M,N
		A,N	M,B
		M,B	A,N
		M,N	A,B
3	8	A,B,C	M,N,O
		A,B,O	M,N,C
		A,N,C	M,B,O
		A,N,O	M,B,C
		M,B,C	A,N,O
		M,B,O	A,N,C
		M,N,C	A,B,O
		M,N,O	A,B,C
4	16	A,B,C,D	M,N,O,P
		A,B,C,P	M,N,O,D
		A,B,O,D	M,N,C,P
		A,B,O,P	M,N,C,D
		A,N,C,D	M,B,O,P
		A,N,C,P	M,B,O,D
		A,N,O,D	M,B,C,P
		M,B,C,P	A,N,O,D
		M,B,O,D	A,N,C,P
		M,B,O,P	A,N,C,D
		M,N,C,D	A,B,O,P
		M,N,C,P	A,B,O,D
		M,N,O,D	A,B,C,P
		M,N,O,P	A,B,C,D
5	32		...
6	64		...
7	128		...
8	256		...
9	512		...
10	1024		...

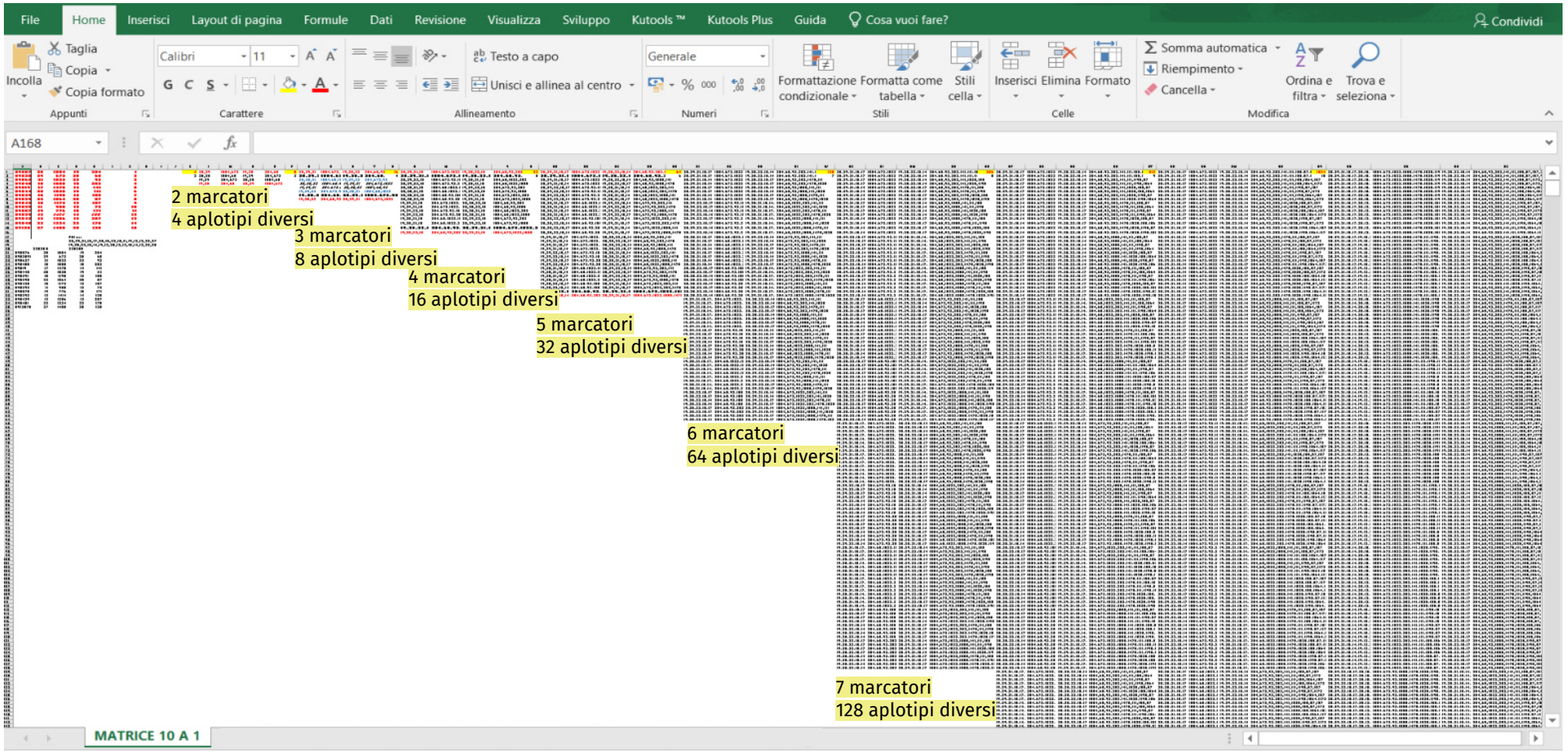
Stati di deconvoluzione : 2^n

2^{10} = **1024** stati di deconvoluzione

2^{23} = **8.388.608** stati di deconvoluzione

MATRICE E CALCOLI

1



8 marcatori
256 aplotipi diversi

9 marcatori
512 aplotipi diversi

10 marcatori
1024 aplotipi diversi

MATRICE E CALCOLI

Obbiettivo 2:
Costruire LR Bayesiani quantitativi basati su due **indici quantitativi** originali (**il-PhR**; **Chi Quadrato della MR**)

INDICI QUANTITATIVI per calcolo LR

il-PhR

Internal locus – Peak Height Ratio

- Al netto degli artefatti PCR, i **picchi** che appartengono allo stesso contributore nella mistura (aplotipo) hanno sempre la stessa quantità

MR

Mix Ratio

- Gli **individui** che contribuiscono ad una mistura Y si mescolano ad ogni locus conservando uguale proporzioni quantitative

Trovare il più alto il-PhR e la più omogenea MR equivale a risolvere la mistura

MATRICE E CALCOLI

2b

Obbiettivo 2:
Costruire LR Bayesiani quantitativi basati su dati di popolazione basati su **frequenze** ottenute mediante la «**Correzione K**»

Calcolo FREQUENZE APLOTIPICHE Y

Counting Method

Prevede la ricerca di un determinato aplotipo all'interno di un database di riferimento di dimensione **N**, per determinare il numero di volte **n** che l'aplotipo viene osservato nel database

$$Frequenza\ aplotipo = \frac{\boldsymbol{n}}{\boldsymbol{N}}$$

Correction K

Quando l'aplotipo non è contenuto nel database di riferimento di dimensione **N**, esso viene **aggiunto** sia alle osservazioni che al database

$$Frequenza\ aplotipo = \frac{\boldsymbol{n+1}}{\boldsymbol{N+1}}$$

MATRICE E CALCOLI

Obbiettivo 2:
Costruire LR Bayesiani quantitativi (due contributori, 10 loci)

Numeratore: POI

Denominatore: 1024 aplotipi, compreso il POI

$$LR = \frac{\boldsymbol{frequenza\ aplotipica\ *il-PhR\ *indicatore\ MR\ dell'aplotipo\ POI}}{\boldsymbol{frequenza\ aplotipica\ *il-PhR\ *indicatore\ MR\ di\ 1024\ aplotipi}}$$

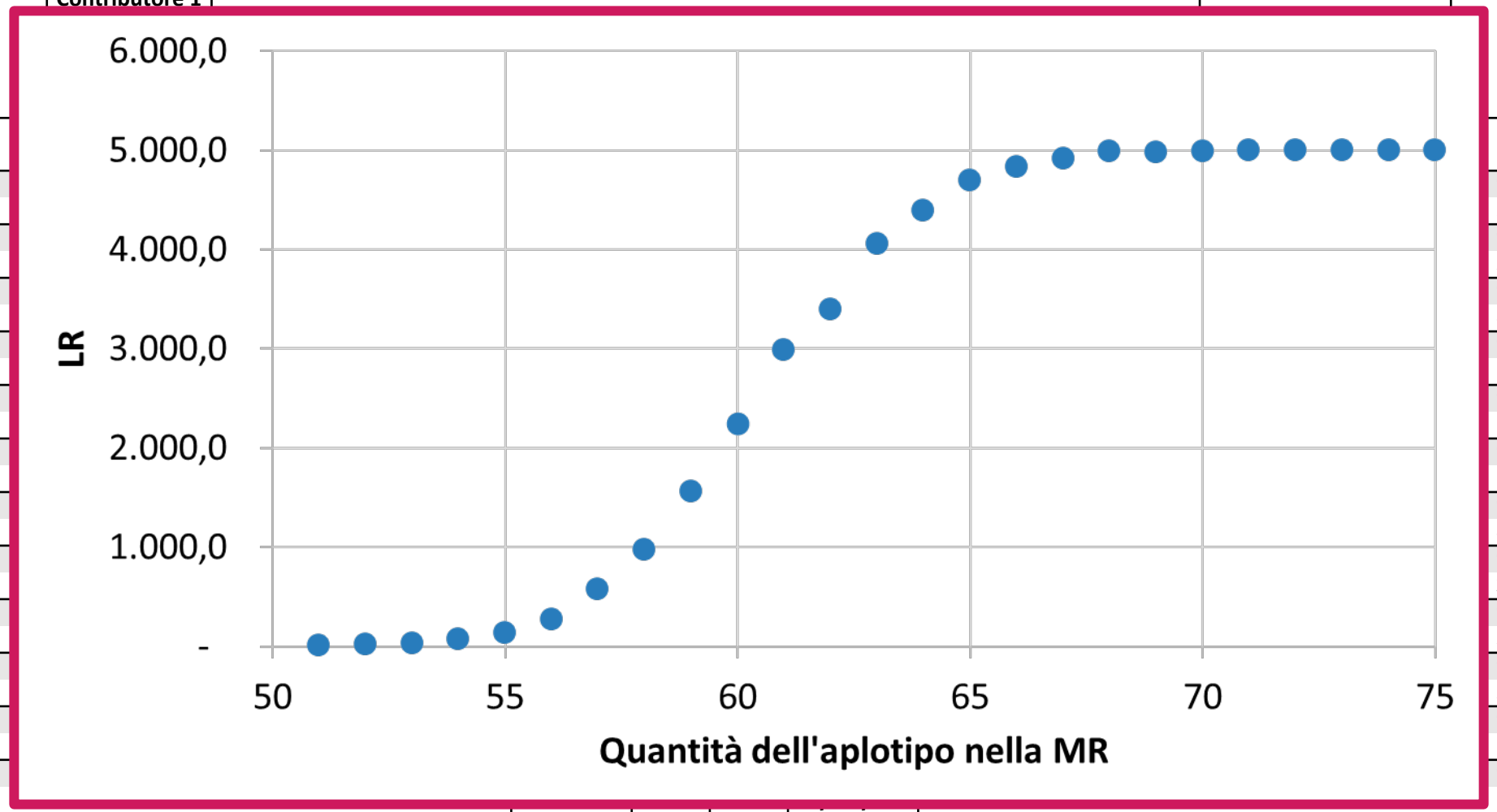
INFLUENZA DELL'ANALISI QUANTITATIVA SU LR

- In condizioni di **equilibrio quantitativo** di aplotipi aploidi, tutte le soluzioni combinatorie sono **equiprobabili** e vi è **incertezza** sulla presenza/assenza dei POI come contributori all'interno dell'evidenza mista. Una mistura bilanciata tende a **LR=1**

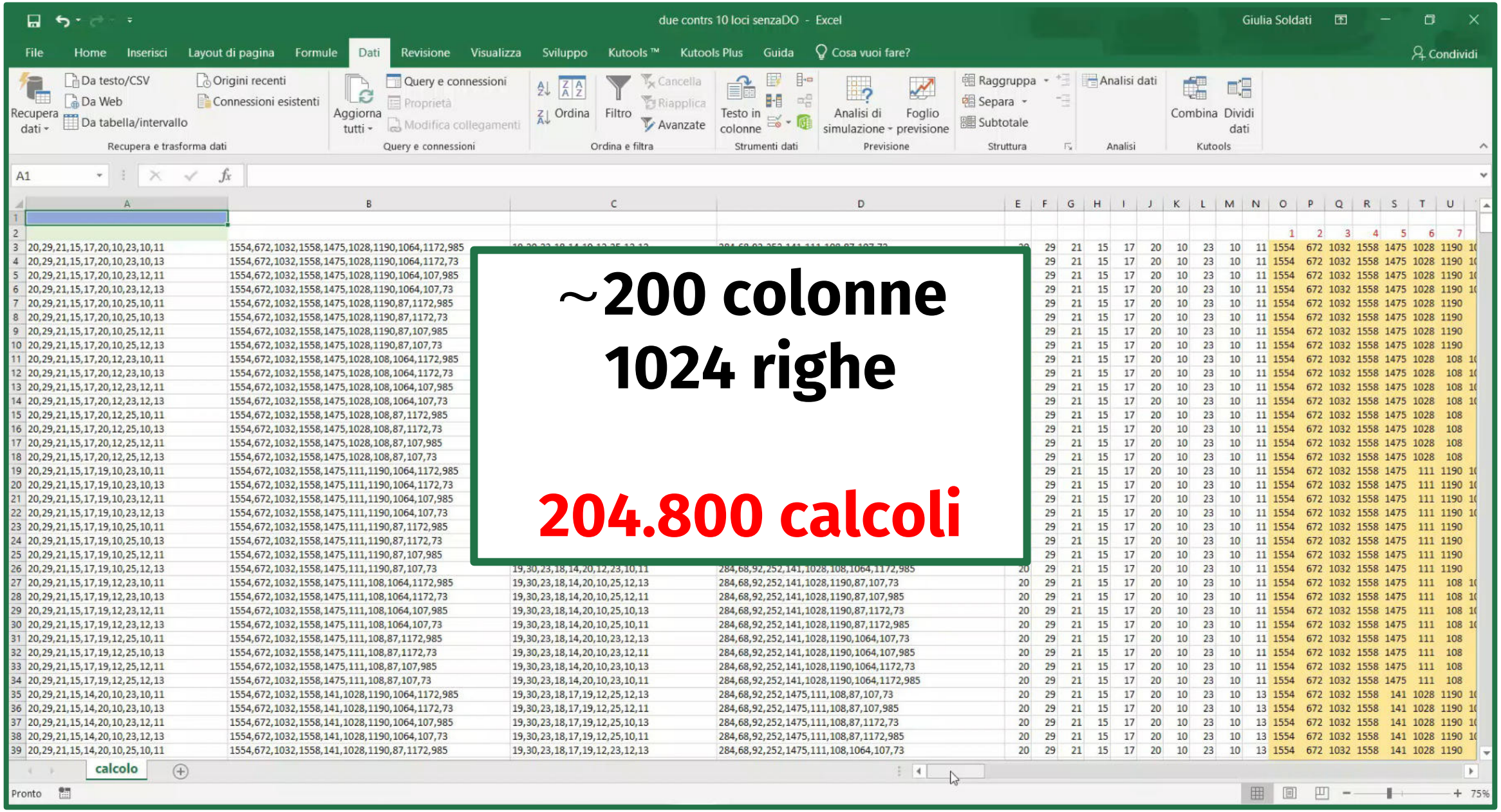
- Le misture che presentano **squilibrio quantitativo** tra i contributori sono **facilmente interpretabili (LR>1)**

- Il valore massimo dell'evidenza (WoE) estraibile da misture in squilibrio quantitativo **non può mai essere superiore** al valore dell'evidenza deducibile dalla traccia singola (single source) (**WoE** $_{mix} \leq \frac{1}{Freq\ aplotipica}$)

	DYS576	DYS389II	DYS627	DYS458	DYS19	DYS448	DYS391	DYS390	DYS438	DYS392	
	Alleli										Freq. Aplotipo
Aplotipo Contributore 1	20	29	21	15	17	20	10	23	10	11	1/5000



Aplotipo 1	1554	672								985	65	4692,2
Aplotipo 2	1538	665								528	35	
Aplotipo 1	1554	672								985	66	4831,1
Aplotipo 2	1493	645								506	34	
Aplotipo 1	1554	672								985	67	4913,1
Aplotipo 2	1434	620								482	33	
Aplotipo 1	1554	672								985	68	4988,9
Aplotipo 2	1398	604								421	32	
Aplotipo 1	1554	672								985	69	4976
Aplotipo 2	1320	571								441	31	
Aplotipo 1	1554	672								985	70	4988,9
Aplotipo 2	1271	550								421	30	
Aplotipo 1	1554	672								985	71	4995,3
Aplotipo 2	1221	528								403	29	
Aplotipo 1	1554	672								985	72	4998,3
Aplotipo 2	1165	504								384	28	
Aplotipo 1	1554	672								985	73	4999,4
Aplotipo 2	1125	486								364	27	
Aplotipo 1	1554	672								985	74	4998,8
Aplotipo 2	1079	466								346	26	
Aplotipo 1	1554	672								985	75	4999,9
Aplotipo 2	1035	447								329	25	
Aplotipo 1	1554	672								985	76	4999,(9)
Aplotipo 2	993	429								310	24	
Aplotipo 1	1554	672	1032	1558	1475	1028	1190	1064	1172	985	62	3400,5
Aplotipo 2	1041	409	628	948	898	626	724	647	713	599	38	
Aplotipo 1	1554	672	1032	1558	1475	1028	1190	1064	1172	985	63	4059,2
Aplotipo 2	916	396	608	919	870	606	702	627	691	581	37	
Aplotipo 1	1554	672	1032	1558	1475	1028	1190	1064	1172	985	64	4395,9
Aplotipo 2	878	379	583	880	833	580	672	601	662	556	36	
Aplotipo 1	1554	672	1032	1558	1475	1028	1190	1064	1172	985	77	4999,(9)
Aplotipo 2	466	201	309	467	442	308	357	319	351	295	23	
Aplotipo 1	1554	672	1032	1558	1475	1028	1190	1064	1172	985	78	4999,(9)
Aplotipo 2	438	189	291	439	415	289	335	300	330	277	22	


due contrs 10 loci senzaDO - Excel
Giulia Soldati
~200 colonne
1024 righe
204.800 calcoli
calcolo
Pronto

OBBIETTIVI FUTURI

- Ultimare questo prototipo di calcolo dell'LR basato sull'interpretazione Bayesiana quantitativa anche in presenza di effetti stocastici come **drop-out allelici** nell'aplotipo di uno o entrambi i contributori

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano:

- Il **Prof. V.L. Pascali**, PI del presente lavoro che fa parte di un progetto generale che mira alla realizzazione di sistemi di calcolo Bayesiano quantitativo per misture Y-STRs

- La **Prof.ssa S. Turrina** e il **Prof. D. De Leo**, che seguono quotidianamente la mia formazione, supportandomi anche nei progetti collaborativi che si sono concretizzati in diversi soggiorni di studio presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore, Dipartimento di Sicurezza e Bioetica, Sezione di Medicina Legale, Roma

GRAZIE PER L' ATTENZIONE

Giulia Soldati

Dipartimenti di Diagnostica e Sanità Pubblica
Medicina Legale, Laboratorio di Genetica Forense
Università degli Studi di Verona

giulia.soldati_02@univr.it

XXIX CONGRESSO NAZIONALE GEFI
Messina, 9-11 novembre 2023

IL RUOLO INFORMATIVO DELLA AUTOPSIA MOLECOLARE NELLA RICOSTRUZIONE DELLE CAUSE DETERMINANTI IL DECESSO PERINATALE E DEL PRODOTTO DEL CONCEPIMENTO PER UN CORRETTO COUNSELING GENETICO

M.F. Astorino[1]; A.P. Capra[1]; V. Greco[1]; V. Vacirca[1]; R.M. Mongiovì[1]; R.E. Amodeo[1]; M.A. La Rosa[2]; A. Micalizzi[3]; C. Cesareo[3]; M. Rinelli[3]; A. Novelli[3]; E. Esposito[2]; S. Briuglia[2]

[1]Università di Messina

[2]U.O.S.D. Policlinico Universitario di Messina

[3]U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma

- INTERRUZIONE DI GRAVIDANZA
- MORTALITÀ PERINATALE
- NATIMORTALITÀ

AUTOPSIA MOLECOLARE

PRIMO CASO

Diagnosi prenatale

- Onfalocele occipitale
- Ventricolomegalia
- Aumento del volume dei reni
- Anomalia degli arti

Autopsia fetale

- Reni policistici bilaterali
- Polidattilia mani e piedi
- Sospetta sindrome di Meckel-Gruber

Dott.ssa Maria Francesca Astorino

Autopsia molecolare

Varianti patogenetiche nel gene *CC2D2A* associate a sindrome Meckel 6, Joubert 9 o COACH ciliopatie a trasmissione autosomica recessiva

ORPHA:564

Livello di Classificazione: Malattia

Sinonimo/i :

Disencefalia splancnocistica

Sindrome di Meckel-Gruber

Prevalenza: <1 / 1 000 000

Trasmissione: Autosomica recessiva

Età di esordio: Prenatale

ICD-10: Q61.9

ICD-11: LD2F.13

OMIM: 249000 267010 603194 607361 609345 611134 611561 612284 613885 614209 615397 616258 617562 619879

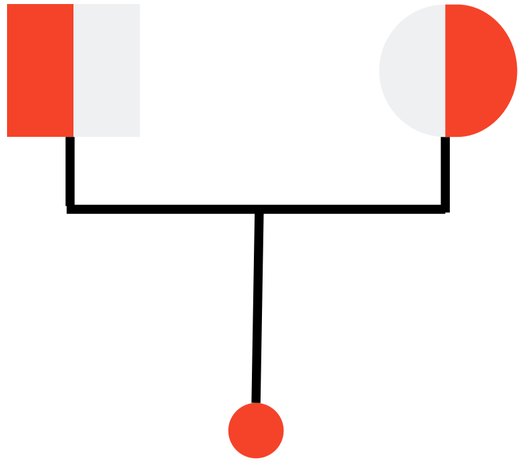
UMLS: C0265215

MeSH: -

GARD: 3436

MedDRA: -

c.[4255delG];[*]
p.(Gly1419Aspfs*9)
rs772110399
classe 5
0.000004026 (gnomAD)



c.[3763C>T];[*]
p.(Arg1255*)
rs1271825377
classe 5
0.000006664 (gnomAD)

NM_001080522(CC2D2A) c.[3763C>T];[4255delG] p.[(Arg1255*)];[(Gly1419Aspfs*9)]

Radhakrishnan P, Nayak SS, Shukla A, Lindstrand A, Girisha KM. Meckel syndrome: Clinical and mutation profile in six fetuses. Clin Genet. 2019 Dec;96(6):560-565. doi: 10.1111/cge.13623. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31411728.

SECONDO CASO

Esame dismorfologico

- Cute lucida con chiazze di eritrodermia
- Aspetto ittiosico
- Assenza annessi cutanei
- Bolla aperta al torace

Dott.ssa Maria Francesca Astorino

Autopsia molecolare

Due varianti del gene *ERCC2* associate a tricotiodistrofia di tipo 1 a trasmissione autosomica recessiva

ORPHA:33364

Livello di Classificazione: Malattia

Sinonimo/i : -

Prevalenza: Sconosciuto

Trasmissione: Autosomica recessiva o Recessiva legata all'X

Età di esordio: Infanzia, Neonatal

ICD-10: L67.8

ICD-11: EC21.1

OMIM: 234050 300953 601675 616390 616395 616943 618546 619691 61969

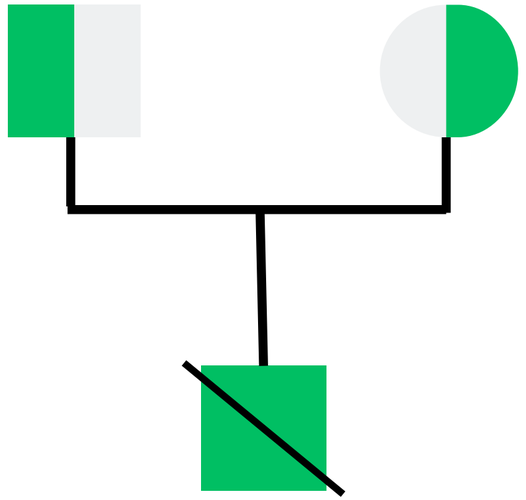
UMLS: C1955934

MeSH: D054463

GARD: 12109

MedDRA: 10044628

c.[316G>C];[*]
p.[(Gly106Arg)];[*]



c.[2164C>T];[*]
p.[(Arg722Trp)];[*]

c.[316G>C];[2164C>T]
p.[(Gly106Arg)];[(Arg722Trp)]

Lund EB, Stein SL. Novel ERCC2 mutation in two siblings with trichothiodystrophy. Pediatr Dermatol. 2019 Sep;36(5):668-671. doi: 10.1111/pde.13882. PMID: 31282071.

TERZO CASO

Esame dismorfologico

- Dolicocefalia
- Palato ogivale
- Sindattilia II-III e IV dito dei piedi bilaterale
- Impianto basso delle orecchie
- Displasia renale
- Acidosi metabolica

Sospetto MADD tipo 2

ORPHA:26791

Livello di Classificazione: Malattia

Sinonimo/i :

Acidemia glutarica, tipo 2

Aciduria glutarica, tipo 2

Deficit di MAD

Deficit di flavoproteina trasportatrice di elettroni

Deficit di flavoproteina trasportatrice di elettroni ubichinone ossidoreduttasi

MADD

Prevalenza: 1-9 / 1 000 000

Trasmissione: Autosomica recessiva

Età di esordio: Qualsiasi età

ICD-10: E71.3

ICD-11: 5C52.01

OMIM: 231680

UMLS: C0268596

MeSH: D054069

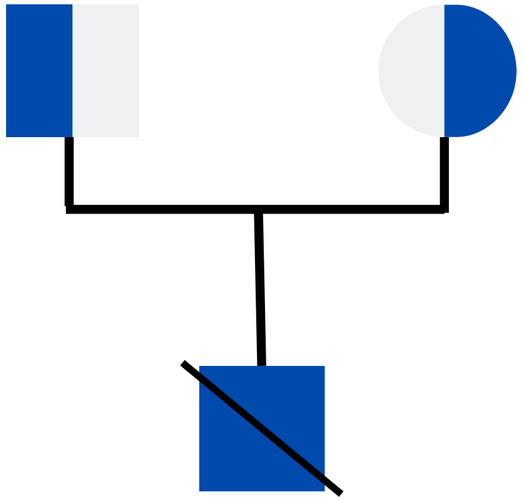
GARD: 6523

MedDRA: -

Autopsia molecolare

Variante in omozigosi del gene *ETFDH* associata a deficit multiplo di acil-CoA deidrogenasi a trasmissione autosomica recessiva

c.[606+1_606+2insT];[*]
p.[(?)];[*]



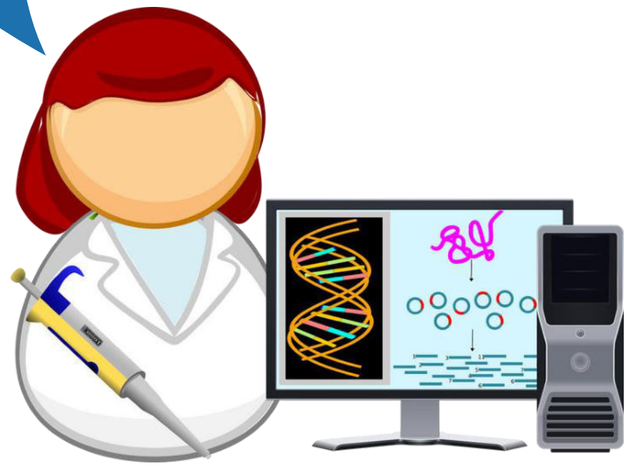
c.[606+1_606+2insT];[*]
p.[(?)];[*]

NM_004453.3 (ETFDH): c.[606+1_606+2insT];[606+1_606+2insT]; p.[(?)];[(?)]

Chen W, Zhang Y, Ni Y, Cai S, Zheng X, Mastaglia FL, Wu J. Late-onset riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD): case reports and epidemiology of ETFDH gene mutations. BMC Neurol. 2019 Dec 18;19(1):330. doi: 10.1186/s12883-019-1562-5. PMID: 31852447; PMCID: PMC6921586.

XXIX CONGRESSO NAZIONALE GEFI
Messina, 9-11 novembre 2023

TAKE HOME MESSAGE



L'autopsia molecolare offre un valido supporto per l'individuazione degli eventi determinanti il decesso e l'exitus sfavorevole della gravidanza

GRAZIE

Grazie

UniMe
1548

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
Tradizione e cambiamento al centro del Mediterraneo

Ge.F.I.

29° CONVEGNO NAZIONALE DEI GENETISTI FORENSI ITALIANI

L'impatto della farmacogenetica nei pazienti oncologici candidati a chemioterapia a base di fluoropirimidine e irinotecano: prospettive future.

AP Capra, D Giosa, M Bulzomì, A Moschella, F De Luca, A Ardizzone, O Romeo, N Silvestris, E Esposito

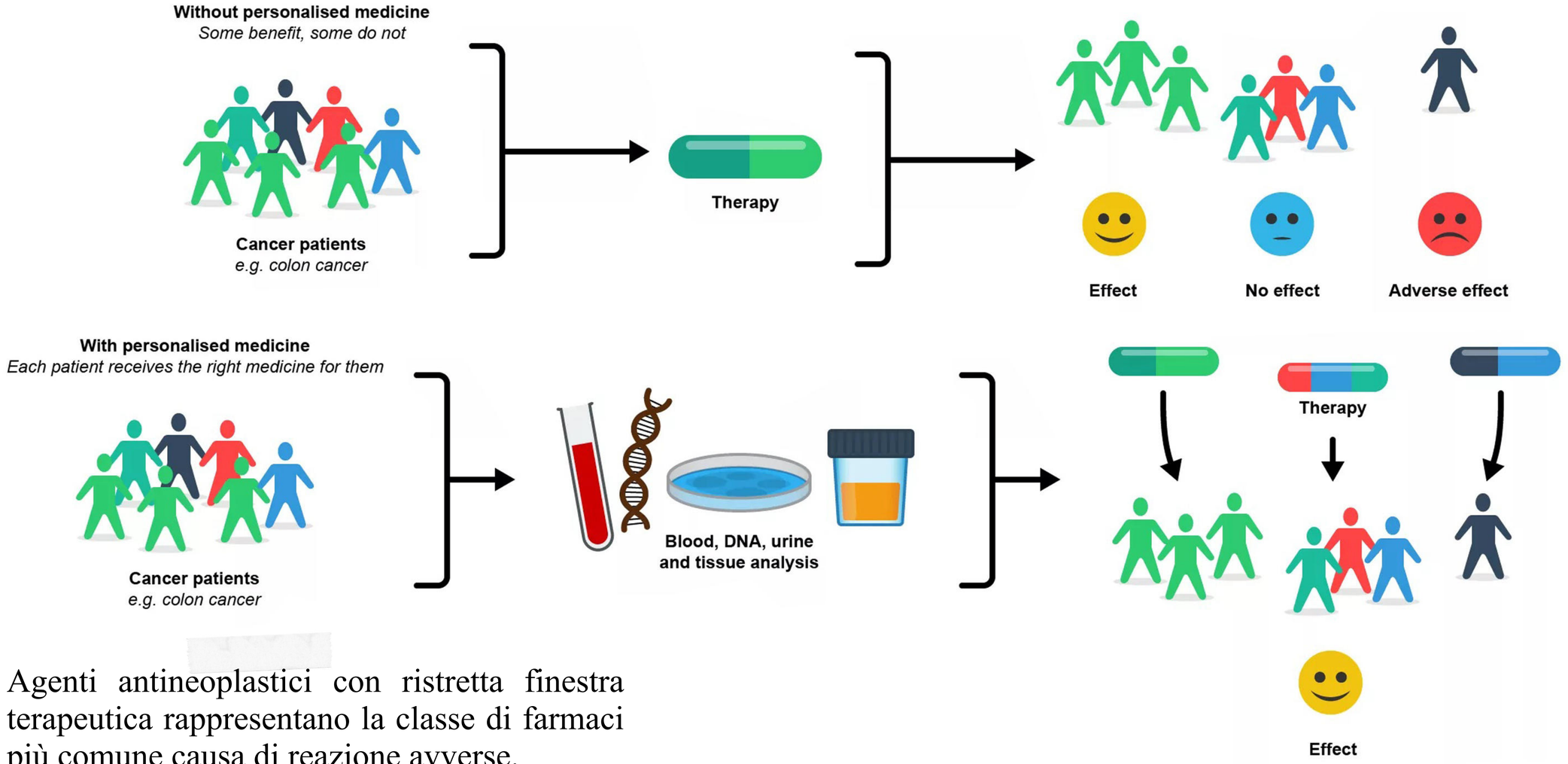
annapaola.capra@unime.it

MESSINA, 9-11 NOVEMBRE 2023

AULA MAGNA UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Test di farmacogenetica

Riguardano le analisi finalizzate all'identificazione di variazioni di sequenza nel DNA in grado di predire la ***risposta «individuale» ai farmaci***, in termini di efficacia e di rischio relativo di eventi avversi (***TPMT***, tiopurina S-metiltransferasi per il metabolismo dei farmaci tiopurinici).



Agenti antineoplastici con ristretta finestra terapeutica rappresentano la classe di farmaci più comune causa di reazione avverse.

ADR problema di salute pubblica globale

In Europa ~ 197000 morti/anno sono dovute ad ADR

Comportano un aumento significativo dei costi sanitari in quanto possono portare ad ospedalizzazione o prolungamento del ricovero, effettuazione di esami aggiuntivi, somministrazione di terapie per il trattamento di segni e sintomi causati da ADR.

40-60% delle ADR è giudicata evitabile

ADR in PS REGIONE LOMBARDIA (2020/21) Totale ADR: 8983

45.9% gravi, di cui 14.9% richiedenti ricovero, e 9.7% fatali Costo totale: € 5 203 942

ADR evitabili (probabilmente/certamente): 41.7% (58% del costo totale)

ADR in REGIONE SICILIA (2020) Totale ADR: 2535 (2021) Totale ADR: 6409

23% gravi, di cui 22% richiedenti ricovero, e 3.15% fatali

EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

13 March 2020
EMA/125891/2020

New testing and treatment recommendations for fluorouracil, capecitabine, tegafur and flucytosine

EMA's safety committee (PRAC) has recommended that patients should be tested for the lack of an enzyme called dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) before starting cancer treatment with medicines containing fluorouracil given by injection or infusion (drip) and the related medicines capecitabine and tegafur, which are converted to fluorouracil in the body.

As treatment for severe fungal infections with flucytosine (another medicine related to fluorouracil) should not be delayed, testing patients for DPD deficiency before they start treatment is not required.

No pre-treatment testing is needed for patients treated with topical fluorouracil (applied to the skin to treat various skin conditions).

Lack of a working DPD enzyme,[1] which is needed to break down fluorouracil, causes fluorouracil to build up in the blood. This may lead to severe and life-threatening side effects such as neutropenia (low levels of neutrophils, a type of white blood cells needed to fight infection), neurotoxicity (damage to the body's nervous system), severe diarrhoea and stomatitis (inflammation of the lining of the mouth).

The PRAC assessed the available data and recommended the following measures to ensure the safe use of fluorouracil and fluorouracil-related medicines:

Fluorouracil, capecitabine and tegafur

Testing of patients for DPD deficiency is recommended before starting treatment with fluorouracil injection or infusion, capecitabine and tegafur. This can be done by measuring the level of uracil (a substance broken down by DPD) in the blood, or by checking for the presence of certain mutations (changes) in the gene for DPD which are associated with an increased risk of severe side effects. Relevant clinical guidelines should be taken into consideration.

Patients with a known complete DPD deficiency must not be given fluorouracil injection or infusion, capecitabine or tegafur, as a complete lack of working DPD puts them at higher risk of severe and life-threatening side effects.

For patients with a partial DPD deficiency, a reduced starting dose of these medicines should be considered; since the effectiveness of a reduced dose has not been established, following doses may

[1] Up to 8% of the Caucasian population have low levels of a working DPD enzyme, and up to 0.5% completely lack the enzyme.

Official address Domenico Scarlattilaan 6 ● 1083 HS Amsterdam ● The Netherlands
Address for visits and deliveries Refer to www.ema.europa.eu/how-to-find-us
Send us a question Go to www.ema.europa.eu/contact **Telephone** +31 (0)88 781 6000 An agency of the European Union

© European Medicines Agency, 2020. Reproduction is authorised provided the source is acknowledged.

Raccomandazioni 2019
per analisi
farmacogenetiche

Ottobre 2019

RACCOMANDAZIONI
PER ANALISI
FARMACOGENETICHE

A cura del Gruppo di Lavoro di AIOM - SIF

Nel 2019 il gruppo di lavoro AIOM-SIF ha redatto le linee-guida per l'analisi farmacogenetica dei geni *DPYD* e *UGT1A1*.

Nel documento l'analisi molecolare delle varianti dei due geni viene raccomandata:

1. In pre-terapia con fluoropirimidine (5-FU, capecitabina, tegafur) o irinotecano
2. Durante la terapia nei pazienti che abbiano manifestato tossicità.

DPYD

Per quanto riguarda il *DPYD*, sia le linee-guida di AIOM-SIF sia quelle del Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) raccomandano di analizzare le seguenti varianti:

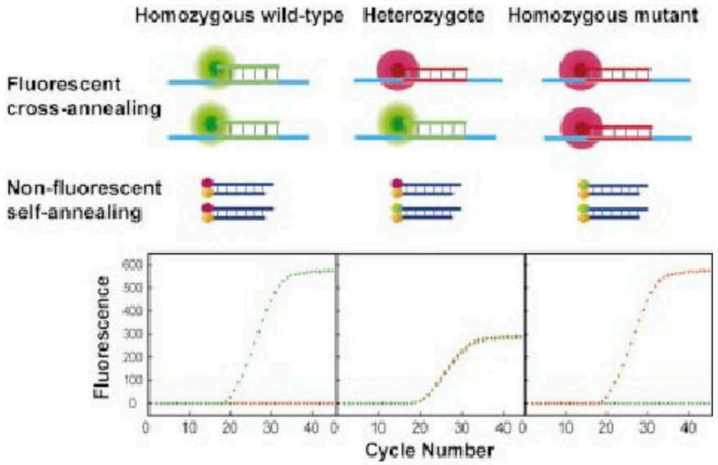
DPYD*2A (IVS14+1G>A, c.1905+1G>A, rs3918290)

DPYD*13 (c.1679T>G, rs55886062)

c.2846A>T (rs67376798)

c.1236G>A (rs56038477)

[*2194G>A (rs1801160)]



Tali varianti sono chiamate non-funzionali in quanto portano ad una ridotta o nulla attività della diidropirimidina deidrogenasi (DPD), il principale enzima responsabile del catabolismo del fluorouracile. Pertanto i pazienti oncologici che presentano l'allele mutato di queste varianti rischiano di incorrere in una severa, a volte letale, tossicità se trattati con fluoropirimidine (5-Fluorouracile, capecitabina, tegafur).

LINEE GUIDA NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

Genotipo DPYD		Dose di fluoropirimidine consigliata
Wild-type	c.1236GG	100%
	c.1679TT	
	c.1905+1GG	
	c.2846AA	
	*c.2194GG	100%
Eterozigote	c.1236GA	75%
	c.1679TG	50%
	c.1905+1GA	
	c.2846AT	
	*c.2194GA	85%
Omozigote mutato	c.1236AA	50%
	c.1679GG	Trattamento con fluoropirimidine da evitare
	c.1905+1AA	
	c.2846TT	
	*c.2194AA	70%

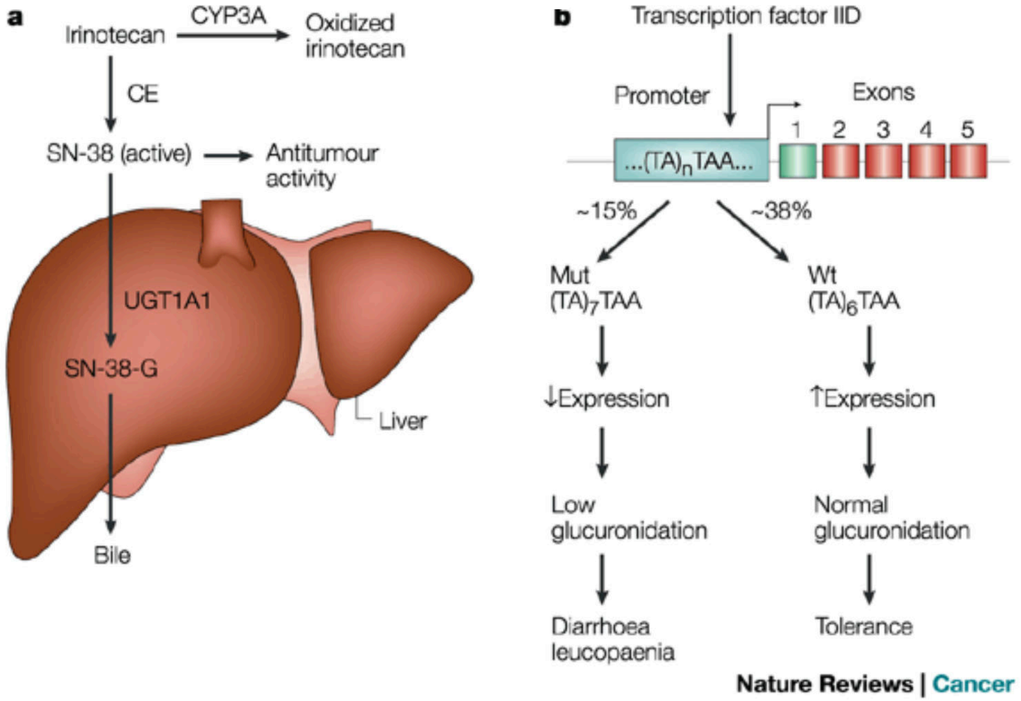
CPIC

Phenotype	Implications for phenotypic measures	Dosing recommendations	Classification of recommendations[b]
DPYD normal metabolizer	Normal DPD activity and "normal" risk for fluoropyrimidine toxicity.	Based on genotype, there is no indication to change dose or therapy. Use label-recommended dosage and administration.	Strong
DPYD intermediate metabolizer	Decreased DPD activity (leukocyte DPD activity at 30% to 70% that of the normal population) and increased risk for severe or even fatal drug toxicity when treated with fluoropyrimidine drugs.	Reduce starting dose based on activity score followed by titration of dose based on toxicity[c] or therapeutic drug monitoring (if available). **Activity score 1:** Reduce dose by 50% **Activity score 1.5:** Reduce dose by 25% to 50%	**Activity score 1:** Strong **Activity score 1.5:** Moderate
DPYD poor metabolizer	Complete DPD deficiency and increased risk for severe or even fatal drug toxicity when treated with fluoropyrimidine drugs.	**Activity score 0.5:** Avoid use of 5-fluorouracil or 5-fluorouracil prodrug-based regimens. In the event, based on clinical advice, alternative agents are not considered a suitable therapeutic option, 5-fluorouracil should be administered at a strongly reduced dose[d] with early therapeutic drug monitoring.[e] **Activity score 0:** Avoid use of 5-fluorouracil or 5-fluorouracil prodrug-based regimens.	Strong

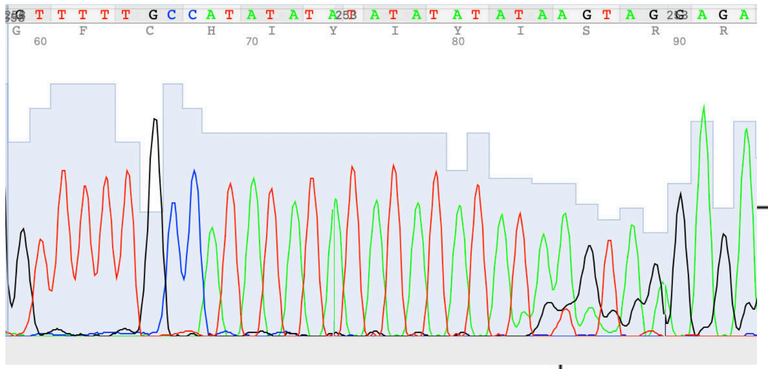
DPWG

ALLELE/GENOTYPE/PHENOTYPE	DRUG	RECOMMENDATION
Activity Score 0	fluorouracil/capecitabine	Avoid systemic and cutaneous 5-fluorouracil or capecitabine
Activity Score 1 to 1.5	fluorouracil/capecitabine	Initiate therapy with 50% of the standard dose of fluorouracil or capecitabine. Further titration of the dose is possible, guided by toxicity.
Activity Score 0, 1 or 1.5	tegafur with uracil/gimeracil/DPD inhibitors	Avoid tegafur
Activity Score 2	fluorouracil/capecitabine/tegafur	No dose adaptation
Activity Score Unclear	fluorouracil/capecitabine	Determine the DPD activity (phenotyping) and adjust the initial dose based on available data

UGT1A1



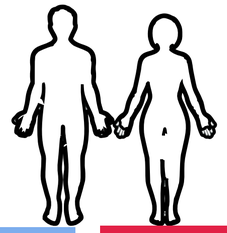
Per quanto riguarda l'*UGT1A1*, sia AIOM-SIF, sia un gruppo di lavoro francese comprendente il National Pharmacogenetics Network (RNPGx) e il Group of Clinical Onco-pharmacology (GPCO-Unicancer), sia il Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) raccomandano nelle proprie linee-guida di analizzare il polimorfismo UGT1A1*28 (rs8175347), che consiste nella variabilità del numero di ripetizioni (comunemente 6 o 7 nella popolazione Caucasica) del microsatellite TA nel promotore del gene associata a bassa attività trascrizionale e ridotta attività enzimatica, con conseguente grave tossicità gastrointestinale ed ematologica nei pazienti trattati con irinotecano.



Genotipo UGT1A1		
Wild-type	6/6	100%
Eterozigote	6/7	100%
Omozigote mutato	7/7	70%

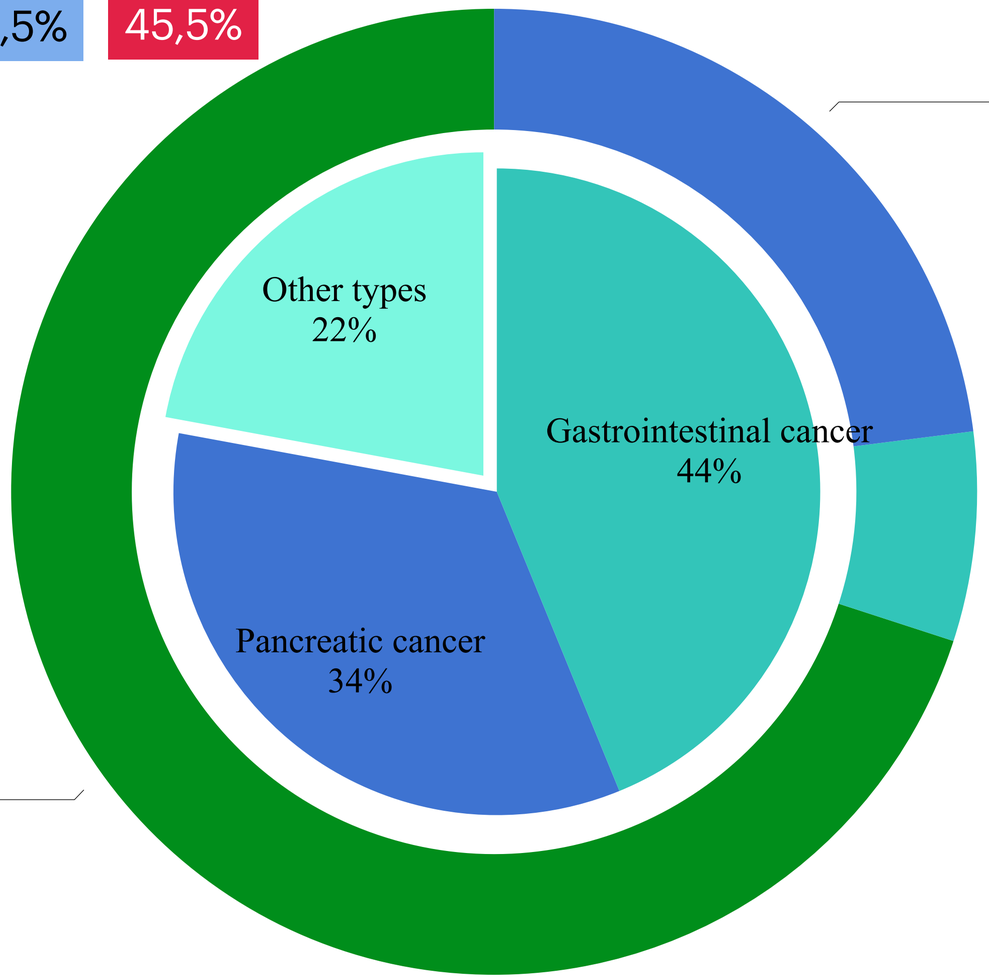
da Aprile 2022

Mean age
77.2 years



207 pazienti

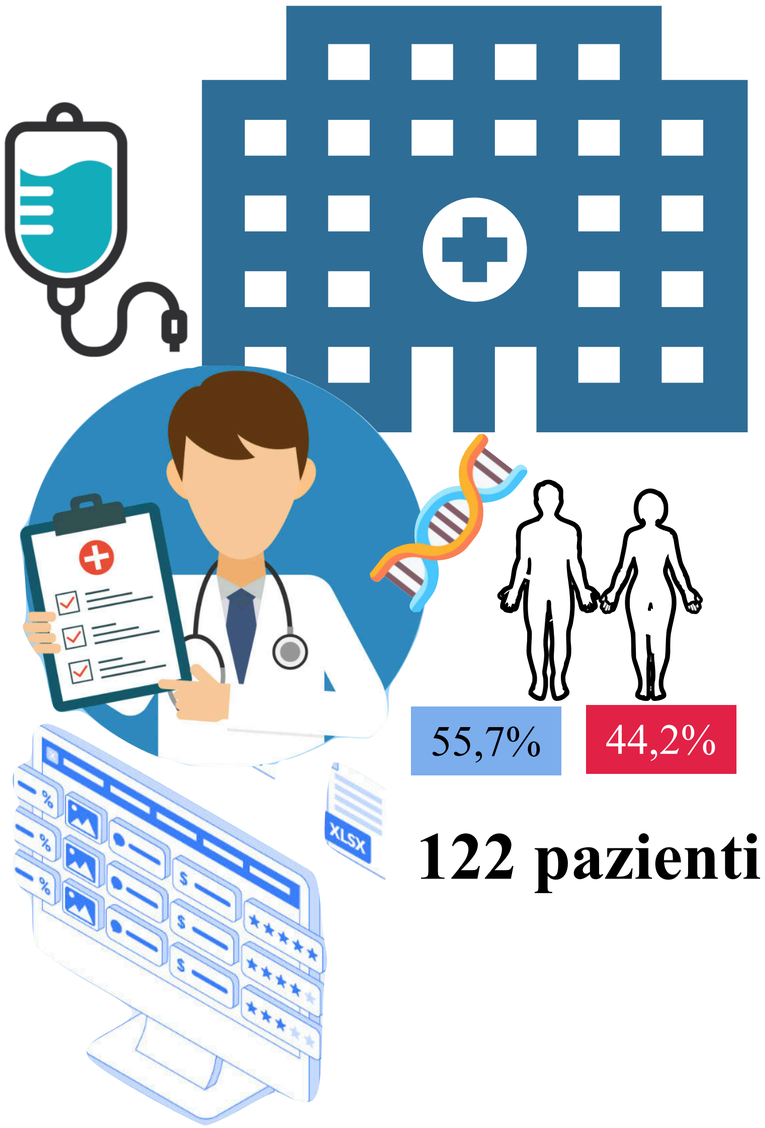
54,5% | 45,5%



DPYD
23%

UGT1A1
7%

both
70%



55,7% | 44,2%

122 pazienti

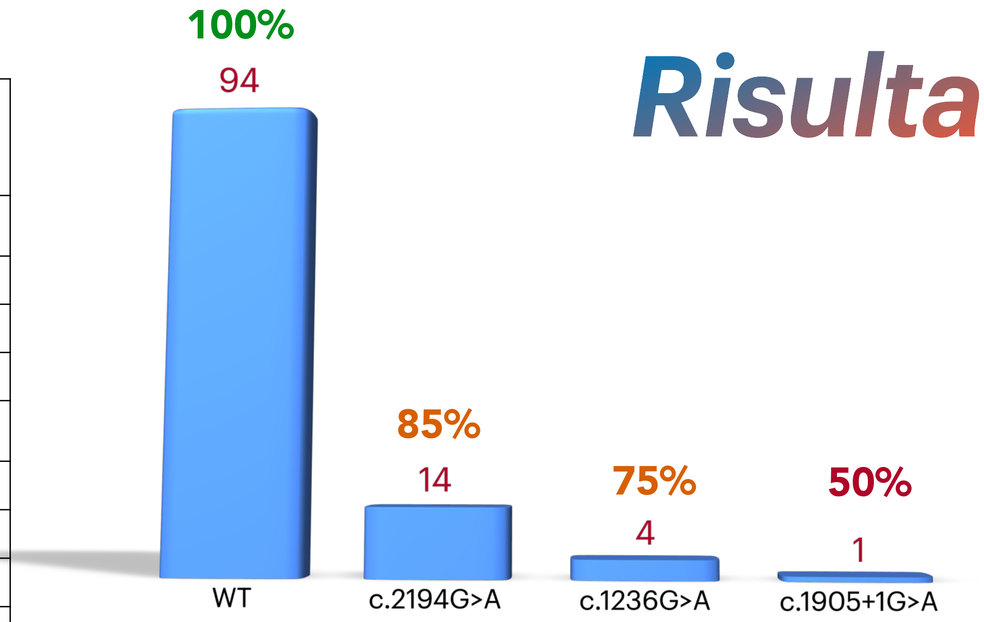
UOSD GENETICA E FARMACOGENETICA
Direttore: Prof.ssa Emanuela Esposito

Risultati

23%

indicata riduzione di dose

GENOTIPO DPYD	DPYD variant allele carriers (n=19)	Wild-Type patients (n=94)
Sex		
Male	11	51
Female	8	43
Age, years	67,2	64,8
Tumor Type		
Colorectal cancer	9	57
Pancreatic cancer	6	21
Gastric cancer	2	6
Other	2	10
Treatment regimen without Fluoropyrimidines	4	13



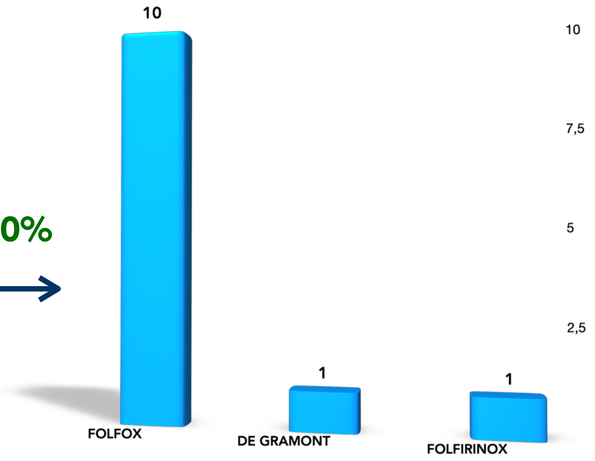
ADR in pazienti WT

Linee guida SIGU

GENOTIPO *UGT1A1*	N Pazienti
$(TA)_6/(TA)_6$	53
$(TA)_6/(TA)_7$	34
$(TA)_7/(TA)_7$	12
Totale	99

Treatment regimen without Irinotecan	79

30%



PAZIENTE 1777

Maschio
57 anni
Tumore al pancreas
Parkinson
DPYD wild type
UGT1A1 (TA)6/(TA)6

PRIMO CICLO x infusione

FOLFIRINOX

FOlinic acid

Leucovorine

Fluorouracile

IRINotecan

OXaplatine

DIARRHEA 4

NAUSEA/VOMITING 3

STOMATITIS 3

NEUTROPENIA 3

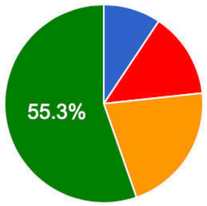
THROMBOCYTOPENIA 3

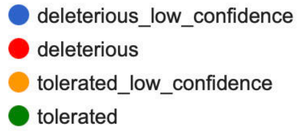
ANEMIA 3

ESOMA

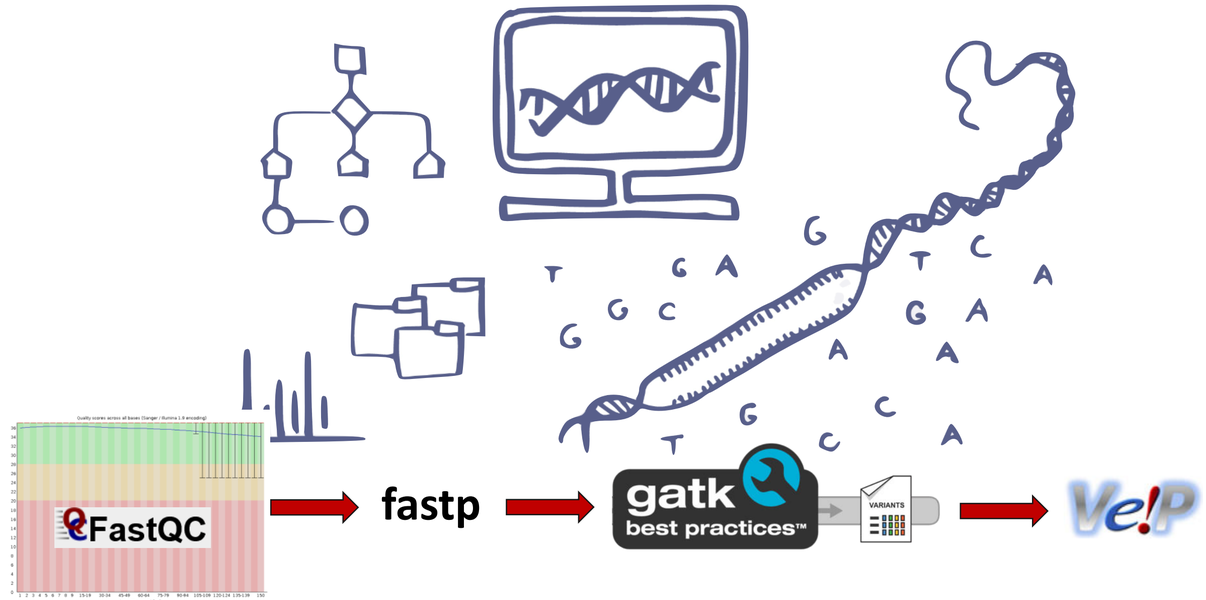
19436 geni (IDT xGen Exome v2) su piattaforma Illumina

674.326 SNPs e 134.416 INDELs





Prediction	Count
deleterious_low_confidence	3,358
deleterious	5,001
tolerated_low_confidence	7,667
tolerated	19,865



Analisi di qualità delle reads

Pulizia delle reads (Trimming)

Identificazione delle Varianti (Variant Calling)

Analisi funzionale delle Varianti e prioritizzazione

L’esistenza di discrepanze in termini di indicazioni tra le linee guida di farmacogenetica prodotte dalle diverse organizzazioni/enti regolatori ed il mancato inserimento della maggior parte di tali test nei LEA nazionali

	15, 16, 22. Qualunque metodo	
G3.01	RICERCA DI MUTAZIONI NOTE/POLIMORFISMI NOTI. Farmacogenetica dei geni del metabolismo dei farmaci: CYP2D6	€ 65,00
G3.02	RICERCA DI MUTAZIONI NOTE/POLIMORFISMI NOTI. Farmacogenetica dei geni del metabolismo dei farmaci: CYP2C19	€ 65,00
G3.03	RICERCA DI MUTAZIONI NOTE/POLIMORFISMI NOTI. FARMACOGENETICA IN ONCOLOGIA: UGT1A1	€ 65,00

La mancanza in alcuni casi di evidenze robuste che dimostrino la *costo-efficacia* dei test farmacogenomici

L’assenza di un solido supporto al clinico nel momento in cui deve scegliere se sottoporre il paziente al test farmacogenetico o interpretare il risultato dello stesso

Conclusioni

✓ *L'implementazione delle analisi farmacogenetiche contribuirà ad una riduzione dei costi sanitari con profilo costo-efficacia positivo.*

APPROPRIATEZZA PRESCRITTIVA

FARMACOVIGILANZA

✓ *Una ricerca mirata a sviluppare nuovi farmaci da somministrare ad individui che non rispondono o non possono assumere uno specifico trattamento;*

DRUG ACTIVITY Response - Resistance

DRUG TOXICITY

NEW DRUGS

✓ *SSN è pronto ad accogliere questo cambio di paradigma, sebbene la prescrizione deve essere perfezionata per garantire una piena applicazione sicura ed efficace.*

A 12-gene pharmacogenetic panel to prevent adverse drug reactions: an open-label, multicentre, controlled, cluster-randomised crossover implementation study

Lancet 2023; 401: 347–56

Grazie per la vostra attenzione

U.O.S.D. GENETICA E FARMACOGENETICA
PROF.SSA EMANUELA ESPOSITO
Prof.ssa Silvana Briglia
Dott.ssa Maria Angela La Rosa
Dort.ssa Chiara Di Bella
Dott. Antonino Moschella
Pazienti, infermieri e specializzandi

U.O.C. ONCOLOGIA MEDICA
PROF. NICOLA SILVESTRIS
Dott. Andrea Pollicino
Pazienti, infermieri e specializzandi

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE, FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI
PROF. ORAZIO ROMEO
Dott. Domenico Giosa
PROF.SSA EMANUELA ESPOSITO
Dott.ssa Maria Bulzomì
Dott.ssa Fabiola De Luca
Dott. Alessio Ardizzone

Supplementary

"È più importante conoscere che tipo di persona ha una malattia, piuttosto che conoscere il tipo di malattia che ha la persona"

...scrisse Ippocrate, più di 2500 anni fa

Drug toxic but beneficial

Drug toxic but NOT beneficial

Patient group

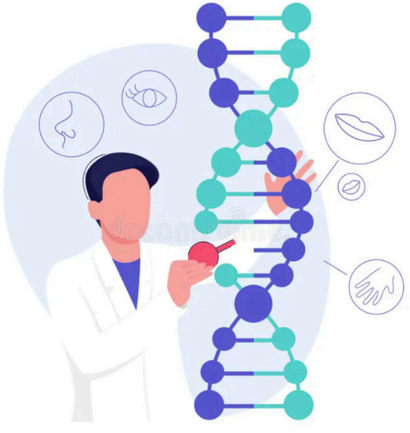
Drug NOT toxic and NOT beneficial

Drug NOT toxic but beneficial

Same diagnosis,
Same prescription

Interindividual variability in drug disposition:

Genetics, Age, Ethnicity, Weight, Gender,
Other diseases, Diet ...

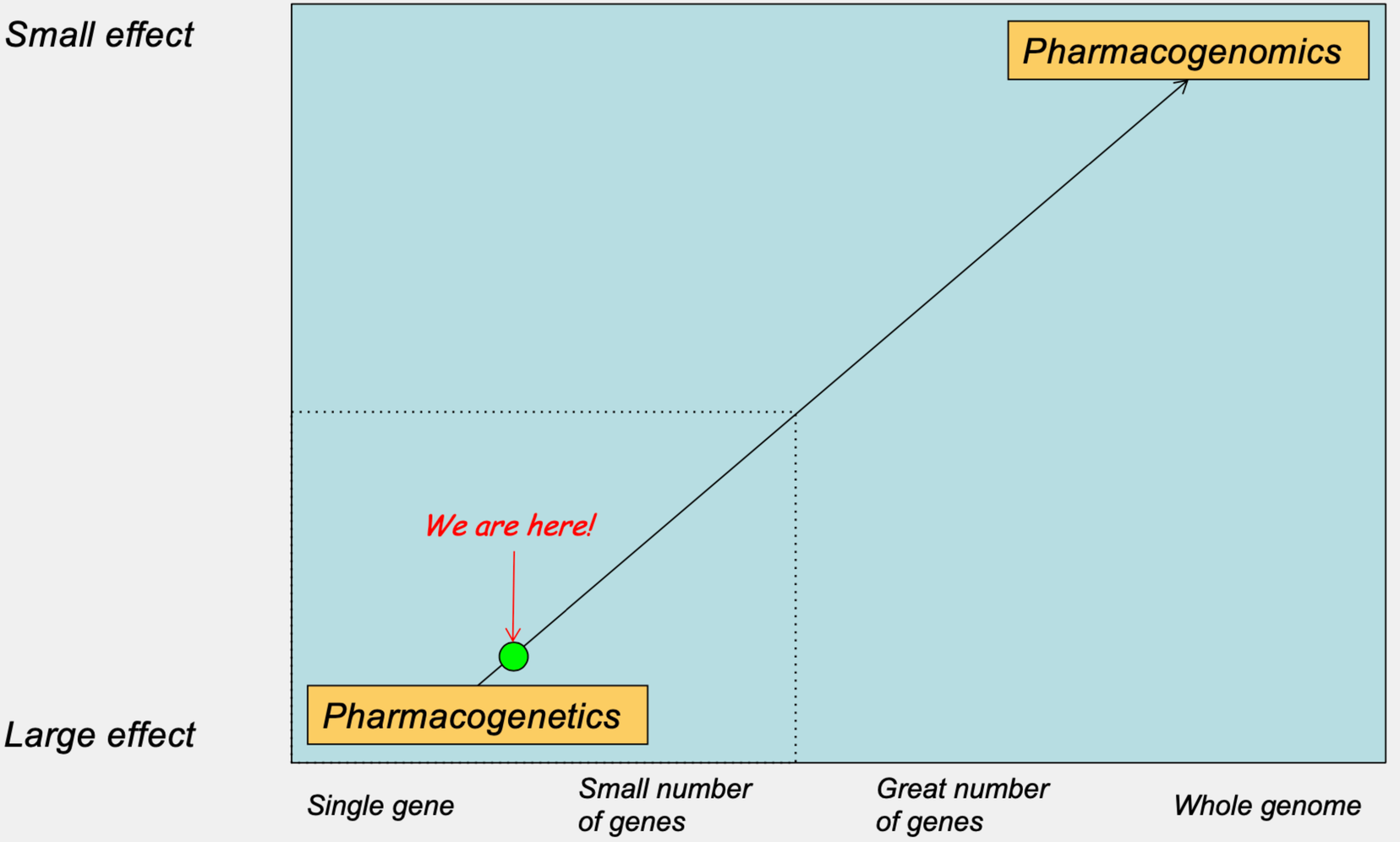


Pharmacologist

Compliance (misuso, abuso, automedicazione)
Uso di altri farmaci / interazioni

Pharmacogenomics: challenges and opportunities

(Roden, Ann Internal Med 2006;145:749-757)



Allergologico

Analgesico/Anestesiologico

Anti-infiammatorio

Anticoagulanti/Anti-aggreganti

Cardiovascolare

Endocrinologico

Gastroenterologico

Neurologico

Infettivologico

Immunosoppressori

Oncologico

Psichiatrico

Polmonare

Reumatologico

Disturbi del sonno

Urologico

Discussioni

- ***Appropriatezza prescritta test:***
  L'analisi del gene *DPYD* è stato richiesto nel 15% in pazienti a cui poi non sono state prescritte terapie con 5-FU/Capecitabina; *UGT1A1* è stato richiesto nel 79,8% dei casi in pazienti che poi non hanno ricevuto un trattamento con Irinotecano

- Rispetto agli anni precedenti non è possibile definire l'***utilità clinica***, basandoci solo sulle ADR, ma quello che abbiamo osservato è nessun caso di letalità legato alle terapie ed un unico caso di ADR severa

Discussioni

- ***Valutazione dose nella pratica clinica**:*
  Per singolo caso, vengono considerate altri fattori quali età del paziente, anamnesi personale, storia clinica, farmaci concomitanti, con attenta valutazione della funzionalità renale ed epatica e frequente monitoraggio dei parametri ematochimici.

Homozygous	rs25487	*XRCC1*	NM_006297.3:c.1196A>G	NP_006288.2:p.Gln399Arg	Response to Oxaliplatin
Heterozygous	rs1695	*GSTP1*	NM_000852.4:c.313A>G	NP_000843.1:p.Ile105Val	Response to Oxaliplatin
Heterozygous	rs1138272	*GSTP1*	NM_000852.4:c.341C>T	NP_000843.1:p.Ala114Val	Response to Oxaliplatin
Heterozygous	rs13181	*ERCC2*	NM_000400.4:c.2251A>C	NP_000391.1:p.Lys751Gln	Response to Oxaliplatin
Heterozygous	rs2231142	*ABCG2*	NM_004827.3:c.421C>A	NP_004818.2:p.Gln141Lys	Response to Oxaliplatin
Heterozygous	rs2273697	*ABCC2*	NM_000392.5:c.1249G>A	NP_000383.2:p.Val417Ile	Response to Irinotecan
Heterozygous	rs3740066	*ABCC2*	NM_000392.5:c.3972C>T	NP_000383.2:p.Ile1324=	Response to Irinotecan

PRINCIPALI DATABASE

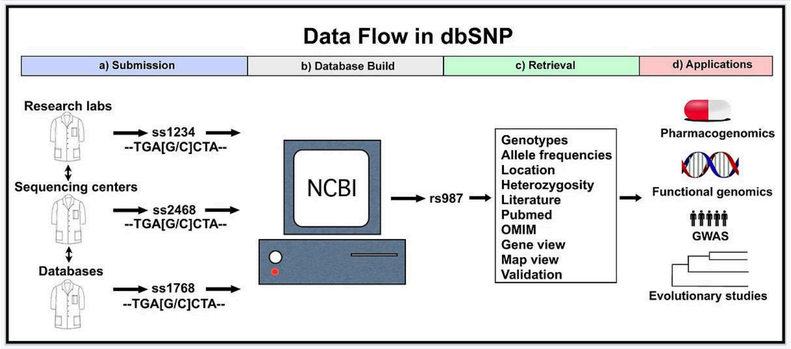
PharmVar
Pharmacogene Variation Consortium

gnomAD browser

Population Frequencies

Population	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
East Asian	1	1560	0	0.0006410
African	0	8714	0	0.000
Latino	0	848	0	0.000
Ashkenazi Jewish	0	290	0	0.000
European (Finnish)	0	3476	0	0.000
European (non-Finnish)	0	15432	0	0.000
Other	0	1088	0	0.000
South Asian	0	0	0	0.000
Male	1	17482	0	0.00005720
Female	0	13926	0	0.000
Total	**1**	**31408**	**0**	**0.00003184**

Include: Exomes Genomes



ClinVar Genomic variation as it relates to human health

Search ClinVar
Advanced search

About Access Submit Stats FTP Help Was this helpful?

Follow Print Download

NM_000492.3(CFTR):c.1521_1523delCTT (p.Phe508delPhe) Cite this record

Interpretation: Pathogenic
Review status: ★★★★ practice guideline
Submissions: 39 (Most recent: Jul 14, 2020)
Last evaluated: Mar 3, 2004
Accession: VCV000007105.23
Variation ID: 7105
Description: 3bp deletion

See interpretations for this variant in combination with other variants

FEEDBACK

Variant details
Conditions
Gene(s)

NM_000492.3(CFTR):c.1521_1523delCTT (p.Phe508delPhe)

Allele ID: 22144
Variant type: Deletion
Variant length: 3 bp
Cytogenetic location: 7q31.2
Genomic location: 7: 117559591-117559593 (GRCh38) GRCh38 UCSC
7: 117199645-117199647 (GRCh37) GRCh37 UCSC

HGVS:

Nucleotide	Protein	Molecular consequence
NC_000007.13:g.117199646_117199648del		
NC_000007.14:g.117559592_117559594del		
NM_000492.4:c.1521_1523delCTT MANE SELECT		

... more HGVS

Protein change: -
Other names: F508del
deltaF508
F508delF
DF508

A 12-gene pharmacogenetic panel to prevent adverse drug reactions: an open-label, multicentre, controlled, cluster-randomised crossover implementation study

Lancet 2023; 401: 347–56

Jesse J Swen, Cathelijne H van der Wouden, Lisanne EN Manson*, Heshu Abdullah-Koolmees, Kathrin Blagec, Tanja Blagus, Stefan Böhringer, Anne Cambon-Thomsen, Erika Cecchin, Ka-Chun Cheung, Vera HM Deneer, Mathilde Dupui, Magnus Ingelman-Sundberg, Siv Jonsson, Candace Joefield-Roka, Katja S Just, Mats O Karlsson, Lidija Konta, Rudolf Koopmann, Marjolein Kriek, Thorsten Lehr, Christina Mitropoulou, Emmanuelle Rial-Sebbag, Victoria Rollinson, Rossana Roncato, Matthias Samwald, Elke Schaeffeler, Maria Skokou, Matthias Schwab, Daniela Steinberger, Julia C Stingl, Roman Tremmel, Richard M Turner, Mandy H van Rhenen, Cristina L Dávila Fajardo, Vita Dolžan, George P Patrinos, Munir Pirmohamed, Gere Sunder-Plassmann, Giuseppe Toffoli, Henk-Jan Guchelaar, on behalf of the Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium†*

Summary

Background The benefit of pharmacogenetic testing before starting drug therapy has been well documented for several single gene–drug combinations. However, the clinical utility of a pre-emptive genotyping strategy using a pharmacogenetic panel has not been rigorously assessed.

Methods We conducted an open-label, multicentre, controlled, cluster-randomised, crossover implementation study of a 12-gene pharmacogenetic panel in 18 hospitals, nine community health centres, and 28 community pharmacies in seven European countries (Austria, Greece, Italy, the Netherlands, Slovenia, Spain, and the UK). Patients aged 18 years or older receiving a first prescription for a drug clinically recommended in the guidelines of the Dutch Pharmacogenetics Working Group (ie, the index drug) as part of routine care were eligible for inclusion. Exclusion criteria included previous genetic testing for a gene relevant to the index drug, a planned duration of treatment of less than 7 consecutive days, and severe renal or liver insufficiency. All patients gave written informed consent before taking part in the study. Participants were genotyped for 50 germline variants in 12 genes, and those with an actionable variant (ie, a drug–gene interaction test result for which the Dutch Pharmacogenetics Working Group [DPWG] recommended a change to standard-of-care drug treatment) were treated according to DPWG recommendations. Patients in the control group received standard treatment. To prepare clinicians for pre-emptive pharmacogenetic testing, local teams were educated during a site-initiation visit and online educational material was made available. The primary outcome was the occurrence of clinically relevant adverse drug reactions within the 12-week follow-up period. Analyses were irrespective of patient adherence to the DPWG guidelines. The primary analysis was done using a gatekeeping analysis, in which outcomes in people with an actionable drug–gene interaction in the study group versus the control group were compared, and only if the difference was statistically significant was an analysis done that included all of the patients in the study. Outcomes were compared between the study and control groups, both for patients with an actionable drug–gene interaction test result (ie, a result for which the DPWG recommended a change to standard-of-care drug treatment) and for all patients who received at least one dose of index drug. The safety analysis included all participants who received at least one dose of a study drug. This study is registered with ClinicalTrials.gov, NCT03093818 and is closed to new participants.

Findings Between March 7, 2017, and June 30, 2020, 41696 patients were assessed for eligibility and 6944 (51·4 % female, 48·6% male; 97·7% self-reported European, Mediterranean, or Middle Eastern ethnicity) were enrolled and assigned to receive genotype-guided drug treatment (n=3342) or standard care (n=3602). 99 patients (52 [1·6%] of the study group and 47 [1·3%] of the control group) withdrew consent after group assignment. 652 participants (367 [11·0%] in the study group and 285 [7·9%] in the control group) were lost to follow-up. In patients with an actionable test result for the index drug (n=1558), a clinically relevant adverse drug reaction occurred in 152 (21·0%) of 725 patients in the study group and 231 (27·7%) of 833 patients in the control group (odds ratio [OR] 0·70 [95% CI 0·54–0·91]; p=0·0075), whereas for all patients, the incidence was 628 (21·5%) of 2923 patients in the study group and 934 (28·6%) of 3270 patients in the control group (OR 0·70 [95% CI 0·61–0·79]; p <0·0001).

(CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5, DPYD, F5, HLA-B, SLCO1B1, TPMT, UGT1A1, VKORC1)

Interpretation **Genotype-guided treatment using a 12-gene pharmacogenetic panel significantly reduced the incidence of clinically relevant adverse drug reactions and was feasible across diverse European health-care system organisations and settings. Large-scale implementation could help to make drug therapy increasingly safe.**

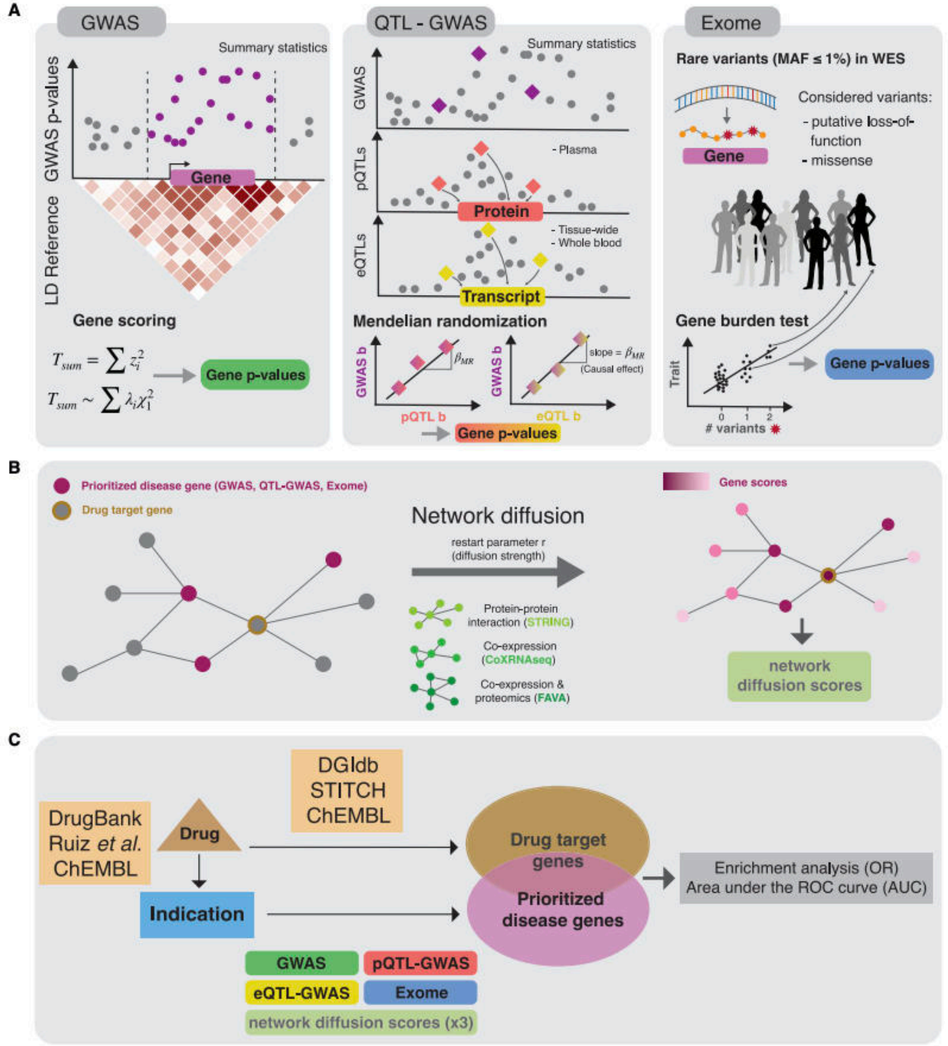
PROSPETTIVE

- un impiego più sicuro dei farmaci da parte dei clinici, che potranno scegliere specifiche terapie in funzione del patrimonio genetico del singolo paziente;

- una ricerca mirata a sviluppare nuovi farmaci da somministrare ad individui che non rispondono o non possono assumere uno specifico trattamento;

- un impiego di risorse più razionale dovuto al non utilizzo di farmaci inefficaci e alla riduzione dei tempi di ricovero conseguenti agli effetti collaterali legati alla diverse terapie.

DRUG ACTIVITY Response - Resistance



DRUG TOXICITY

NEW DRUGS

Cell Genomics

Article

Multi-layered genetic approaches to identify approved drug targets

Sadler et al., 2023, Cell Genomics *3*, 100341
July 12, 2023 © 2023 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100341

Intervallo massimo per il repertamento biologico da vittime di violenza sessuale: indicazioni derivanti da una revisione sistematica della letteratura e dalla casistica del Centro Soccorso Violenza Sessuale

XXIX Congresso Nazionale GeFI
Messina (ME), 9-11 novembre 2023

Elena Chierto, PhD
e-mail: elena.chierto@unito.it

Laboratorio di Scienze Criminalistiche "Carlo Torre"
Sezione di Genetica Forense
Responsabile: Prof. Carlo Robino

Reato di violenza sessuale in Italia

Violenza di genere

- **Problema globale di salute pubblica**
- **14 % ad opera del partner** [1]
- **Costo annuo: 16,7 miliardi di euro** [2]

[1] Sito ISTAT - 25 novembre 2022

[2] Commissione parlamentare di inchiesta sul femminicidio, nonché su ogni forma di violenza di genere – 6 febbraio 2018

DPCM 24 novembre 2017 (“**Percorso per le donne che subiscono violenza**”) - Linee guida nazionali per le Aziende sanitarie e ospedaliere in tema di soccorso e assistenza socio-sanitaria alle donne vittime di violenza

non fornisce raccomandazioni sul **tempo massimo utile** entro cui procedere al repertamento di tracce biologiche

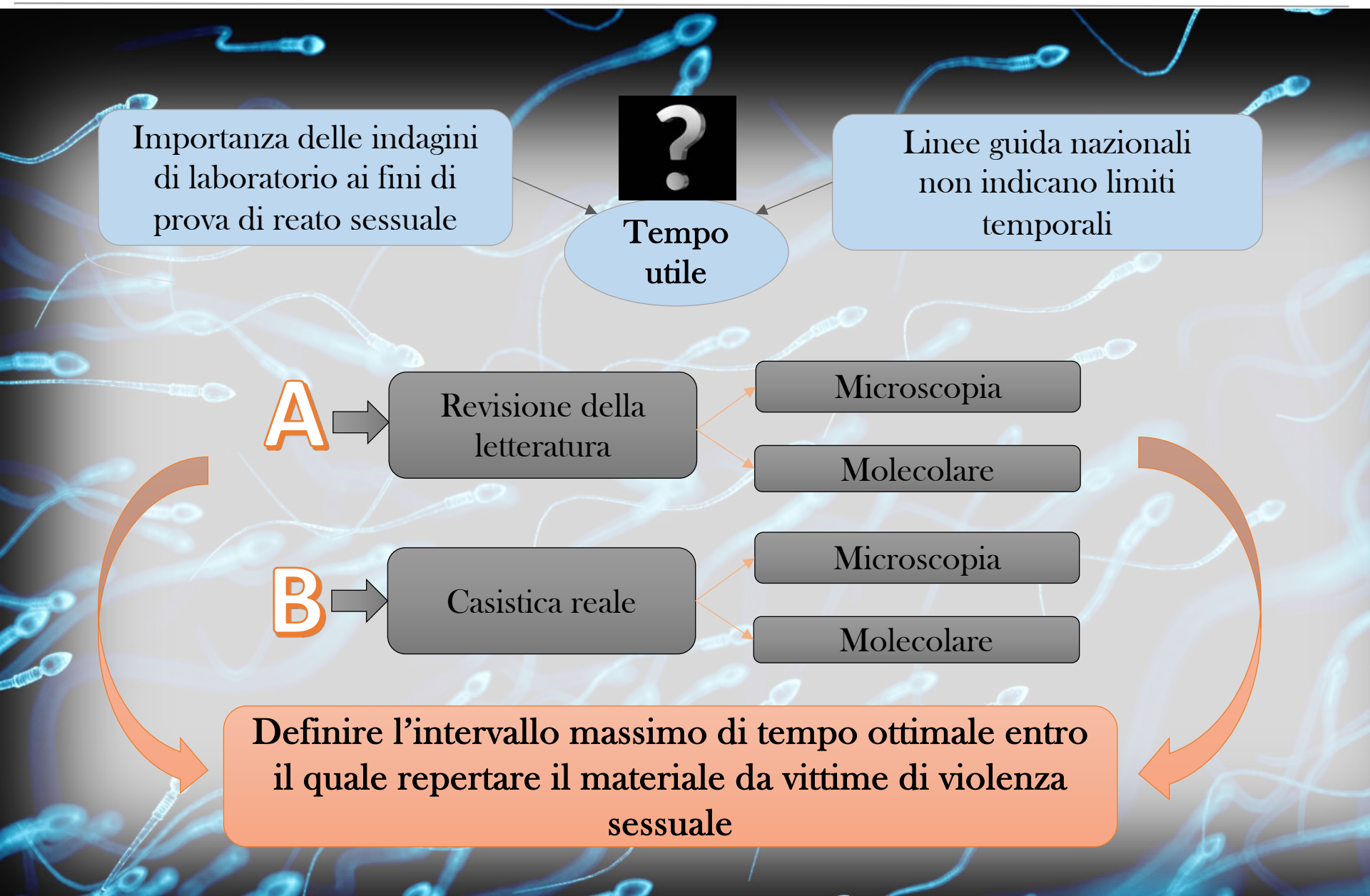
Genetisti Forensi Italiani

ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA
Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I)
Presidente Prof. Francesco De Stefano

LINEE GUIDA PER LA REPERTAZIONE DI TRACCE BIOLOGICHE PER LE ANALISI DI GENETICA FORENSE NEL PERCORSO ASSISTENZIALE DELLE VITTIME DI VIOLENZA SESSUALE E/O MALTRATTAMENTO
a cura del gruppo di lavoro coordinato dalla Prof.ssa Susi Pelotti*

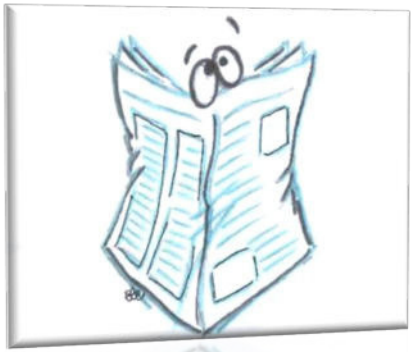
Finalità: lo scopo delle linee guida è quello di pianificare l’intervento dei professionisti della salute coinvolti nella repertazione di tracce biologiche nei casi di violenza sessuale e/o maltrattamento, dichiarati o sospetti.

Scopo dello studio



MATERIALI & METODI

REVISIONE DI LETTERATURA



1974-2023

31 articoli:
- **Embase**
- **Pubmed**

TIME SINCE INTERCOURSE (TSI) :
- **Spermatozoi**
- **DNA maschile**
- **DNA femminile**

SEDE ANATOMICA:
- **Vaginale**
- **Ano-rettale**
- **Cavo orale**
- **Cute**
- **Ungueale**
- **Penieno**

METODO DI RICERCA:
- **Microscopia**
- **STR**
- **Y-STR**

MATERIALI & METODI

CASISTICA MICROSCOPIA

2003-2023

1153 casi:
Centro Soccorso Violenza Sessuale dell'Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino

TIME SINCE INTERCOURSE (TSI)

- **Spermatozoi**

SEDE ANATOMICA:

- **Vaginale**
- **Ano-rettale**
- **Genitali esterni**
- **Cavo orale**
- **Cute**
- **Ungueale**

RICERCA MICROSCOPICA:

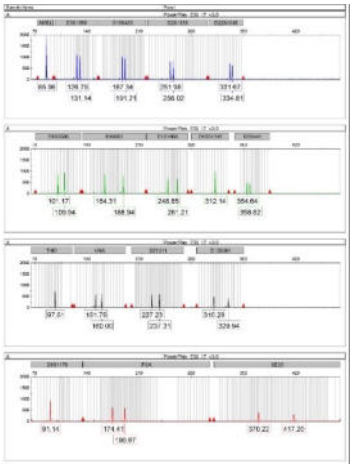
- **Positiva**
- **Negativa**

TECNICA DI RICERCA:

- **Striscio su vetrino**
- **Thin-Prep**

MATERIALI & METODI

CASISTICA MOLECOLARE



2001-2022

51 casi (67% SVS):
Sezione Genetica Forense del Laboratorio di Scienze Criminalistiche "Carlo Torre" dell'Università di Torino

TIME SINCE INTERCOURSE (TSI)

- Spermatozoi
- DNA

SEDE ANATOMICA:

- Vaginale
- Ano-rettale
- Genitali esterni
- Cavo orale
- Cute
- Ungueale

RICERCA MICROSCOPICA:

- Positiva
- Negativa

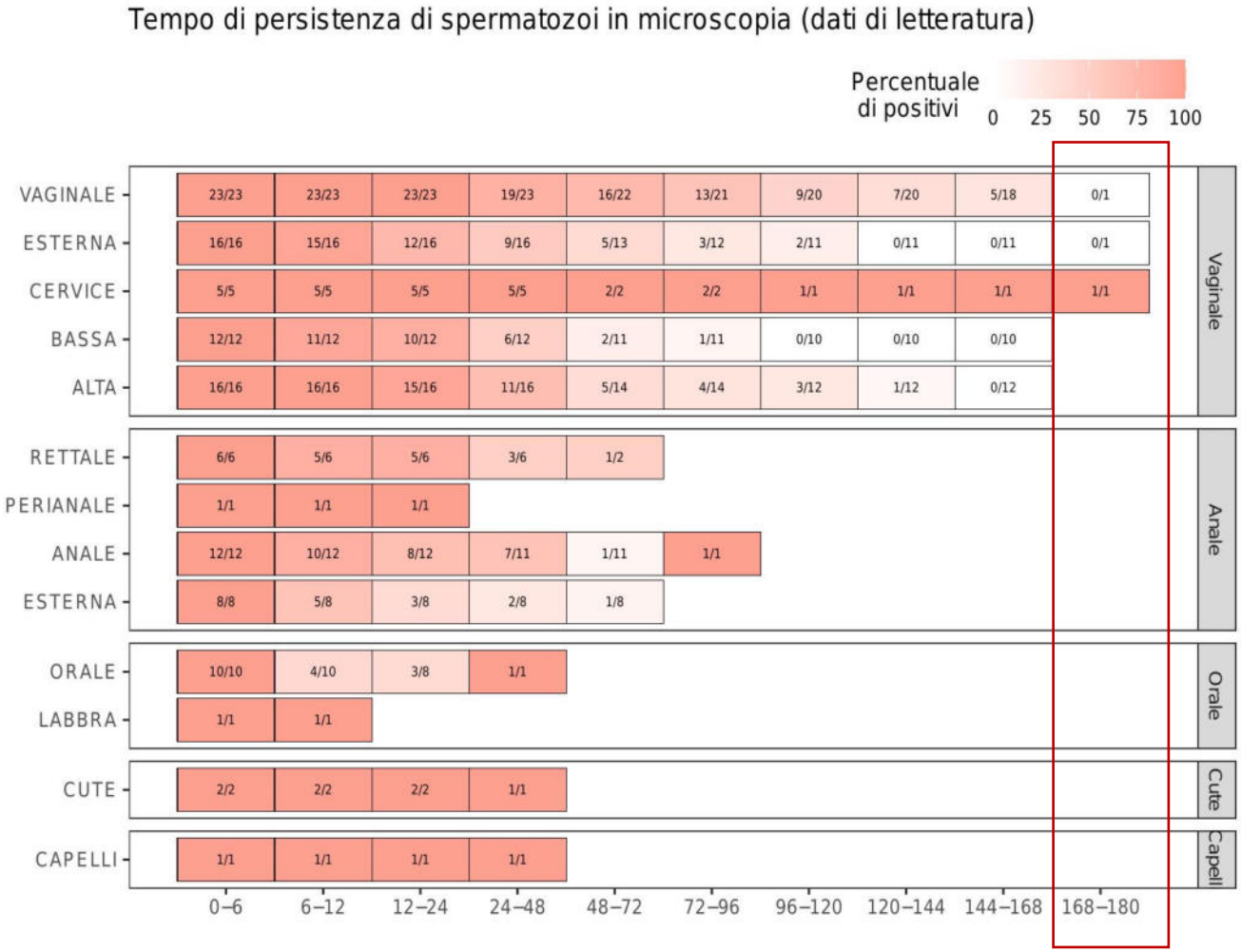
RICERCA MOLECOLARE:

- Negativa
- Positiva (profilo STR autosomico o aplotipo Y-STR)

RISULTATI

REVISIONE DI LETTERATURA

MICROSCOPIA

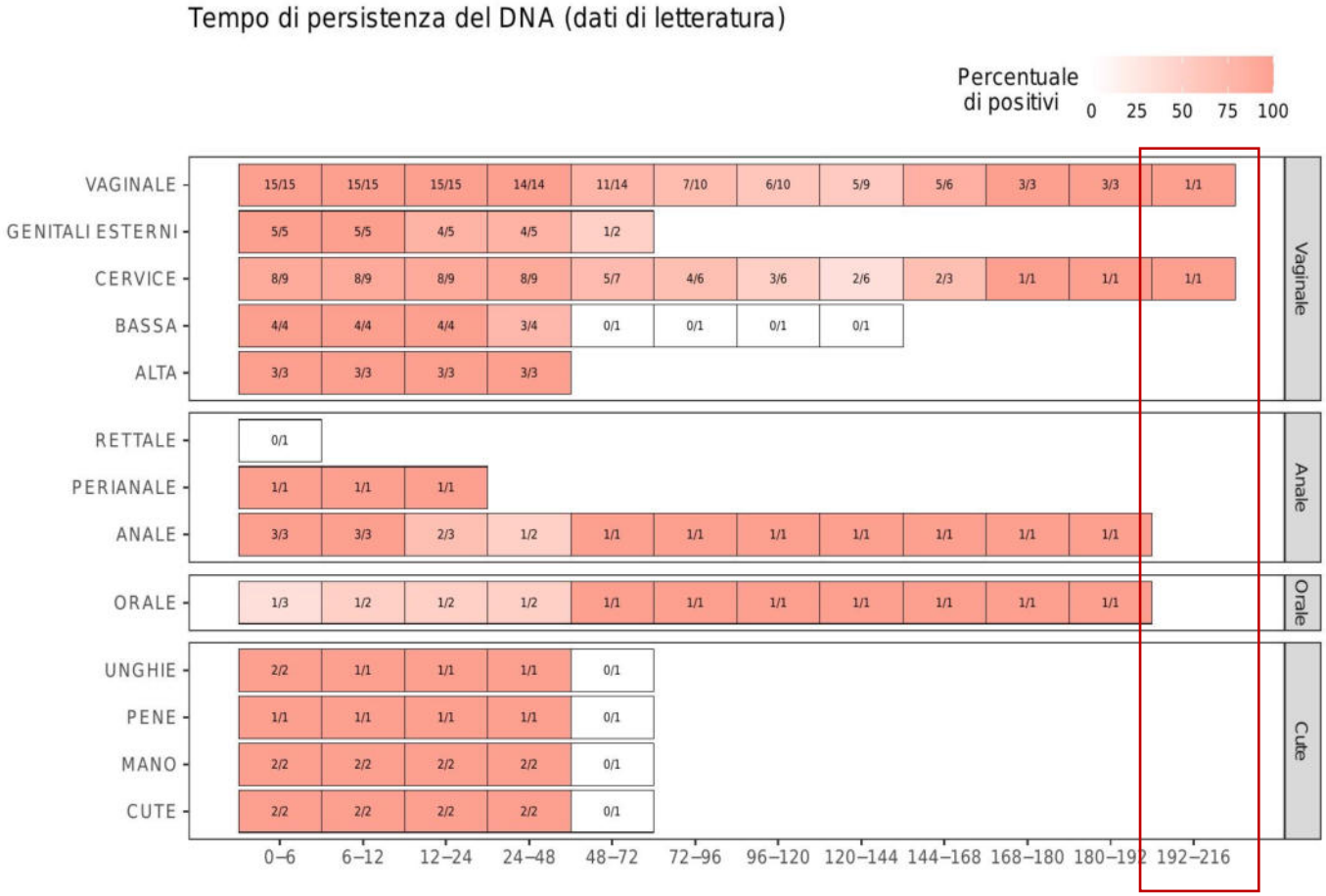


TSI massimo: 168-180 ore

RISULTATI

REVISIONE DI LETTERATURA

MOLECOLARE

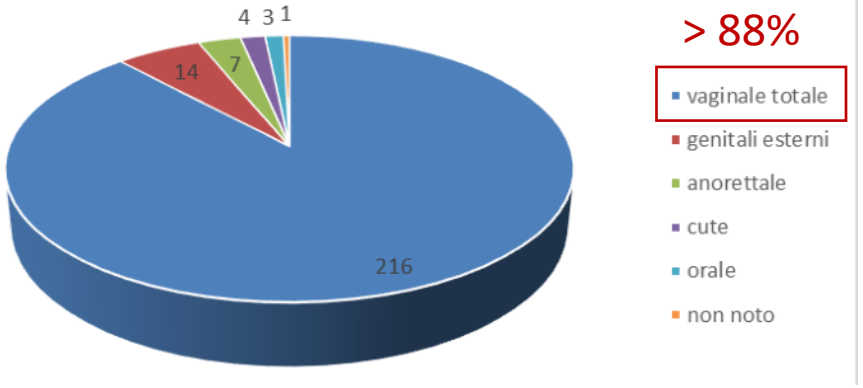


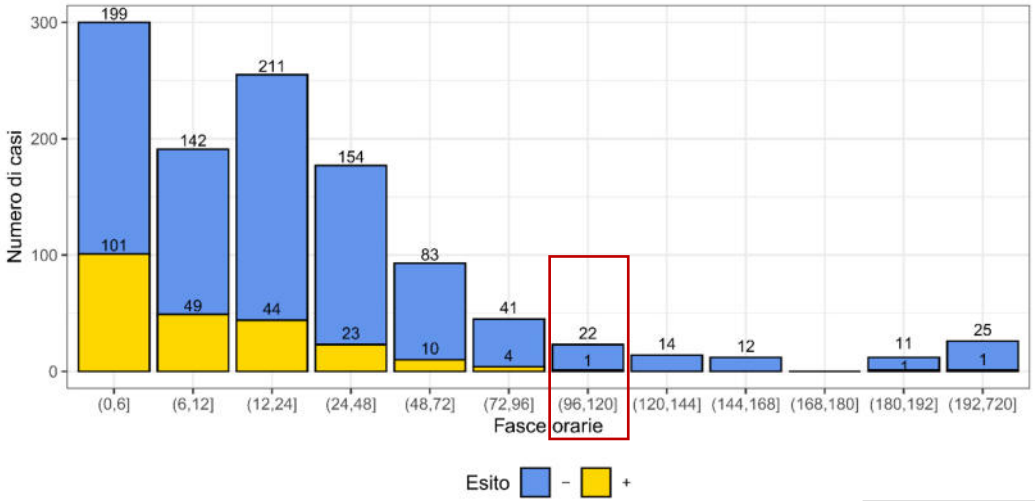
TSI massimo: 192-216 ore

RISULTATI

CASISTICA MICROSCOPIA SVS

Sedi anatomiche per campioni positivi a spermatozoi (n=245, 17% su totale)





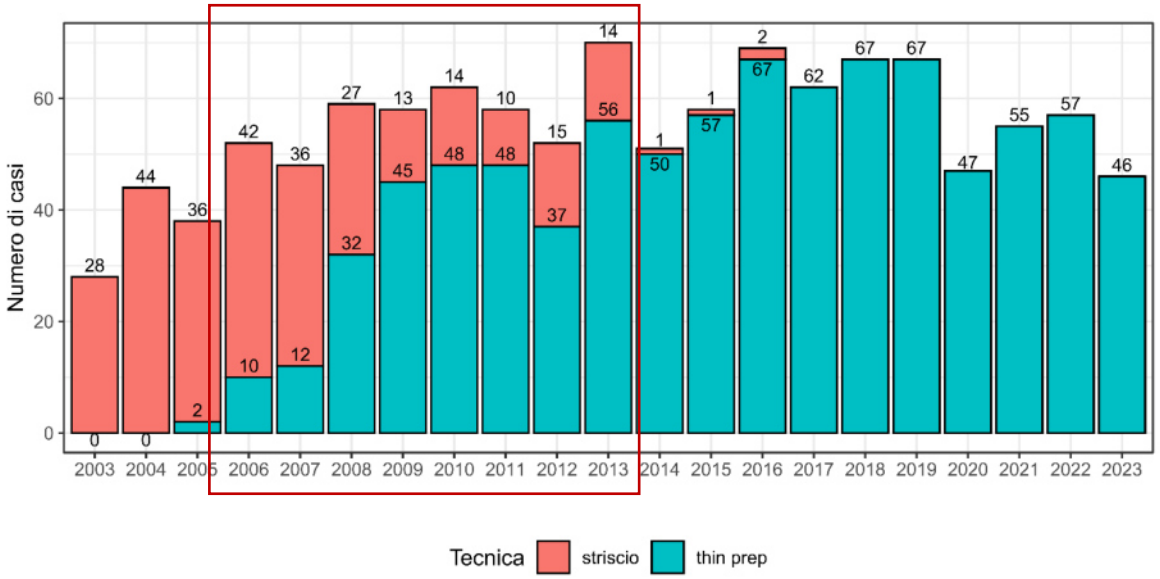
Distribuzione dei campioni positivi e negativi

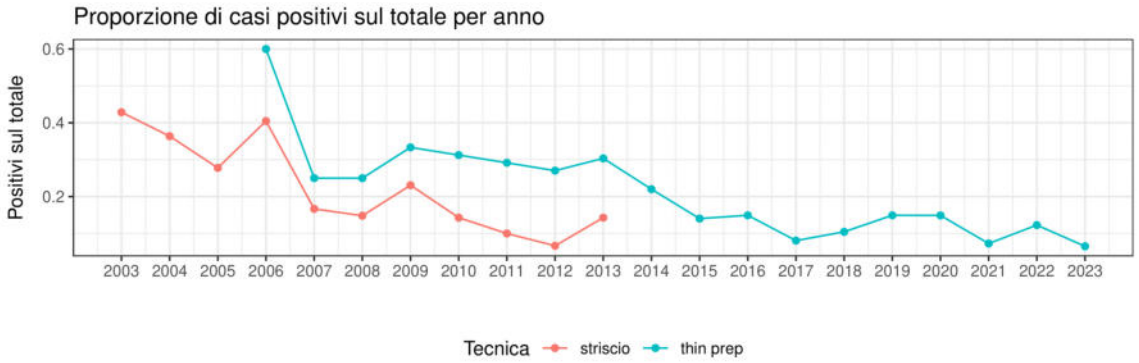
TSI massimo: 96-120 ore

RISULTATI

CASISTICA MICROSCOPIA SVS

Distribuzione delle tecniche di rilevazione di spermatozoi per anno





Meglio striscio o thin-prep?

Confronto tra le due tecniche (2006-2013)*

Maggiore sensibilità del thin-prep (P-value=0,041)

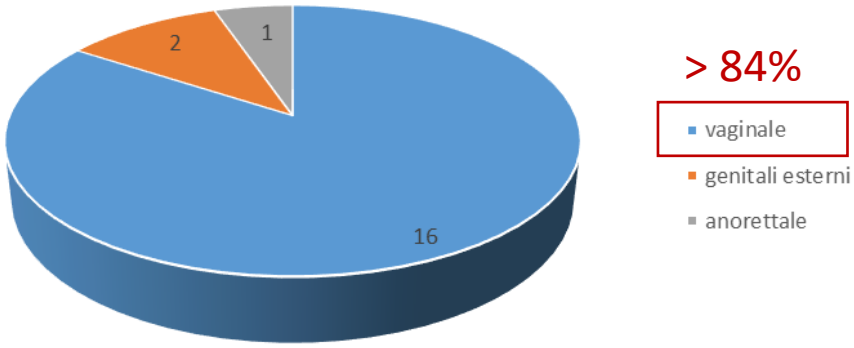
*le distribuzioni dei TSI sono omogenee

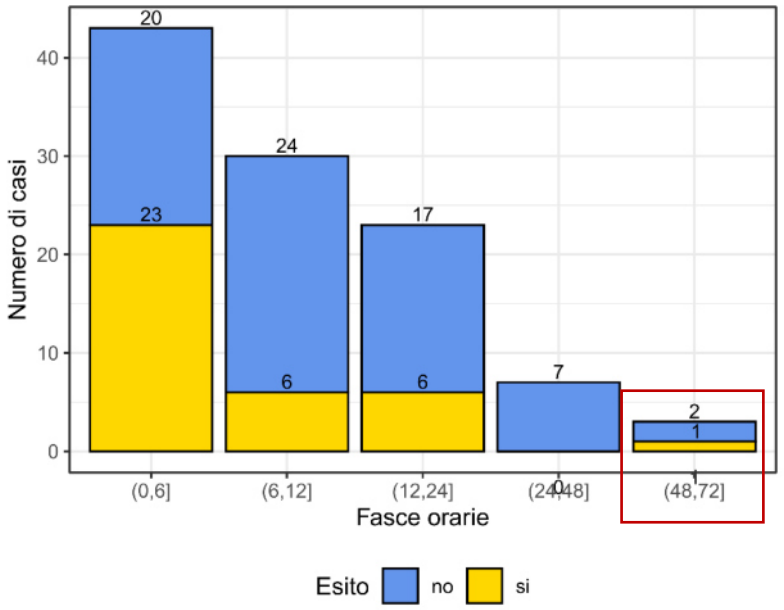
RISULTATI

CASISTICA MOLECOLARE

LSC-GF

Sedi anatomiche per campioni positivi (DNA) (n=19, 36,5% sul totale)



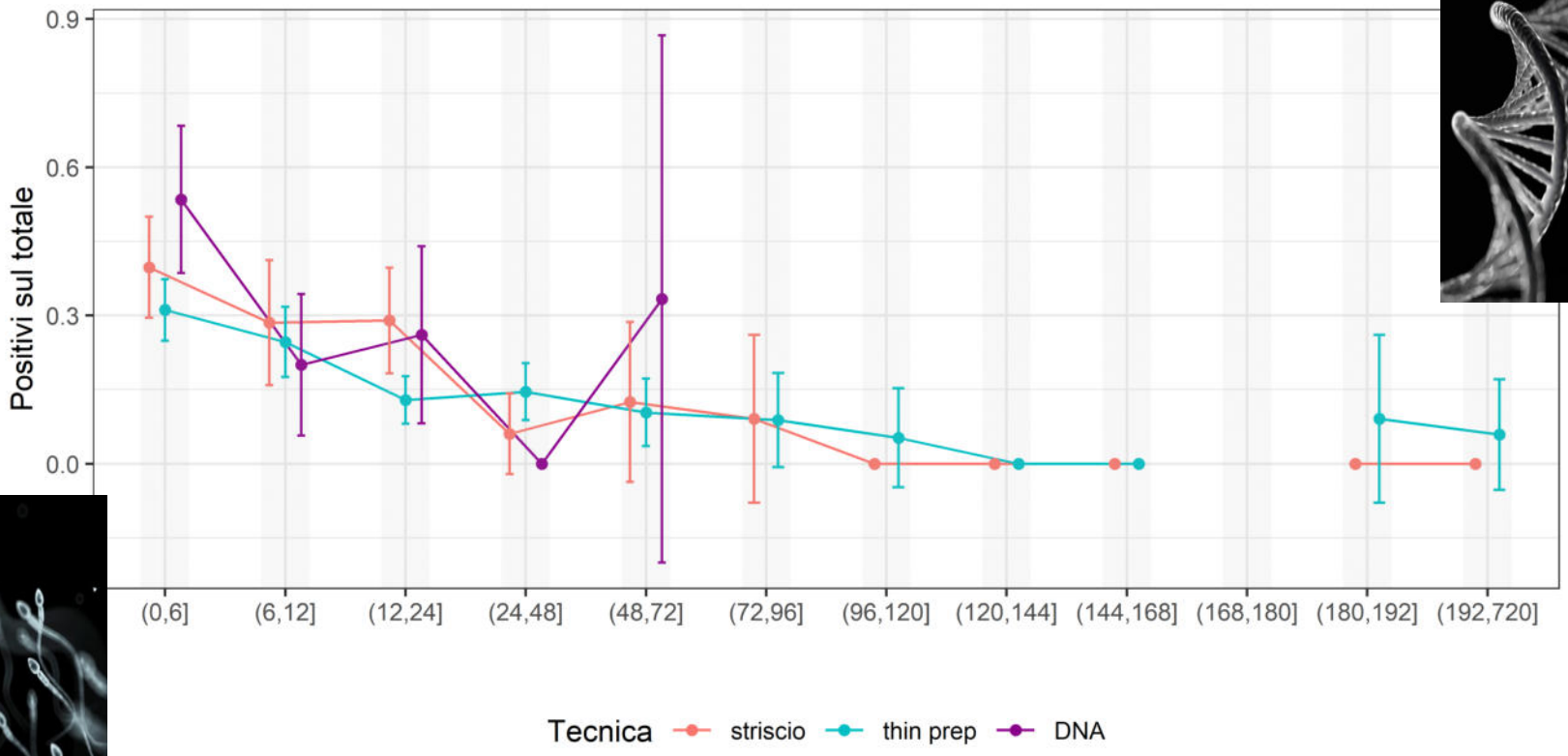


Distribuzione dei campioni positivi e negativi

TSI massimo: 48-72 ore
MA
Non disposte indagini oltre le 72 ore

RISULTATI

CONFRONTO TRA RICERCA MICROSCOPICA E GENETICA



7,7% dei casi con rilevazione di DNA maschile anche se ricerca microscopica negativa

CONCLUSIONI & PROSPETTIVE

Revisione di letteratura

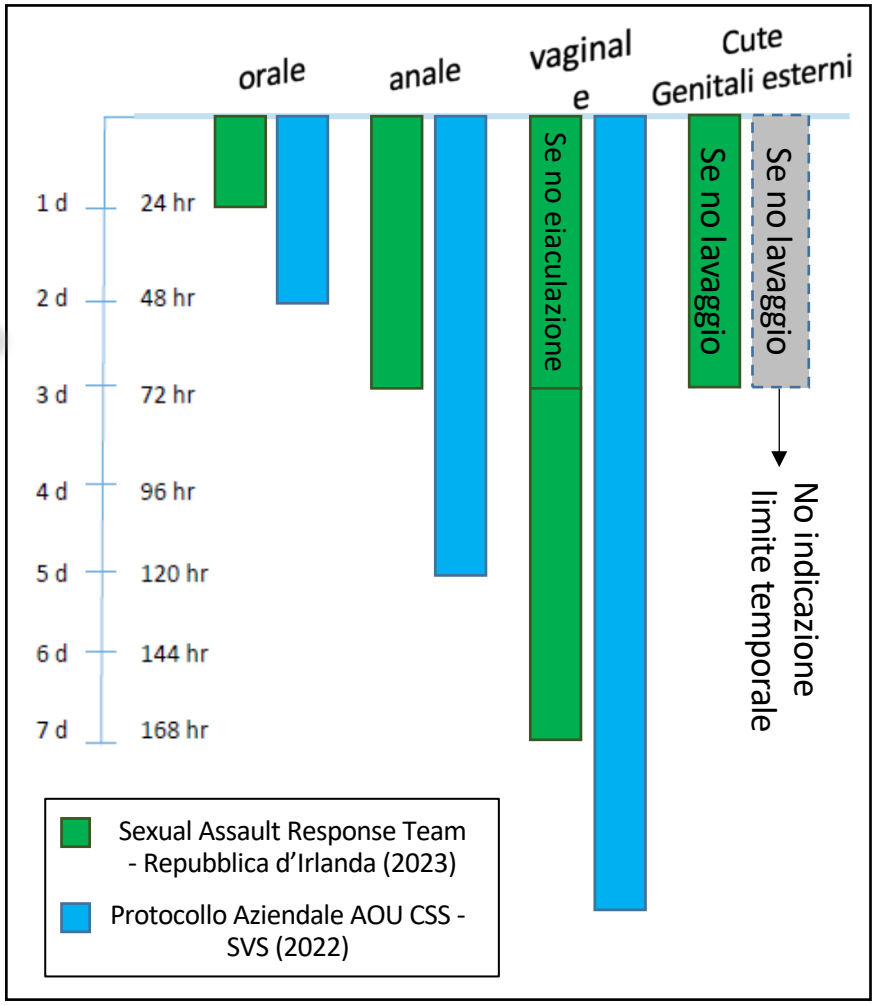
Casistica del centro SVS

Casistica del LSC-GF

Congruenza con le più recenti raccomandazioni internazionali

Possibile revisione del protocollo aziendale SVS

Necessità di estendere ad altri laboratori per incrementare la casistica



UNIVERSITÀ DI TORINO

Ge.F.I.

MEDICINA LEGALE UNITO

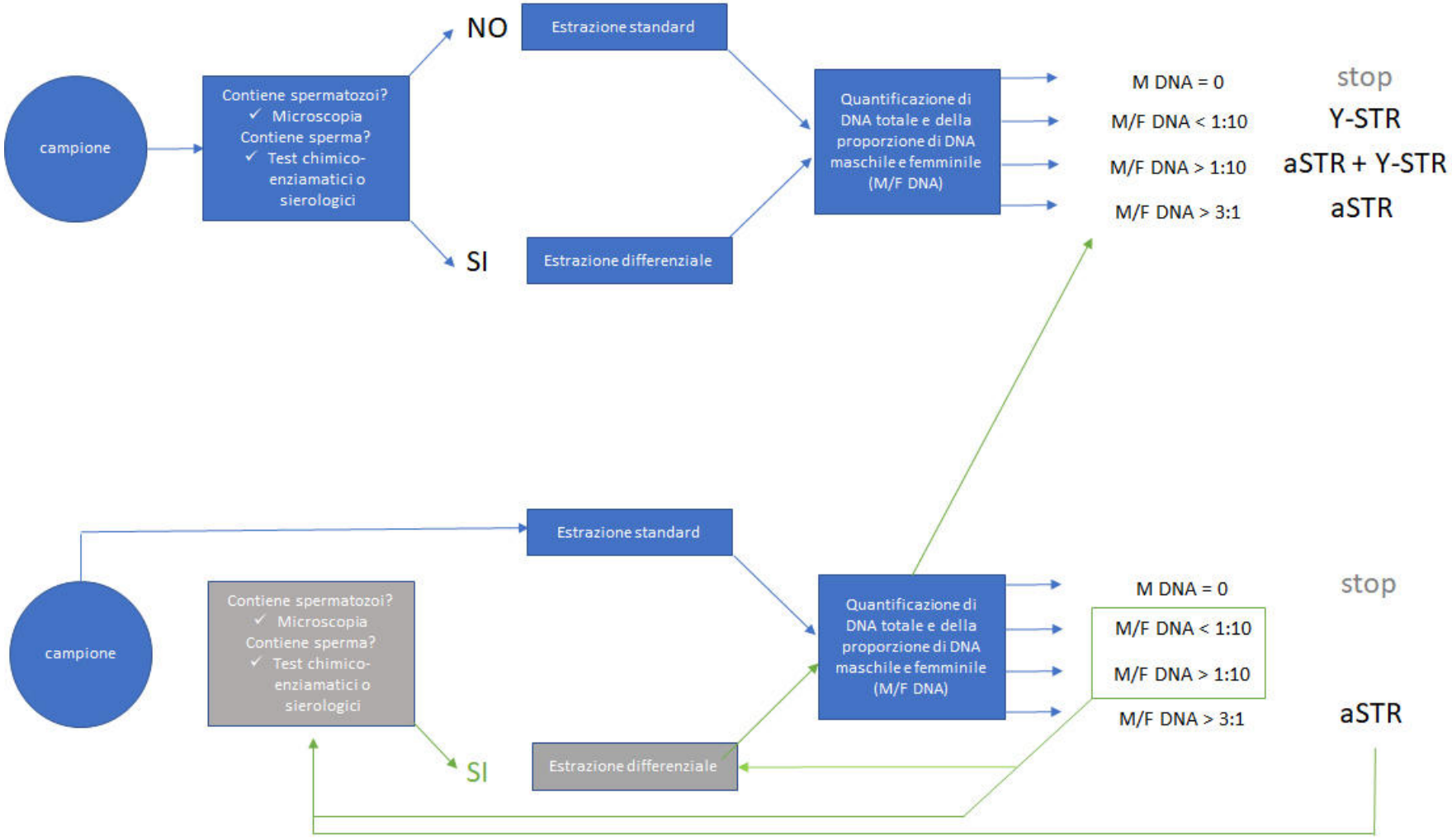
Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche
Laboratorio di Scienze Criminalistiche "Carlo Torre"
Sezione di Genetica Forense

Gruppo di lavoro:
Pr. Carlo ROBINO
Dr. Elena CHIERTO
Dr. Serena ANELI

Alumni:
Dr. Silvia Tamietti

Collaboratori (centro SVS):
Dr.ssa Paola Castagna
Ost. Antonella Canavese

Analisi genetico forense



RISULTATI

CASISTICA MICROSCOPIA SV S

Meglio striscio o thin-prep?

Confronto tra le due tecniche (2006-2013)

Maggiore sensibilità del thin-prep (P-value=0,041)

La genetica forense al servizio della persona fragile

29° Congresso Nazionale GeFI (Genetisti Forensi Italiani)

9-11 novembre, 2023

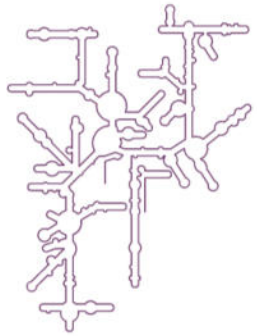
Determinazione del microbiota umano ed applicazioni genetico-forensi: quale impatto sulla prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza?

Arianna Delicati[1], Beatrice Marcante[1], Pamela Tozzo[1], e Luciana Caenazzo[1]

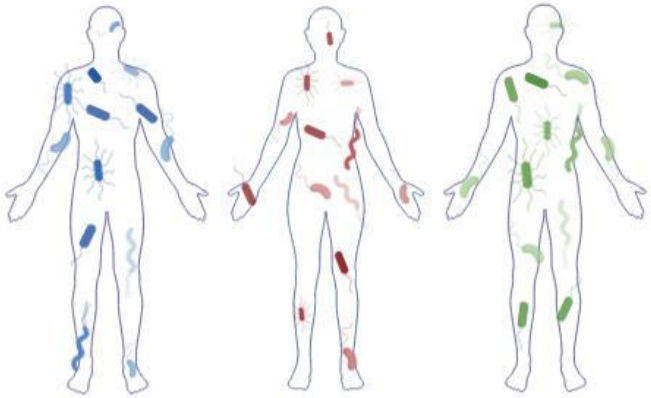
[1] Laboratorio di Genetica Forense, Sede di Medicina Legale, Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica – Università degli Studi di Padova, 35121 Padova, Italia

Nell'ambito forense, che importanza può avere il **microbiota umano**

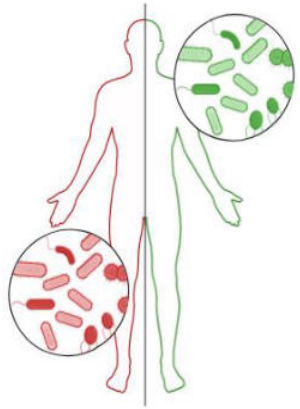
- Ecosistema diversificato che colonizza il corpo umano.
- Variazioni individuali.
- Influenza bidirezionale (uomo-ambiente).
- 16S rRNA come marcatore tassonomico



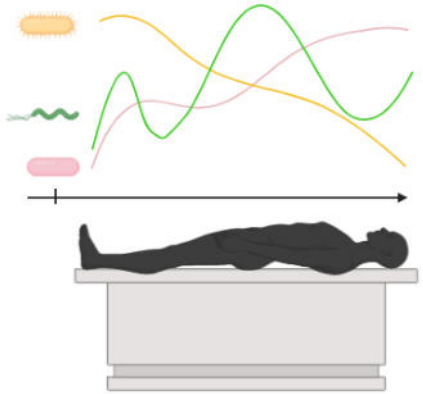
Identificazione personale



Stato di salute dell'individuo

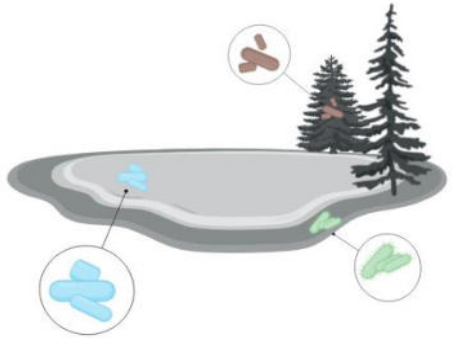


Stima del PMI

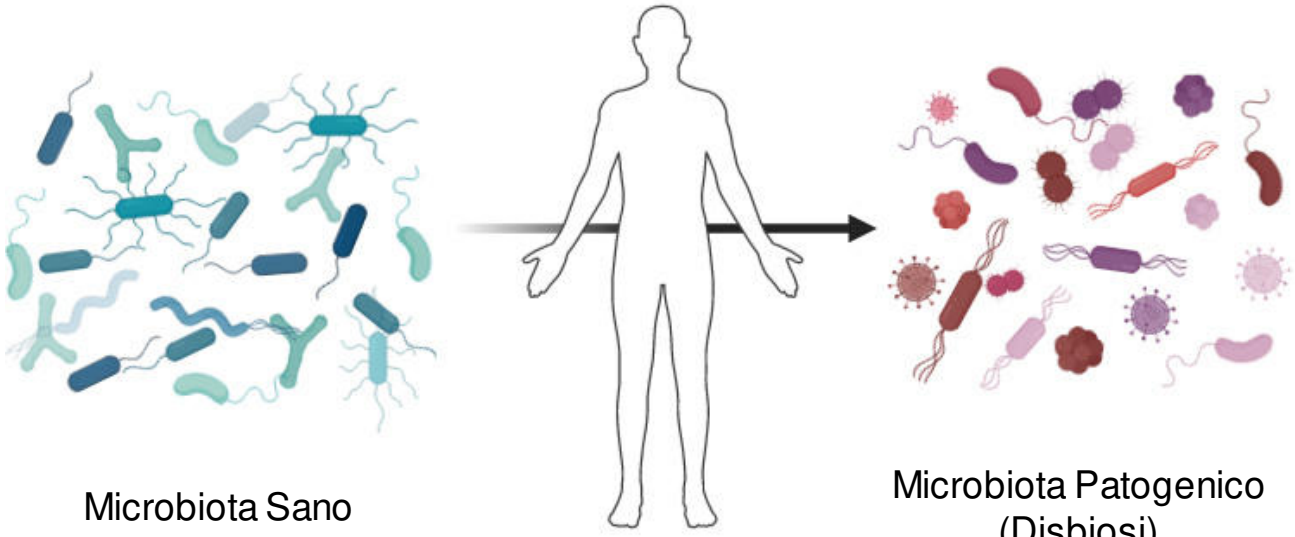


Geo-localizzazione

Origine ambientale



Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA)

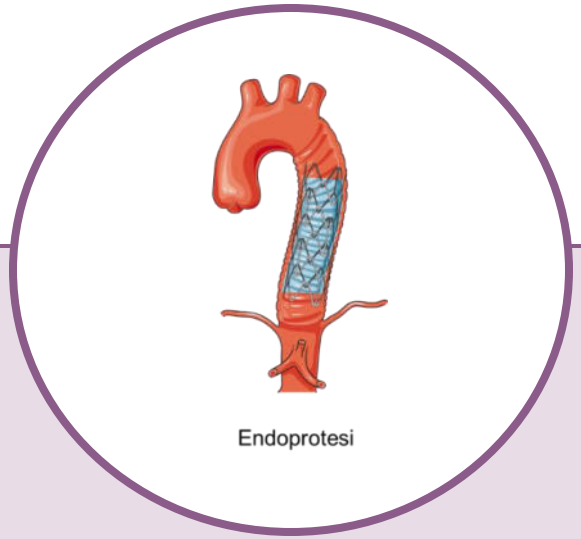


Microbiota Sano

Microbiota Patogenico (Disbiosi)

- Si manifestano almeno 48 ore dopo il ricovero.
- Rappresentano una delle più frequenti complicazioni a seguito di ospedalizzazione a livello mondiale.
- Sono considerate la più grande minaccia per i pazienti ospedalizzati e un grave onere per la sanità pubblica.

Protesi Vascolari



Dispositivo biologico o artificiale, destinato a sostituire un segmento di un albero arterioso la cui funzione è compromessa, impiantato per via transluminale.

Enterococchi

Staphylococcus aureus

Klebsiella pneumoniae

Acinetobacter baumannii

Pseudomonas aeruginosa

Enterobacteriacee

+

Clostridium difficile

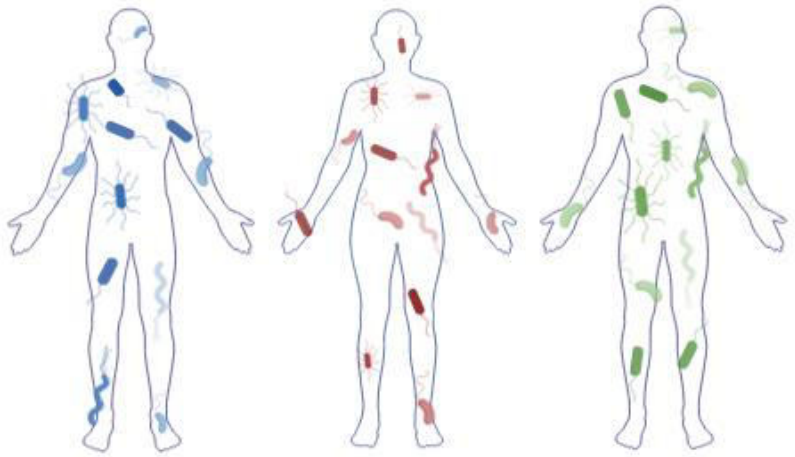
Le infezioni dei dispositivi bio-protesici impiantati sono ICA caratterizzate da un **elevato tasso di morbilità e mortalità**.

Scopo del progetto:

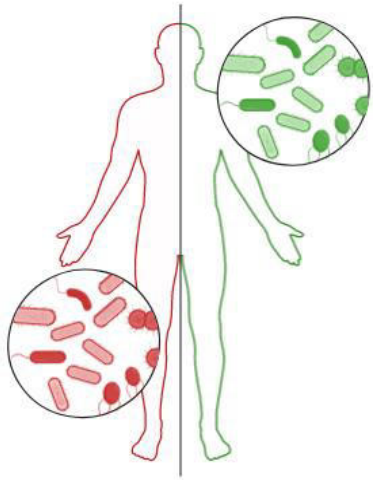
Caratterizzazione del microbiota *di pazienti che si sono sottoposti a impianto di protesi endovascolari allo scopo di* ***identificare marcatori microbiologici specifici*** *associati allo sviluppo delle Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA).*

Traslato nel contesto forense:

Identificazione personale



Stato di salute dell'individuo



Obiettivi secondari:

1. Caratterizzazione del microbiota *delle protesi biologiche infette sostituite nei pazienti che mostrano un'infezione correlata all'assistenza da dispositivo.*

Resize font:

Questionario informativo

Il presente questionario è parte di un progetto che ha lo scopo di migliorare la comprensione delle infezioni ospedaliere e di sviluppare strategie per la loro prevenzione e il loro controllo. Le infezioni ospedaliere rappresentano un problema significativo nel contesto medico, sia in termini di impatto sulla salute dei pazienti che di costi sanitari. In Europa, ogni anno, sono 4,1 milioni le persone colpite da infezioni ospedaliere, con 16 milioni (6%) di giornate di degenza aggiuntive e circa 37.000 decessi.

Con la tua partecipazione contribuirai a migliorare la salute pubblica nell'ambiente ospedaliero. Le tue risposte ci aiuteranno a ottenere una panoramica preziosa sull'attuale livello di conoscenza e a identificare possibili aree di miglioramento.

Ti chiediamo gentilmente di rispondere nel modo più sincero e obiettivo possibile alle seguenti domande. Il questionario richiederà al massimo una decina di minuti ed è totalmente anonimo, tutte le tue risposta saranno trattate dal solo gruppo di ricerca, i dati non saranno diffusi se non in forma anonima e aggregata. Non sarà possibile in alcun modo risalire a chi ha compilato i questionari.

Rispondendo a queste domande, acconsenti a partecipare allo studio.

Ti ringraziamo fin d'ora molto per il tuo contributo e la tua disponibilità.

*must provide value implica che la risposta è obbligatoria

Page 1 of 3

2. Valutazione della conoscenza delle ICA *da parte della popolazione*

- Informazioni generali;
- Consapevolezza e Opinioni sulle ICA;
- Valutazione delle conoscenze e del comportamento intrapreso dalla popolazione in questo contesto.

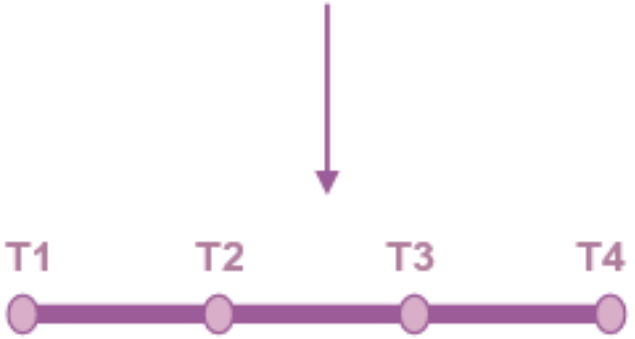
Inizio dello STUDIO

12 mesi periodo nel quale i pazienti reclutati devono essere stati sottoposti all'intervento chirurgico

Periodo di Studio di 12 mesi

Pazienti che **non** hanno manifestato un'Infezione Correlata all'Assistenza

Pazienti che **hanno** manifestato un'Infezione Correlata all'Assistenza



Un campionamento a settimana nell'arco di un mese

Criteri di inclusione

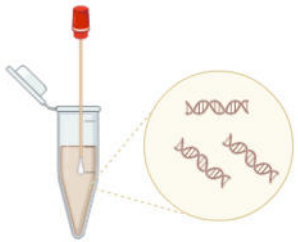
- Età;
- Consenso informato;
- Assenza di patologie conclamate.

Criteri di esclusione

- Assunzione di terapie antibiotiche recentemente;
- ICA recente.

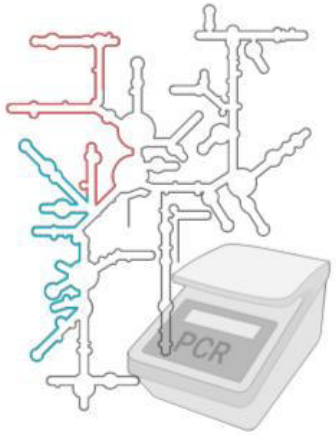
Estrazione del DNA microbico da tamponi salivari e cutanei

1



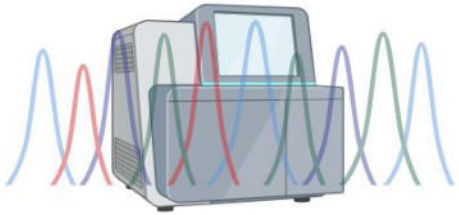
Amplificazione delle regioni ipervariabili V3-V4 del 16S rRNA

2



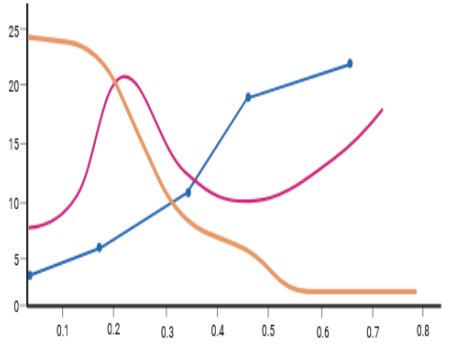
Sequenziamento e analisi

3



Caratterizzazione qualitativa e quantitativa del microbiota del paziente

4



Identificazione della correlazione con i patogeni responsabili delle ICA.

5

Enterococchi

Staphylococcus aureus

Klebsiella pneumoniae

Acinetobacter baumannii

Pseudomonas aeruginosa

Enterobacteriacee

+

Clostridium difficile

Conclusioni relativamente prevenzione e gestione ICA:

- Da studi iniziali Enterobacteriacee in pazienti con ICA;
- Identificazione di possibili bio-marcatori prognostici microbici;
- Implementazioni di procedure da applicare in ambito clinico per prevenire e gestire le ICA.

- Identificazione di possibili interventi sulla popolazione per sensibilizzare sul problema.

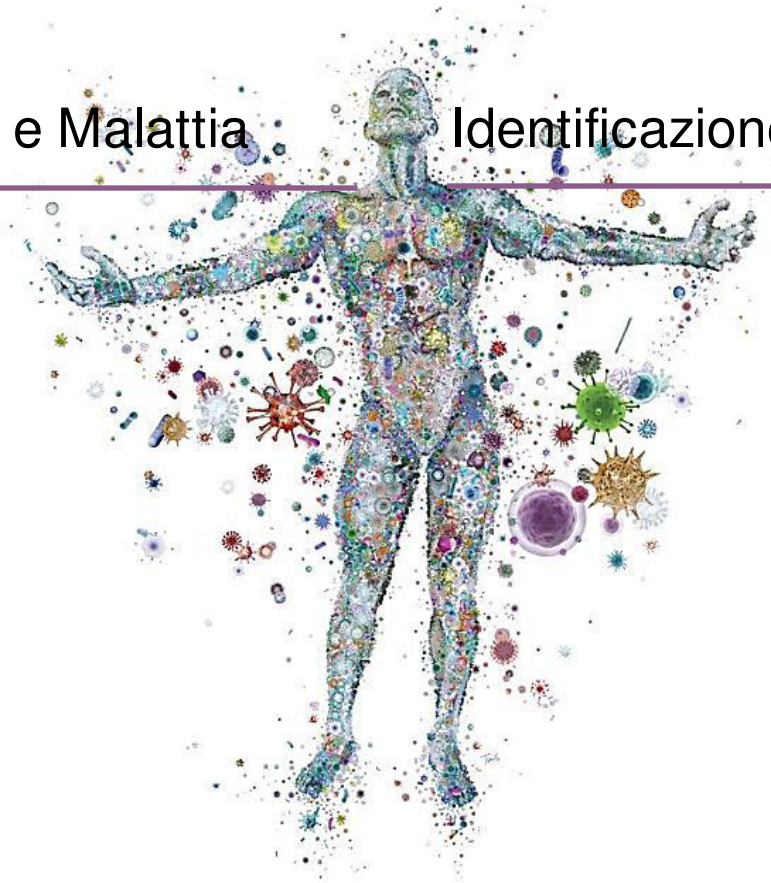
Conclusioni relativamente ambito forense:

Valorizzazione della biodiversità microbiologica individuale dei pazienti:

- Nuove prospettive applicative nel contesto dell'identificazione personale;
- Nuove prospettive nella determinazione dello stato di salute degli individui.

Microbiota Umano

Salute e Malattia : Identificazione personale



Prof.ssa Luciana Caenazzo
Dott.ssa Pamela Tozzo
Dott.ssa Beatrice Marcante

Grazie per la vostra attenzione!

PhD student: Arianna Delicati
arianna.delicati@phd.unipd.it

Alcune immagini sono state create con BioRender.com

29° CONGRESSO GEFI
La genetica forense al servizio della persona fragile

ANALISI DI CAMPIONI COMPLESSI:

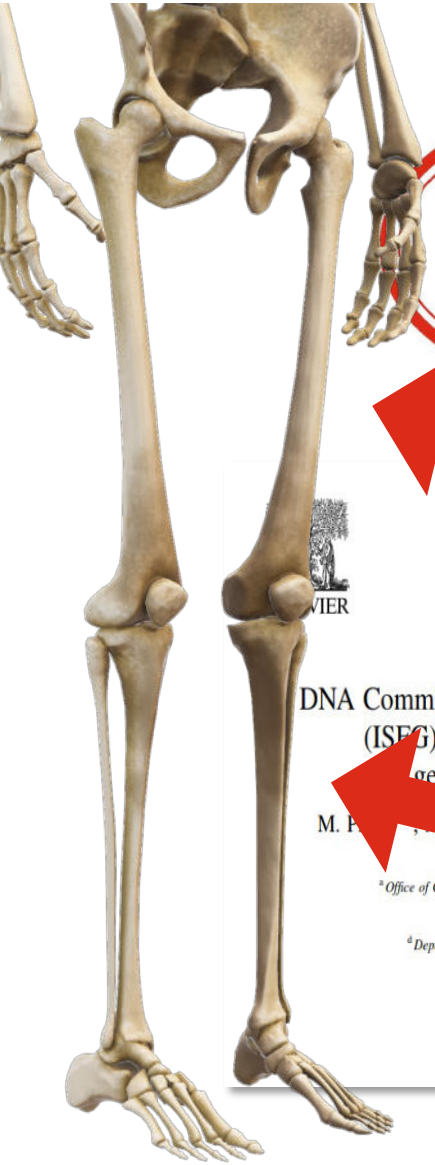
l'esperienza degli antropologi molecolari al servizio della persona fragile

Stefania Morelli[1]
Giulia Cosenza[1], Elena Pilli[1]

1 . IRIS, Infrastruttura per la Ricerca e l'Identificazione di Scheletri senza nome, Università di Firenze

VITTIME SCHELETRIZZATE

SCELTA DELL'ELEMENTO SCHELETRICO



Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Forensic Science International: Genetics 1 (2007) 3–12
FSI GENETICS
www.elsevier.com/locate/fsig

Review

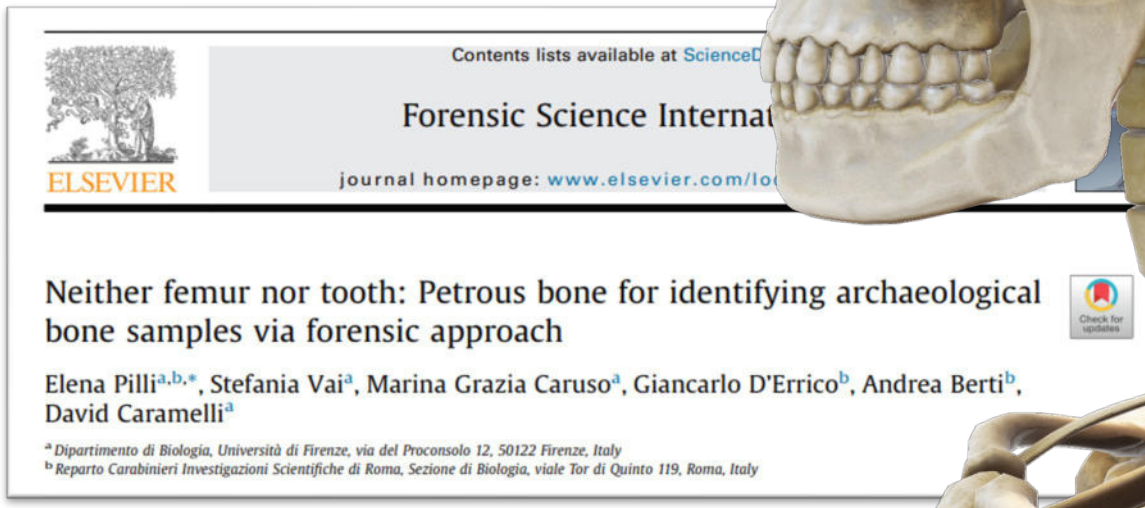
DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI)

M. P[illegible]b, W.R. Mayr[c], N. Morling[d], T.J. Parsons[e], A. Sajantila[f], R. Scheithauer[g], H. Schmitter[h], P.M. Schneider[i]

[a] Office of Chief Medical Examiner, Department of Forensic Biology, 520 First Avenue, New York, NY 10016, USA
[b] Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Santiago de Compostela, Spain
[c] Division of Blood Group Serology, Medical University of Vienna, Austria
[d] Department of Forensic Genetics, Institute of Forensic Medicine, University of Copenhagen, Denmark
[e] International Commission on Missing Persons, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina
[f] Department of Forensic Medicine, University of Helsinki, Finland
[g] Institute of Legal Medicine, Innsbruck Medical University, Austria
[h] Federal Criminal Police Office, Wiesbaden, Germany
[i] Institute of Legal Medicine, University of Cologne, Germany

Received 25 September 2006; accepted 10 October 2006

Lavoro del 2018



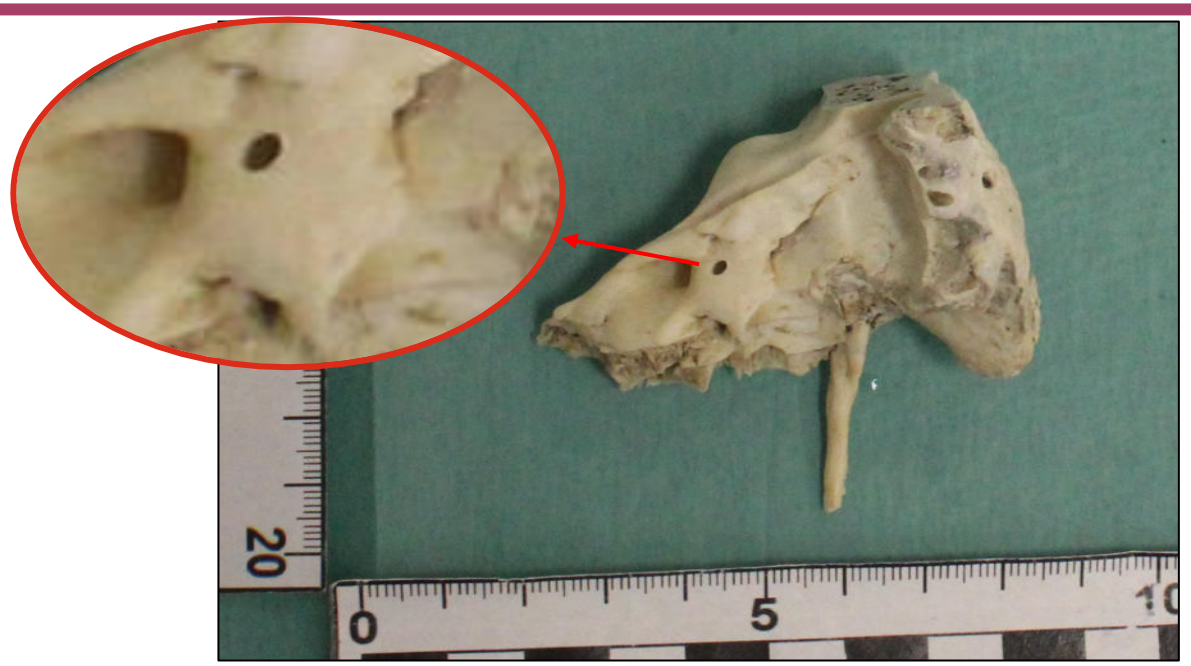
Contents lists available at ScienceD
Forensic Science Internat
journal homepage: www.elsevier.com/lo
ELSEVIER

Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archaeological bone samples via forensic approach

Elena Pilli[a,b,*], Stefania Vai[a], Marina Grazia Caruso[a], Giancarlo D'Errico[b], Andrea Berti[b], David Caramelli[a]

[a] Dipartimento di Biologia, Università di Firenze, via del Proconsolo 12, 50122 Firenze, Italy
[b] Reparto Carabinieri Investigazioni Scientifiche di Roma, Sezione di Biologia, viale Tor di Quinto 119, Roma, Italy

ROCCA PETROSA

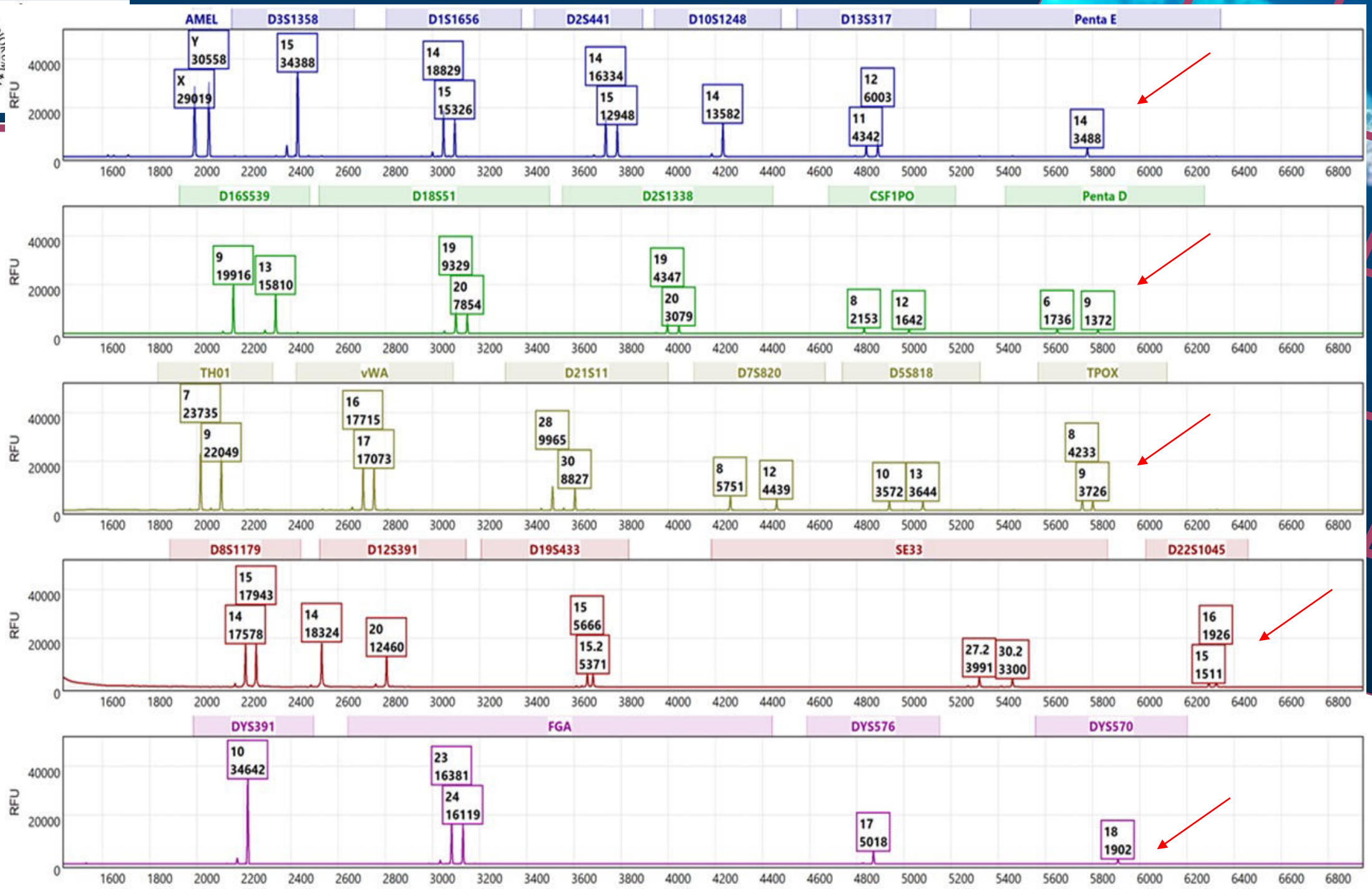


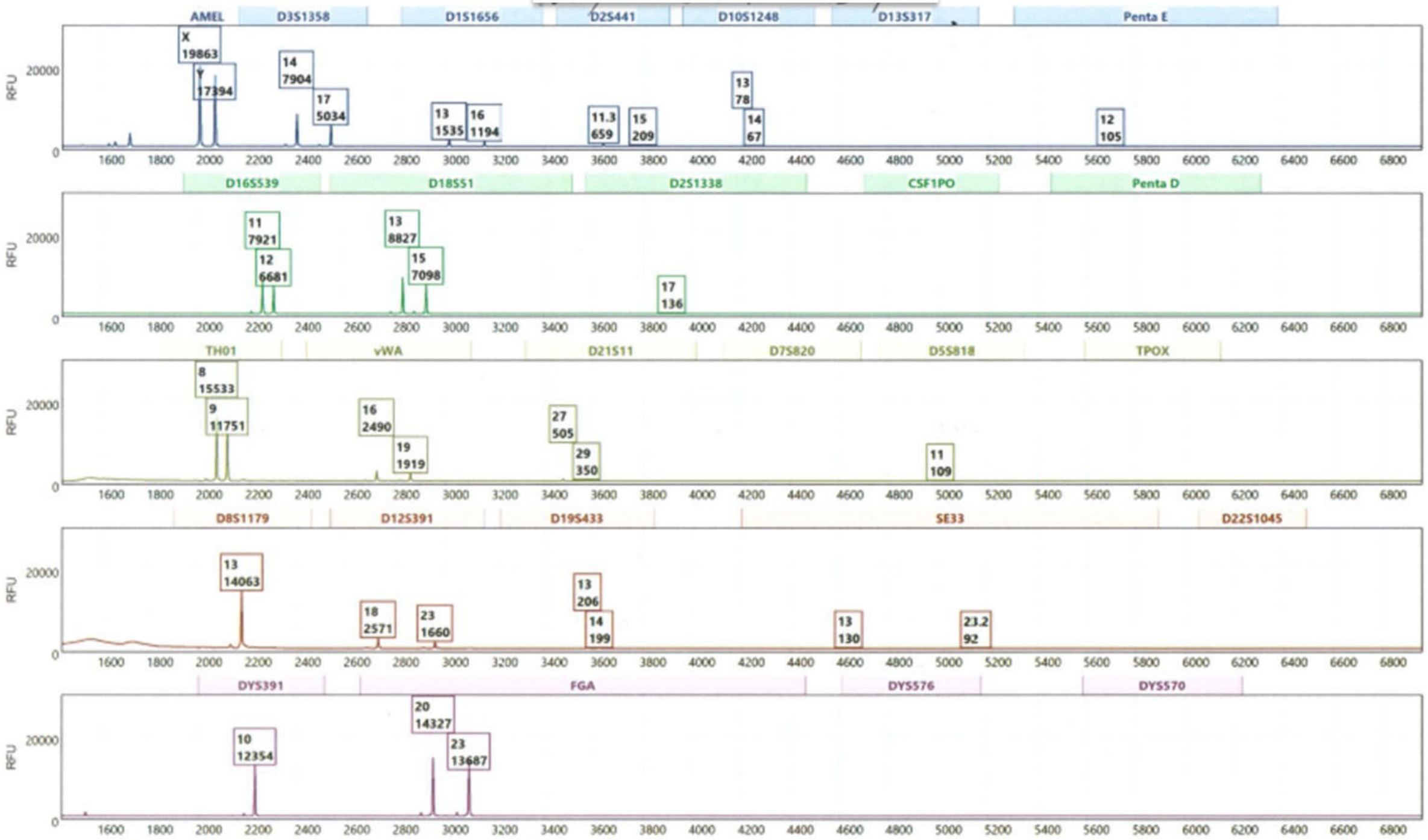
Micro-campionamento

Ossicini uditivi

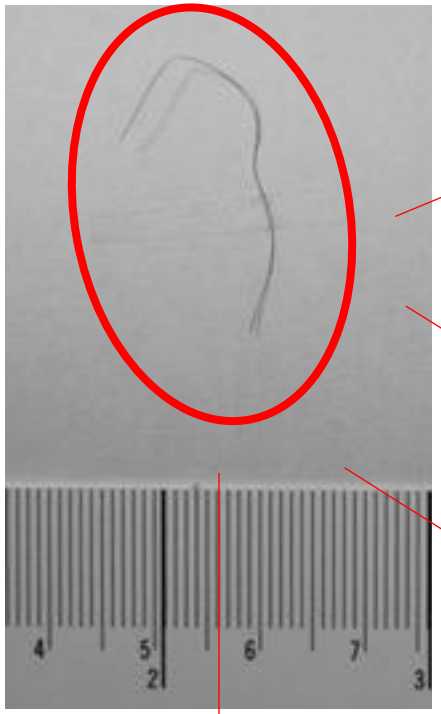
MARTELLO
4x2mm
13 mg

INCUDINE
3x3mm
20 mg

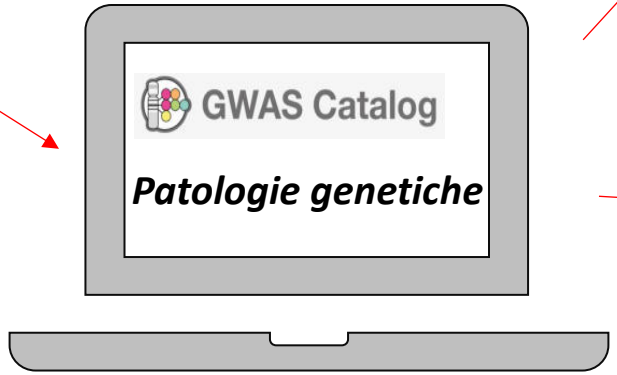

AMEL
Y 30558
X 29019
D3S1358
15 34388
D1S1656
14 18829
15 15326
D2S441
14 16334
15 12948
D10S1248
14 13582
D13S317
12 6003
11 4342
Penta E
14 3488
D16S539
9 19916
13 15810
D18S51
19 9329
20 7854
D2S1338
19 4347
20 3079
CSF1PO
8 2153
12 1642
Penta D
6 1736
9 1372
TH01
7 23735
9 22049
vWA
16 17715
17 17073
D21S11
28 9965
30 8827
D7S820
8 5751
12 4439
D5S818
10 3572
13 3644
TPOX
8 4233
9 3726
D8S1179
15 17943
14 17578
D12S391
14 18324
20 12460
D19S433
15 5666
15.2 5371
SE33
27.2 3991
30.2 3300
D22S1045
16 1926
15 1511
DYS391
10 34642
FGA
23 16381
24 16119
DYS576
17 5018
DYS570
18 1902
RFU
40000
20000
0
1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 3000 3200 3400 3600 3800 4000 4200 4400 4600 4800 5000 5200 5400 5600 5800 6000 6200 6400 6600 6800


AMEL
D3S1358
D1S1656
D2S441
D10S1248
D13S317
Penta E
X 19863
Y 17394
14 7904
17 5034
13 1535
16 1194
11.3 659
15 209
13 78
14 67
12 105
D16S539
D18S51
D2S1338
CSF1PO
Penta D
11 7921
12 6681
13 8827
15 7098
17 136
TH01
vWA
D21S11
D7S820
D5S818
TPOX
8 15533
9 11751
16 2490
19 1919
27 505
29 350
11 109
D8S1179
D12S391
D19S433
SE33
D22S1045
13 14063
18 2571
23 1660
13 206
14 199
13 130
23.2 92
DYS391
FGA
DYS576
DYS570
10 12354
20 14327
23 13687
RFU
20000
0
1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 3000 3200 3400 3600 3800 4000 4200 4400 4600 4800 5000 5200 5400 5600 5800 6000 6200 6400 6600 6800

RECENTE LAVORO



Assegnazione del sesso	XY



ASMA

ID SNP	ALLELE	RISK ALLELE
rs928413	GG	G
rs2305480	GG	G/T
rs2070901	GG	T/C
rs509399	CC	C
rs4129267	CC	T/C
rs1008723	GT	G/T
rs479844	AA	G/A
rs1059513	TT	T/C
rs12413578	CC	C/T
rs3763309	CC	A(G/C
rs734999	CC	C

VITILIGINE

ID SNP	ALLELE	RISK ALLELE
rs6544997	GG	G
rs13076312	CC	T/C
rs3823355	CC	T/C
rs11966200	CC	A/C
rs3806156	GG	T/G/A
rs853308	CC	G/C
rs561079	TT	T
rs2304206	GA	G
rs2833607	GG	A/G
rs4822024	GG	G/C
rs706779	TT	T/A

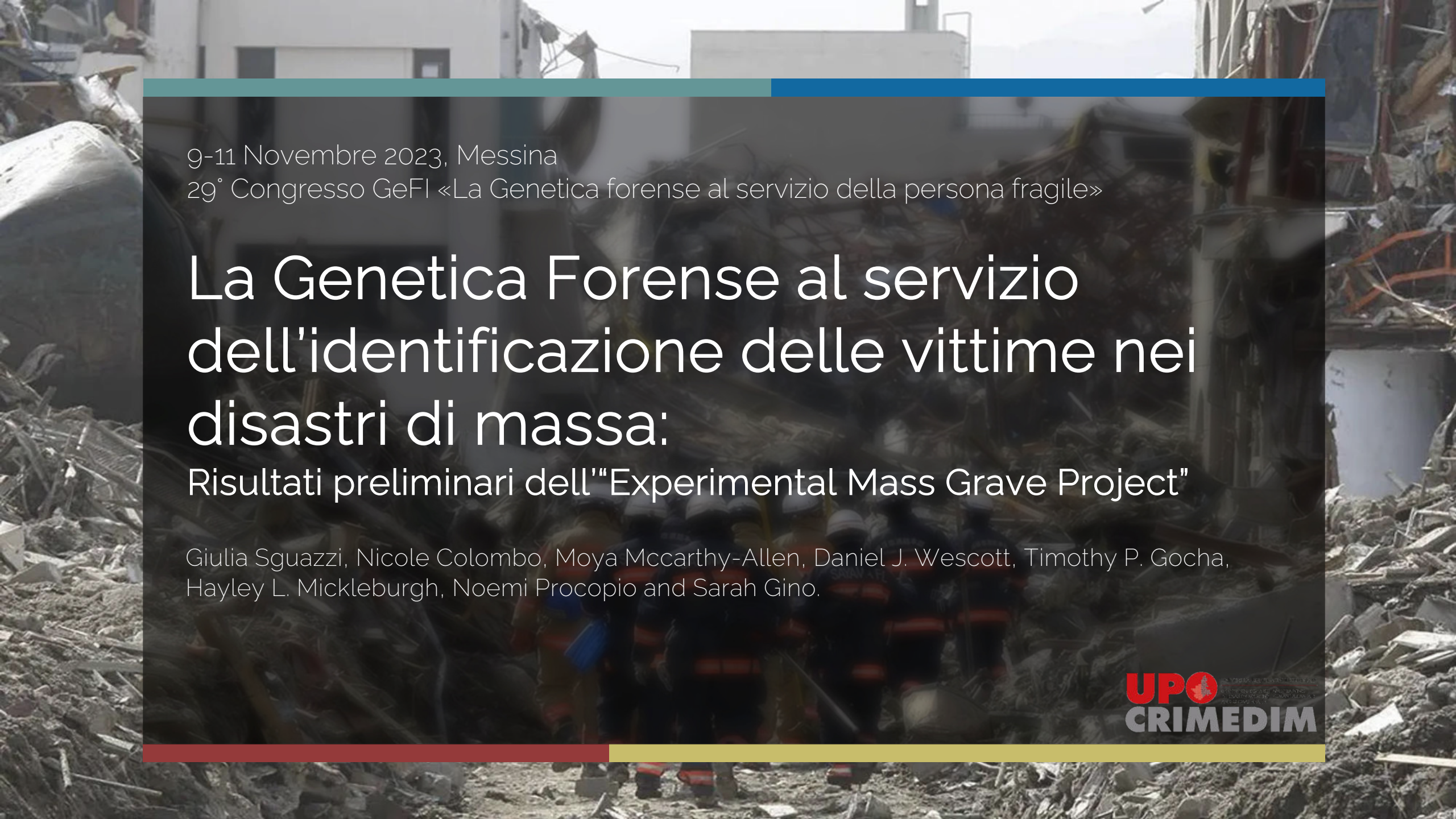
IRIS

Infrastruttura per la
Ricerca e
l'**I**dentificazione di
Scheletri senza nome

Prof.ssa ELENA PILLI

Dott.ssa Giulia Cosenza

DOTT.SSA STEFANIA MORELLI
stefania.morelli@unifi.it



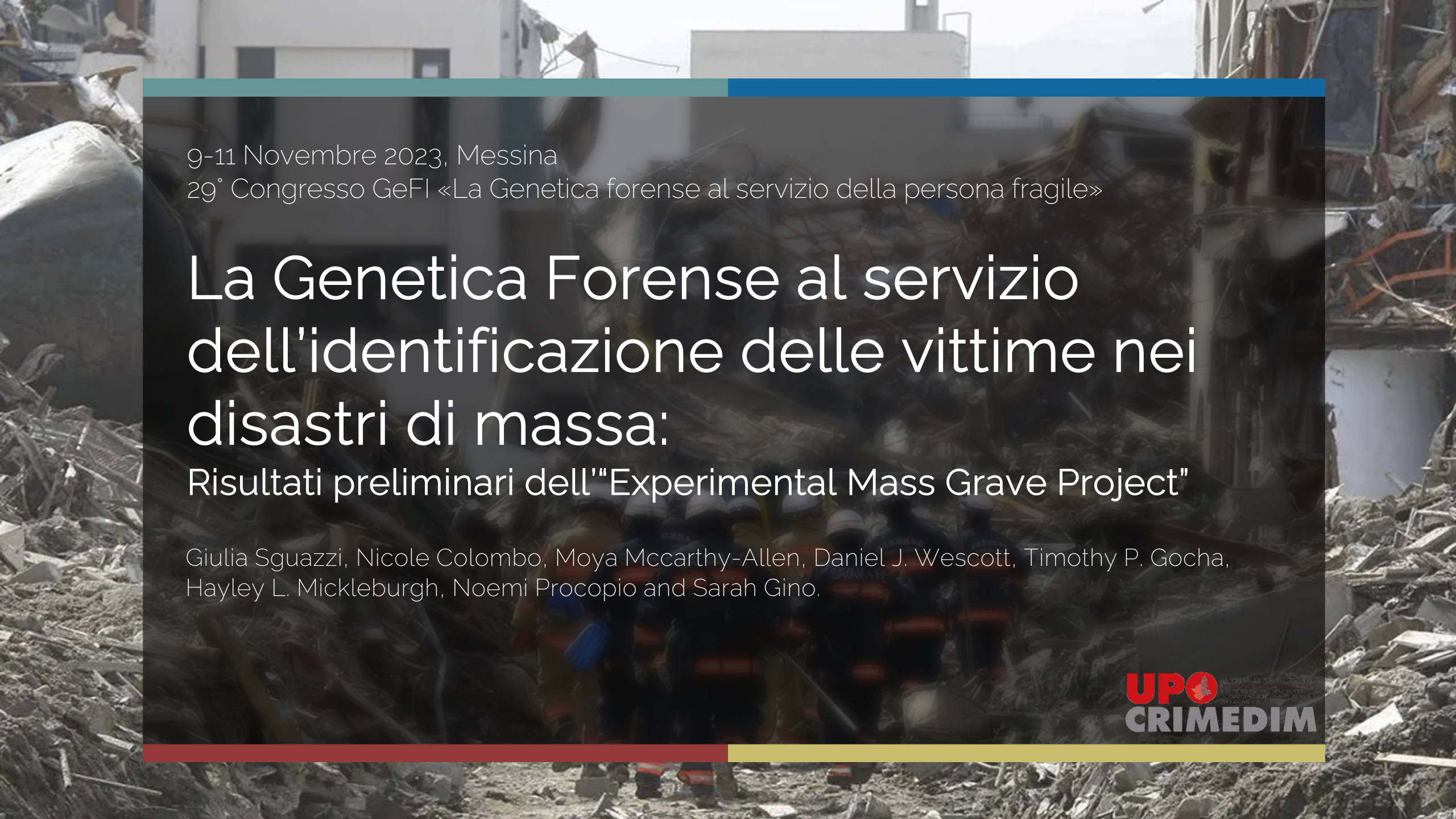
9-11 Novembre 2023, Messina
29° Congresso GeFI «La Genetica forense al servizio della persona fragile»

La Genetica Forense al servizio dell'identificazione delle vittime nei disastri di massa:

Risultati preliminari dell'"Experimental Mass Grave Project"

Giulia Sguazzi, Nicole Colombo, Moya Mccarthy-Allen, Daniel J. Wescott, Timothy P. Gocha, Hayley L. Mickleburgh, Noemi Procopio and Sarah Gino.

UPO CRIMEDIM



9-11 Novembre 2023, Messina
29° Congresso GeFI «La Genetica forense al servizio della persona fragile»

La Genetica Forense al servizio dell'identificazione delle vittime nei disastri di massa:

Risultati preliminari dell'"Experimental Mass Grave Project"

Giulia Sguazzi, Nicole Colombo, Moya Mccarthy-Allen, Daniel J. Wescott, Timothy P. Gocha, Hayley L. Mickleburgh, Noemi Procopio and Sarah Gino.

UPO CRIMEDIM

Disastro di massa

[World Health Organization, Mass casualty management systems : strategies and guidelines for building health sector capacity, (2007) 38. https://www.who.int/hac/techguidance/tools/mcm_guidelines_en.pdf.
Disaster | UNDRR, (n.d.). https://www.undrr.org/terminology/disaster]

qualsiasi evento di varia natura che possa determinare lesioni importanti o la morte ad un *elevato numero di individui*. Un evento che genera *più pazienti contemporaneamente*, una grave interruzione del funzionamento di una comunità o di una società su qualsiasi scala portando a : *perdite e impatti umani*, *materiali*, *economici* e *ambientali*.

Disastro di massa

[World Health Organization, Mass casualty management systems : strategies and guidelines for building health sector capacity, (2007) 38. https://www.who.int/hac/techguidance/tools/mcm_guidelines_en.pdf.
Disaster | UNDRR, (n.d.). https://www.undrr.org/terminology/disaster]

qualsiasi evento di varia natura che possa determinare lesioni importanti o la morte ad un *elevato numero di individui*. Un evento che genera *più pazienti contemporaneamente*, una grave interruzione del funzionamento di una comunità o di una società su qualsiasi scala portando a : *perdite e impatti umani*, *materiali*, *economici* e *ambientali*.

Dignità

Rispetto

Giustizia

Innovazione tecnologica

Multidisciplinarietà

Mass Grave Project

h.l.mickleburgh@uva.nl

Questa ricerca appartiene al “Experimental Mass Grave Project” (MGP) condotto presso il Forensic Anthropology Center della Texas State University (FACTS). Uno studio multidisciplinare volto a studiare a livello macroscopico, microscopico e biomolecolare l’intero processo di decomposizione di corpi umani all’interno di una fossa comune e tre tombe singole durante 18 mesi di inumazione.

**I corpi sono stati donati alla FACTS nell'ambito dell'*Uniform Anatomical Gift Act*

***il MGP soddisfa tutti gli standard e i requisiti etici e legali

Mickleburgh, H., Alexander, B., Doro, K., Forbes, S., Ford, A., Gino, S., ... & Wescott, D. (2022, January). Actualistic experimental replication of a small-sized mass grave. In 74th American Academy of Forensic Sciences Annual Scientific Meeting.

Mickleburgh, H. L., & Wescott, D. J. (2021). The Mass Grave Project: An experimental taphonomic study aimed at advancing methods of detection and documentation of mass graves and human identification. European Meeting on Forensic Archaeology, Geneva.

University of Central Lancashire UCLan

TEXAS STATE UNIVERSITY

UNIVERSITY OF AMSTERDAM

UPO CRIMEDIM UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE CENTER FOR RESEARCH AND TRAINING IN DISASTER MEDICINE, HUMANITARIAN AID AND GLOBAL HEALTH

Mass Grave Project

Il TEAM

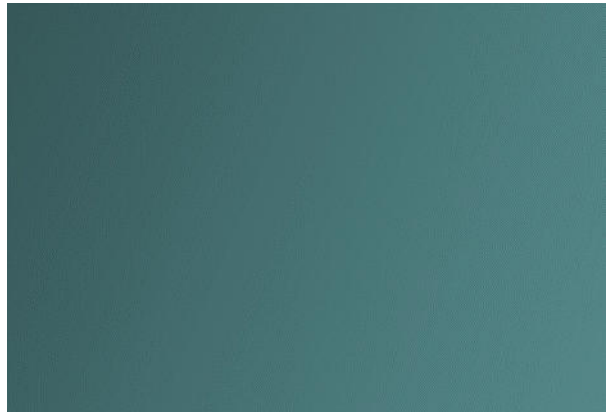
Il team di questo studio multidisciplinare si occupa, rivestendo competenze specifiche, dello sviluppo di tecniche investigative in materia di rilevamento, scavo, analisi delle prove e documentazione nel processo d'identificazione delle vittime di disastro (Disaster Victims Identification - DVI).

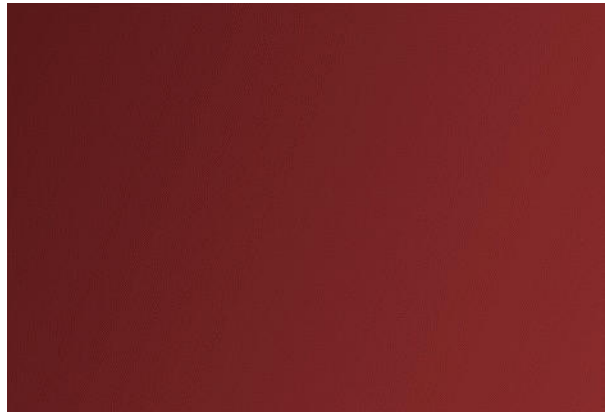
University of Central Lancashire UCLan

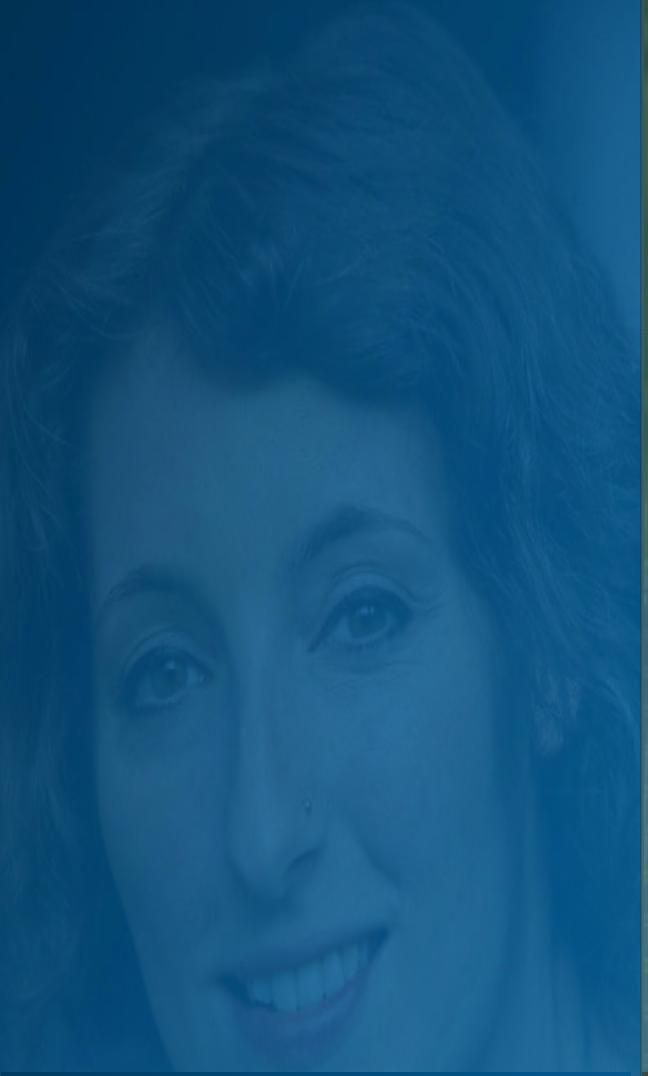
TEXAS STATE UNIVERSITY

UNIVERSITY OF AMSTERDAM

UPO UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE CRIMEDIM CENTER FOR RESEARCH AND TRAINING IN DISASTER MEDICINE, HUMANITARIAN AID AND GLOBAL HEALTH





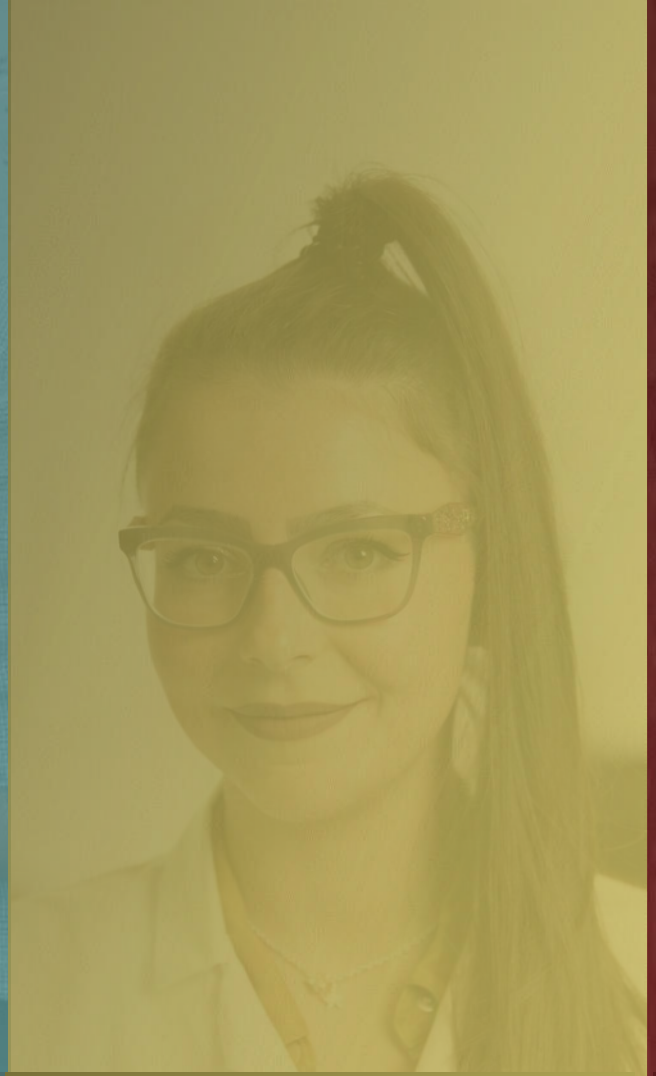


Dr. HAYLEY l. MICKLEBURGH

ARCHEOLOGIA FORENSE (P.I)

Prof. DANIEL J. WESCOTT
Dr. TIMOTHY P. GOCHA

ANTROPOLOGIA FORENSE (co-P.I)



Dr. NOEMI PROCOPIO

PROTEOMICA E METABOLOMICA

Prof.ssa SARAH GINO

MEDICINA LEGALE E GENETICA FORENSE

Dr. HAYLEY I. MICKLEBURGH

ARCHEOLOGIA FORENSE (P.I)

Prof. DANIEL J. WESCOTT
Dr. TIMOTHY P. GOCHA

ANTROPOLOGIA FORENSE (co-P.I)

Dr. NOEMI PROCOPIO

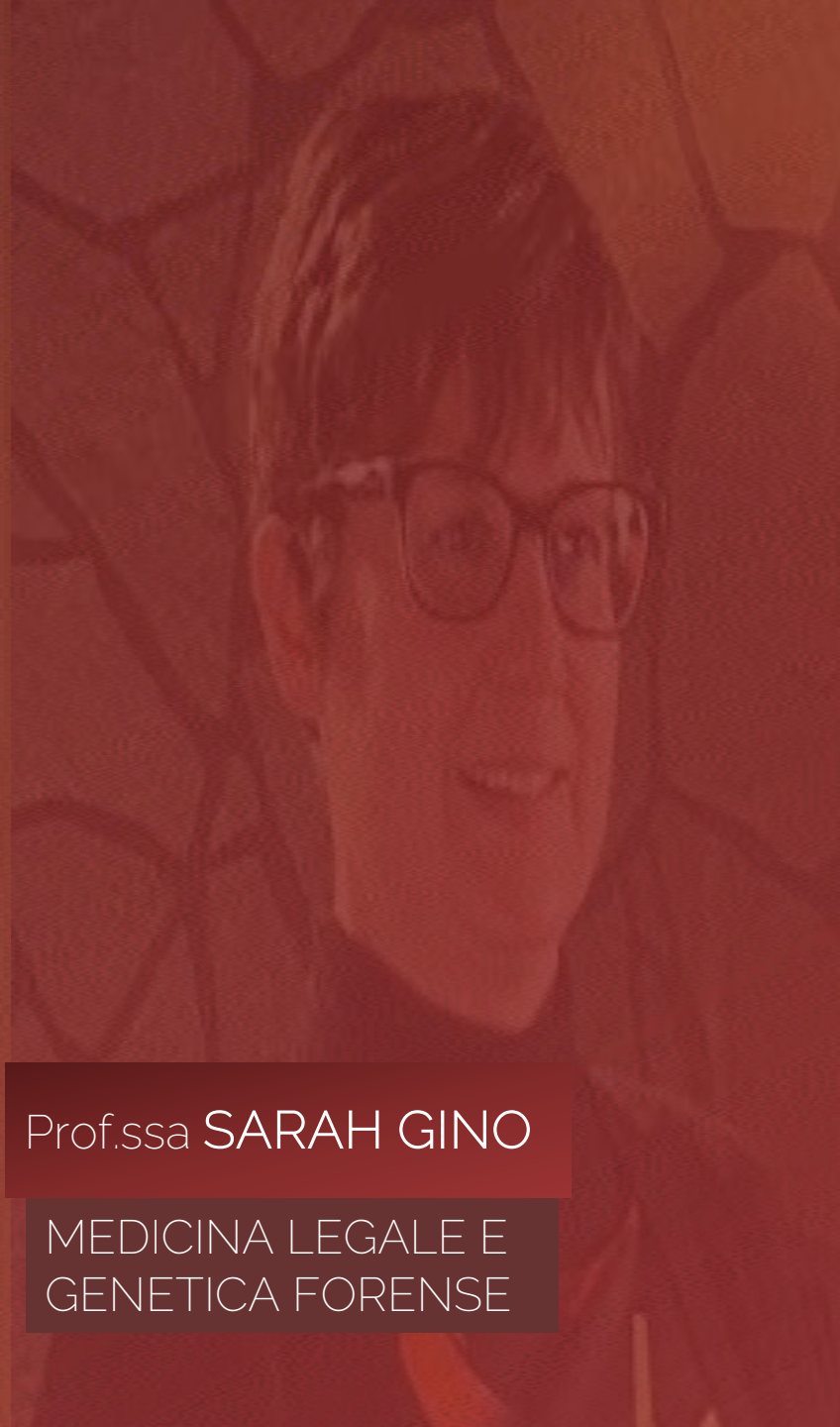
PROTEOMICA E METABOLOMICA

Prof.ssa SARAH GINO

MEDICINA LEGALE E GENETICA FORENSE

Valutazione della completezza delle informazioni genetiche ottenute da tessuti molli.

Possibile correlazione tra la bontà dei profili genetici ottenuti ed il grado di decomposizione, le caratteristiche della sepoltura e la posizione nella fossa comune.



Prof.ssa SARAH GINO

MEDICINA LEGALE E GENETICA FORENSE

Dr. HAYLEY I. MICKLEBURGH

ARCHEOLOGIA FORENSE (P.I)

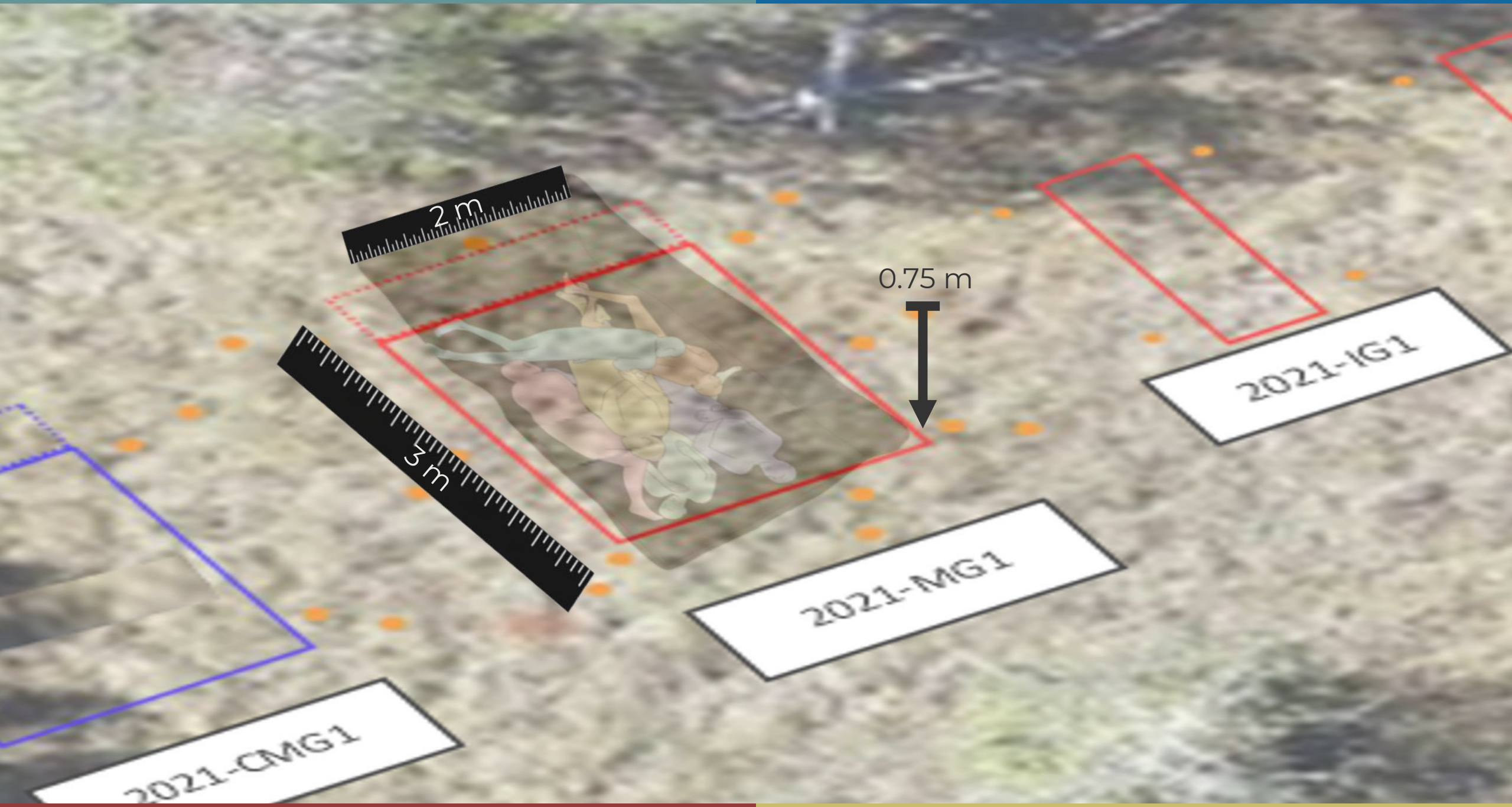
Prof. DANIEL J. WESCOTT
Dr. TIMOTHY P. GOCHA

ANTROPOLOGIA FORENSE (co-P.I)

Dr. NOEMI PROCOPIO

PROTEOMICA E METABOLOMICA

2021-CMG1
2021-MG1
2021-IG1
2021-IG2
2021-IG3
2021-CIG1
FORENSIC
ANTHROPOLOGY
RESEARCH FACILITY
TEXAS STATE
UNIVERSITY
UNIVERSITY
OF AMSTERDAM
N


2 m
3 m
0.75 m
2021-IG1
2021-MG1
2021-CMG1

1 **Campioni Pre-Congelamento**

All'arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2 **Campioni Post-Congelamento**

Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

11 – 455 giorni

3 **Campioni Post-Esumazione**

Esumazione dei corpi e campionamento.

10/2022

4 **Analisi dei campioni**

01/2023

1

Campioni Pre-Congelamento

All’arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2

Campioni Post-Congelamento

Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

11 – 455 giorni

3

Campioni Post-Esumazione

Esumazione dei corpi e campionamento.

10/2022

4

Analisi dei campioni

01/2023

1. **Campioni Pre-Congelamento**

   All'arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2. **Campioni Post-Congelamento**

   Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

   11 – 455 giorni

3. **Campioni Post-Esumazione**

   Esumazione dei corpi e campionamento.

   10/2022

4. **Analisi dei campioni**

   01/2023

7 TAMPONI CUTANEI (collo)

7 TAMPONI ORALI

7 TAMPONI RETTALI

1 **Campioni Pre-Congelamento**

All'arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2 **Campioni Post-Congelamento**

Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

11 – 455 giorni

3 **Campioni Post-Esumazione**

Esumazione dei corpi e campionamento.

10/2022

4 **Analisi dei campioni**

01/2023

9 TAMPONI CUTANEI (collo)

9 TAMPONI ORALI

9 TAMPONI RETTALI

1. **Campioni Pre-Congelamento**

   All'arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2. **Campioni Post-Congelamento**

   Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

   11 – 455 giorni

3. **Campioni Post-Esumazione**

   Esumazione dei corpi e campionamento.

   10/2022

4. **Analisi dei campioni**

   01/2023

9 TAMPONI CUTANEI (collo)

9 TAMPONI PERIOCULARI

9 MUSCOLO

9 TAMPONI ORALI

2 CUTE

5 ORGANI INTERNI

9 TAMPONI RETTALI

9 UNGHIE

10 CARTILAGINE

9 PUNTI DI CONTATTO

1 **Campioni Pre-Congelamento**

All'arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2 **Campioni Post-Congelamento**

Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

11 – 455 giorni

3 **Campioni Post-Esumazione**

Esumazione dei corpi e campionamento.

10/2022

4 **Analisi dei campioni**

01/2023

100%

profili con numero di loci **maggiore** di 7

1 **Campioni Pre-Congelamento**

All'arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2 **Campioni Post-Congelamento**

Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

11 – 455 giorni

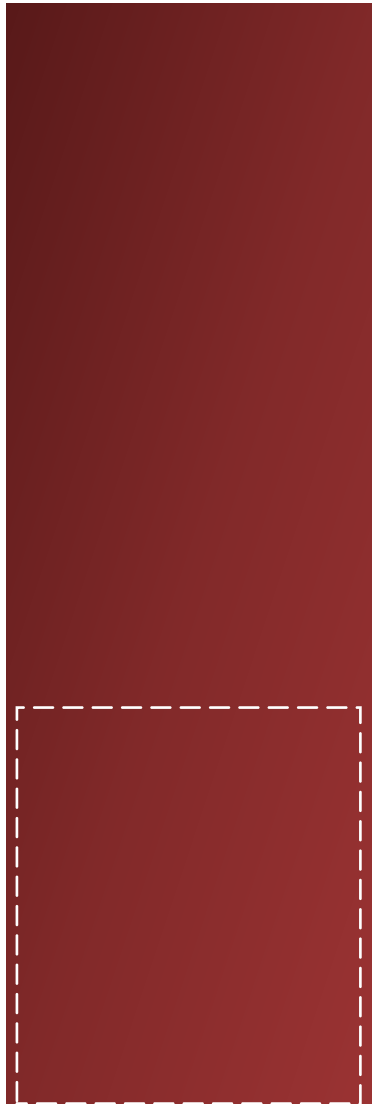
3 **Campioni Post-Esumazione**

Esumazione dei corpi e campionamento.

10/2022

4 **Analisi dei campioni**

01/2023



100%
profili con numero di loci **maggiore** di 7

40%
profili incompleti

1. **Campioni Pre-Congelamento**

All'arrivo dei corpi alla FACTS, i donatori sono stati sottoposti a campionamento.

2. **Campioni Post-Congelamento**

Congelamento dei corpi a -20°C prima di essere ricampionati e inumati.

11 – 455 giorni

3. **Campioni Post-Esumazione**

Esumazione dei corpi e campionamento.

10/2022

4. **Analisi dei campioni**

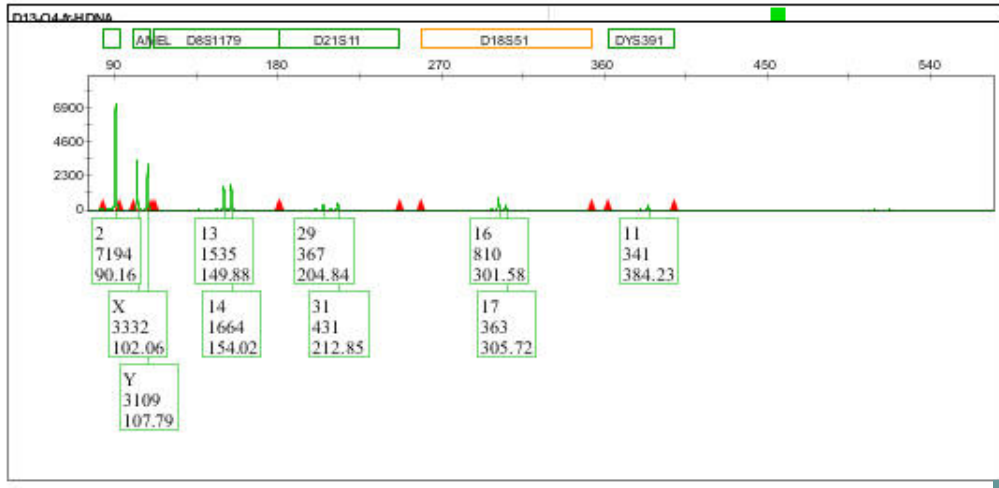
01/2023

63%
tipizzazione **fallita**

23%
profili con numero di loci **minore** di 7

14%
profili con numero di loci **maggiore** di 7

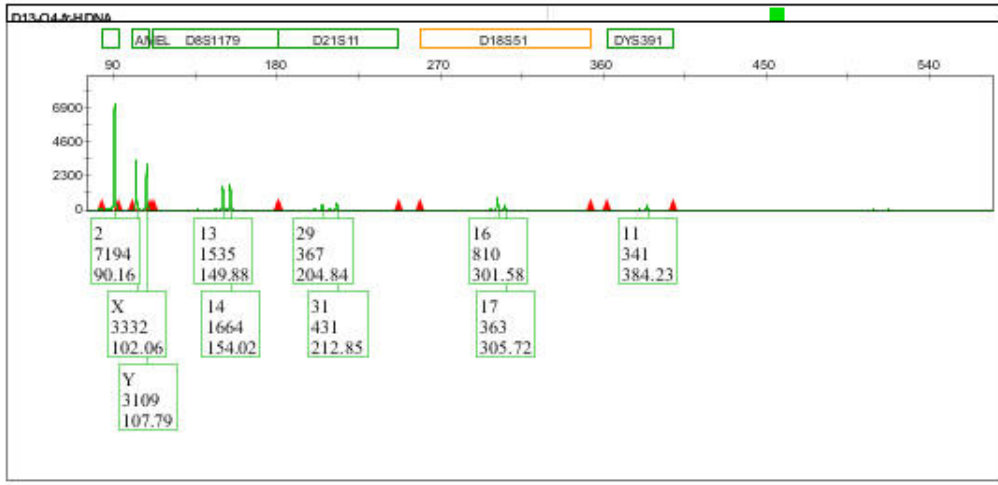
D13.Orale
Pre-Congelamento



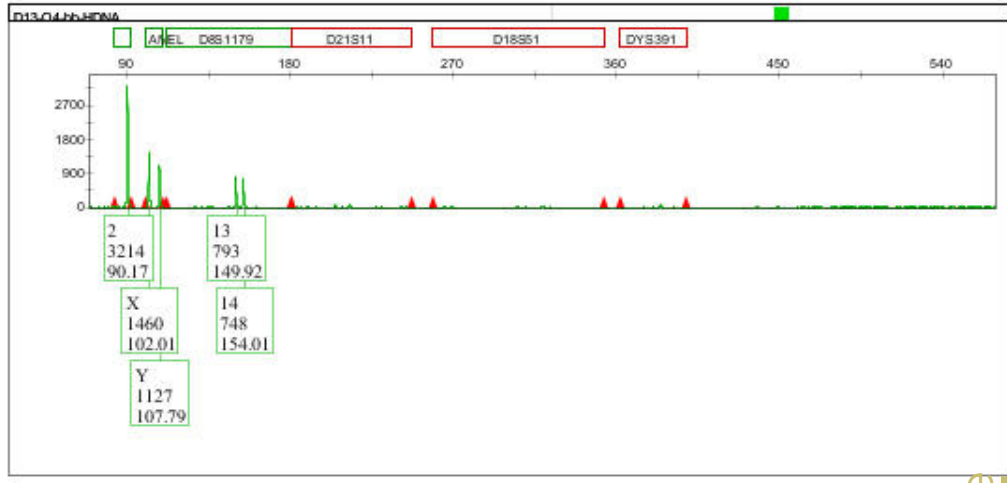
D13.Orale
Post-Congelamento

D13.Orale
Post-Esumazione

D13.Orale
Pre-Congelamento

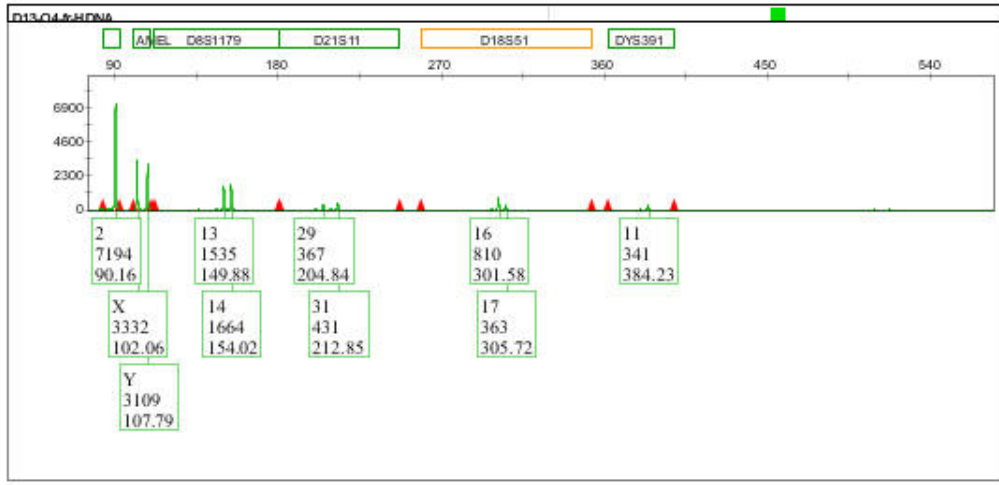


D13.Orale
Post-Congelamento

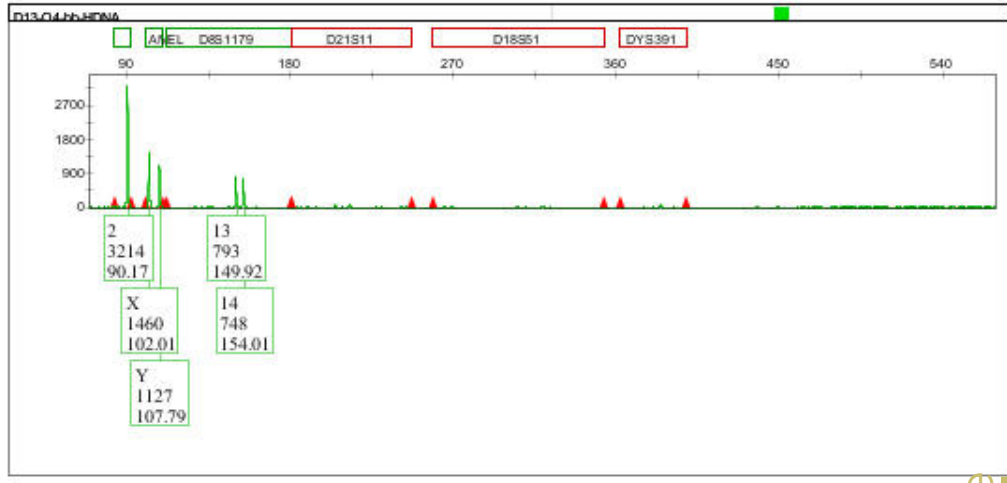


D13.Orale
Post-Esumazione

D13.Orale Pre-Congelamento



D13.Orale Post-Congelamento



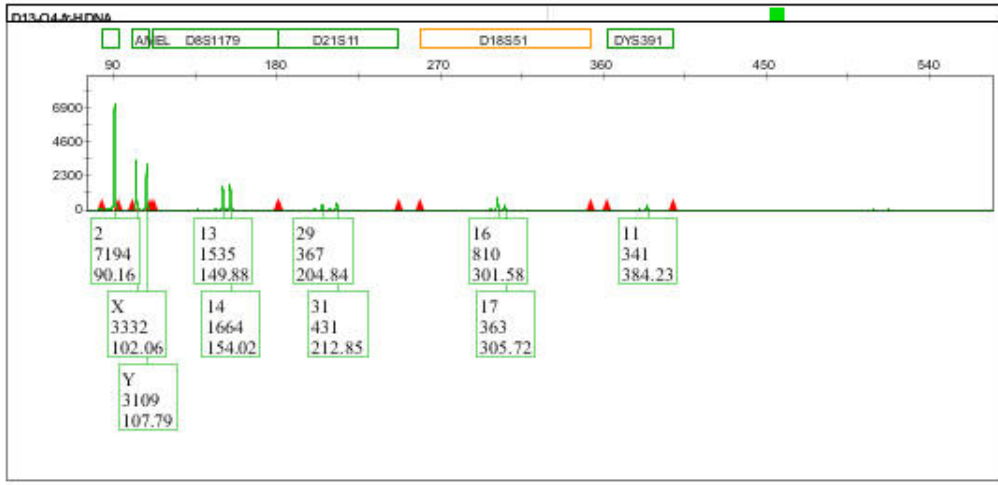
D13.Orale Post-Esumazione

Quantifiler Trio

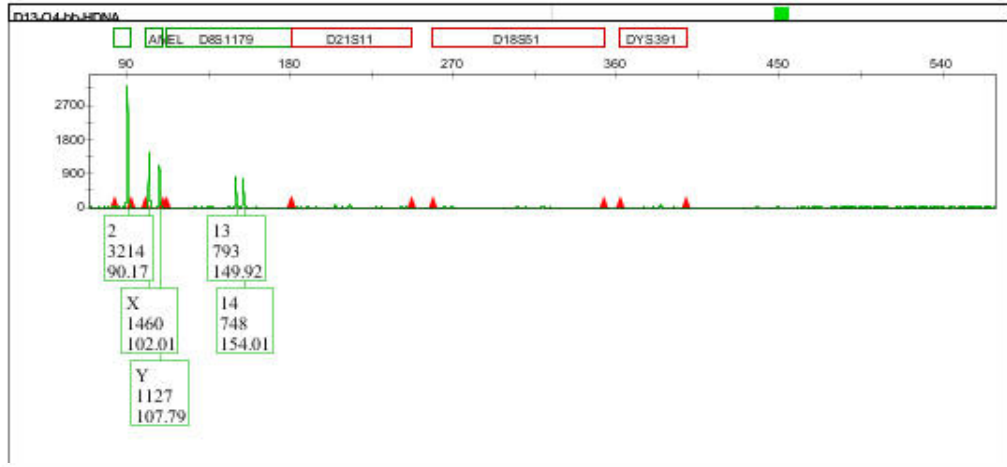
Human DNA	Male	Degradation Index
n.a.	n.a.	n.a.

D13.Rettale Post-Esumazione

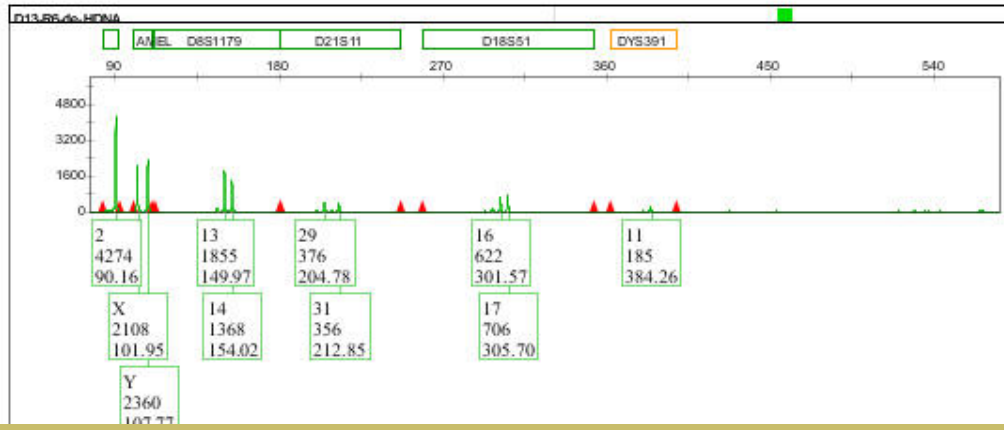
D13.Orale
Pre-Congelamento



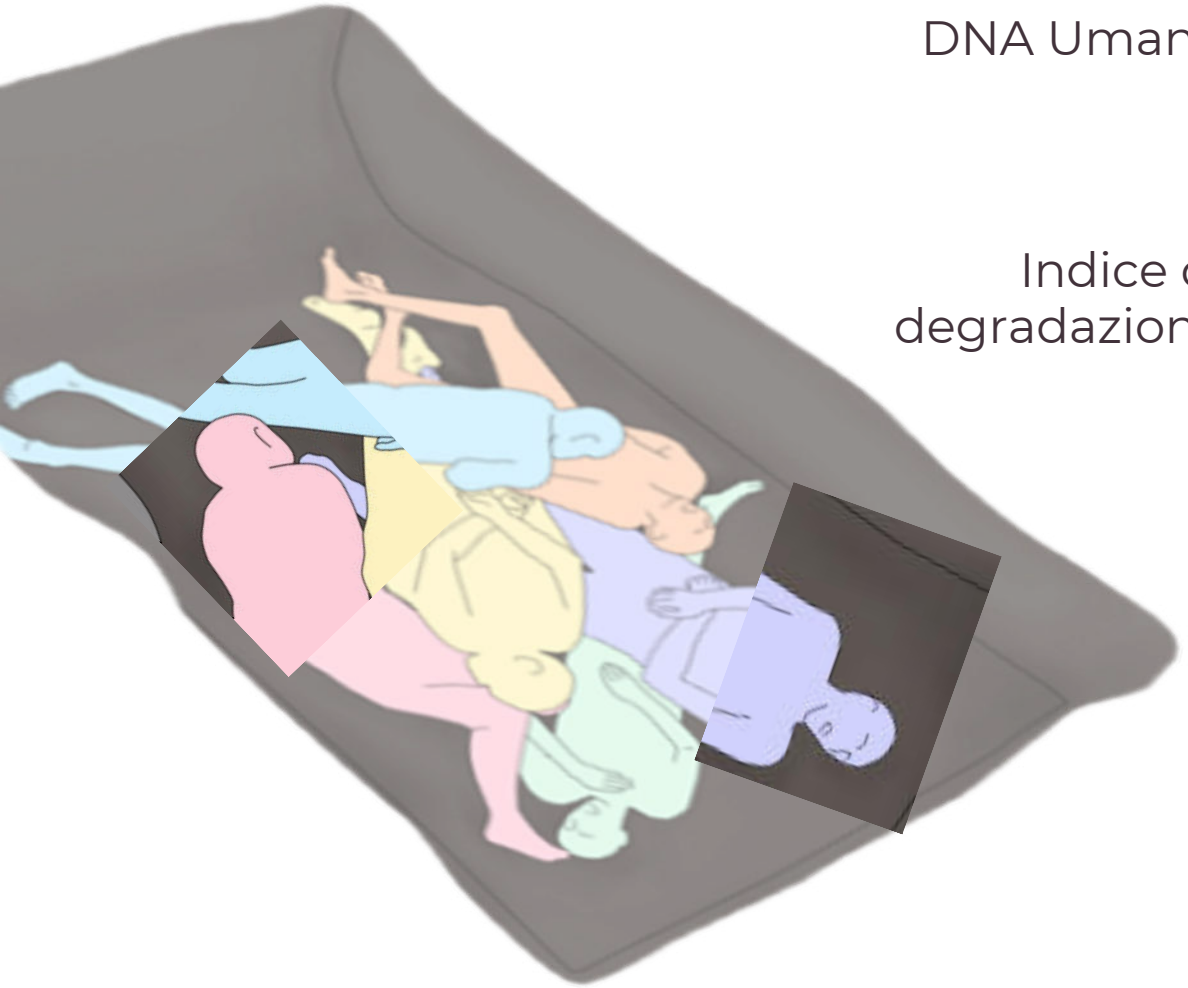
D13.Orale
Post-Congelamento



D13.Rettale
Post-Esumazione



Punto di Contatto26B



DNA Umano **0,030 ng/ul**

Indice di degradazione **3,956**

	Allele 1	Allele 2	Allele 3
D3S1358	16	17	18
vWA	14	17	19
D16S539	10	13	
CSF1PO			
TPOX	8	9	
Y indel	2		
AMEL	X	Y	
D8S1179	13	14	
D21S11	29	31.2	
D18S51	12	16	
DYS391			
D2S441	10	11	15
D19S433	14	15	
TH01	6	6	
FGA	23	24	
D22S1045	15	16	17
D5S818	9	11	12
D13S317	12	12	
D7S820	8	8	
SE33	22.2	29.2	
D10S1248	14	15	17
D1S1656	12	17.3	
D12S391	17	19	
D2S1338	19	24	

Considerazioni Post-Esumazione

Degradazione

Nella fossa comune si osserva una minor degradazione del DNA.

Conservazione

Nella fossa comune si osservano livelli maggiori di conservazione dei corpi.

Contaminazione

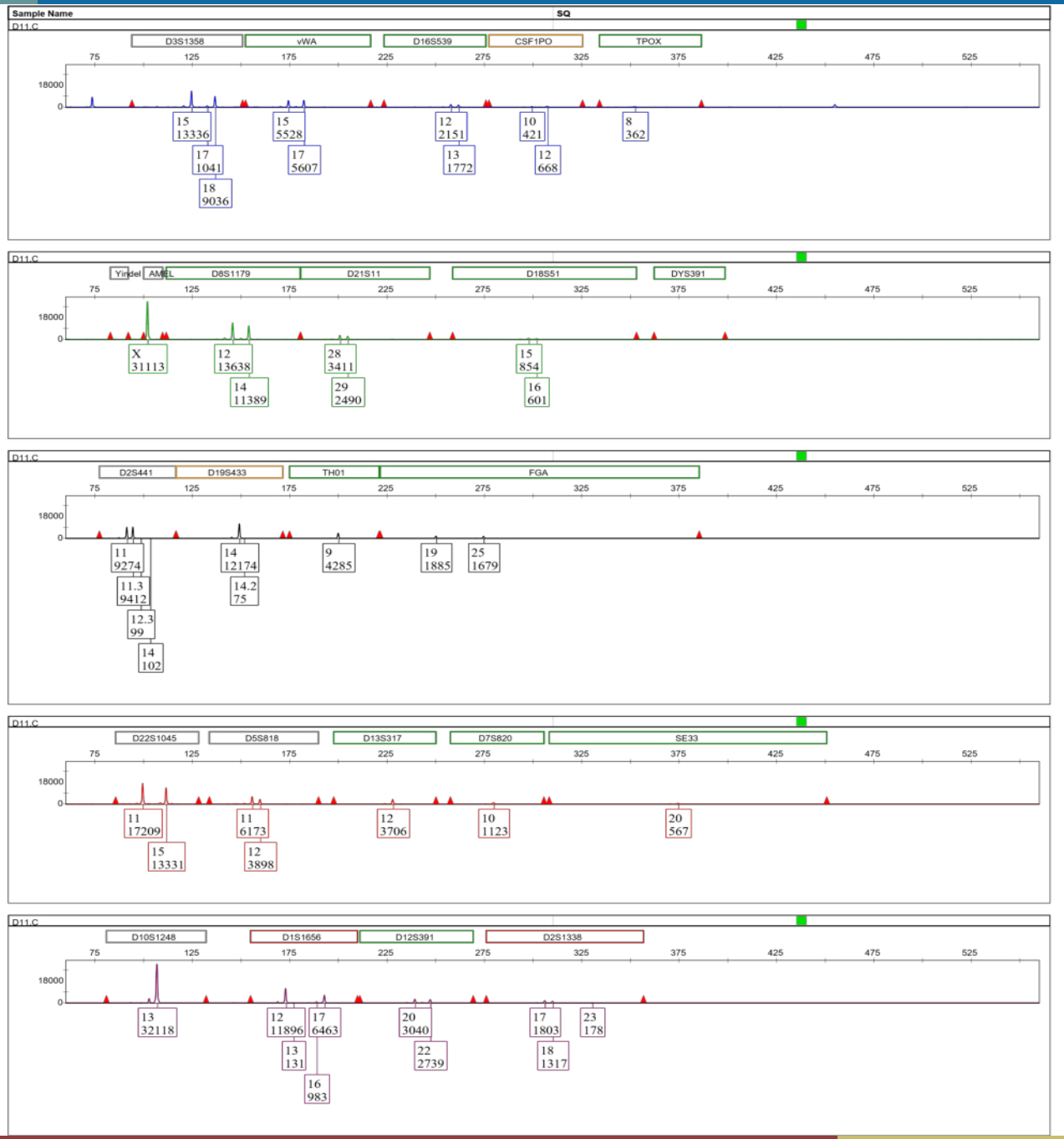
Evidenza di fenomeni di contaminazione incrociata di materiale biologico.

D11.Cartilagine Post-Esumazione

DNA Umano: 0,12 ng/ul

Degradation Index: 2,6

	Allele 1	Allele 2
D3S1358	15	18
vWA	15	17
D16S539	12	12
CSF1PO	10	10
TPOX	-	-
Y indel	NA	NA
AMEL	X	X
D8S1179	12	14
D21S11	-	-
D18S51	15	16
DYS391	-	-
D2S441	11	11.3
D19S433	14	14
TH01	9	9
FGA	25	25
D22S1045	11	15
D5S818	11	12
D13S317	12	12
D7S820	-	-
SE33	20	20
D10S1248	13	13
D1S1656	12	17
D12S391	-	-
D2S1338	-	-

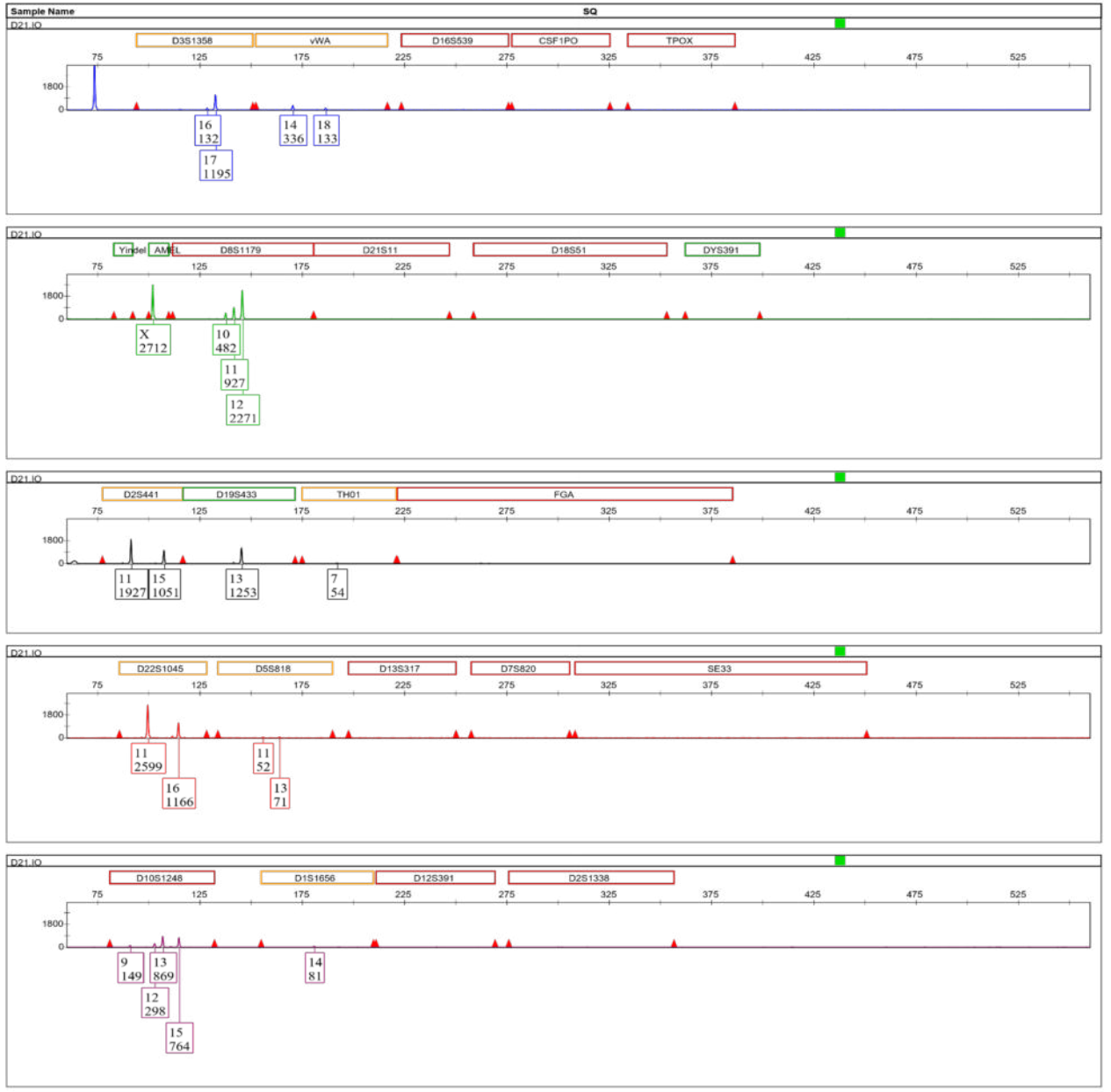


D21.Organi Interni Post-Esumazione

DNA Umano: 0,015 ng/ul

Degradation Index: 10,52

	Allele 1	Allele 2
D3S1358	17	17
vWA	14	18
D16S539	11	13
CSF1PO	10	12
TPOX	8	9
Y indel	NA	NA
AMEL	X	X
D8S1179	11	12
D21S11	32	32.2
D18S51	12	18
DYS391	NA	NA
D2S441	11	15
D19S433	13	13
TH01	6	7
FGA	22	23
D22S1045	11	16
D5S818	11	13
D13S317	8	13
D7S820	8	11
SE33	21.2	26.2
D10S1248	13	15
D1S1656	14	17
D12S391	21	24
D2S1338	16	23

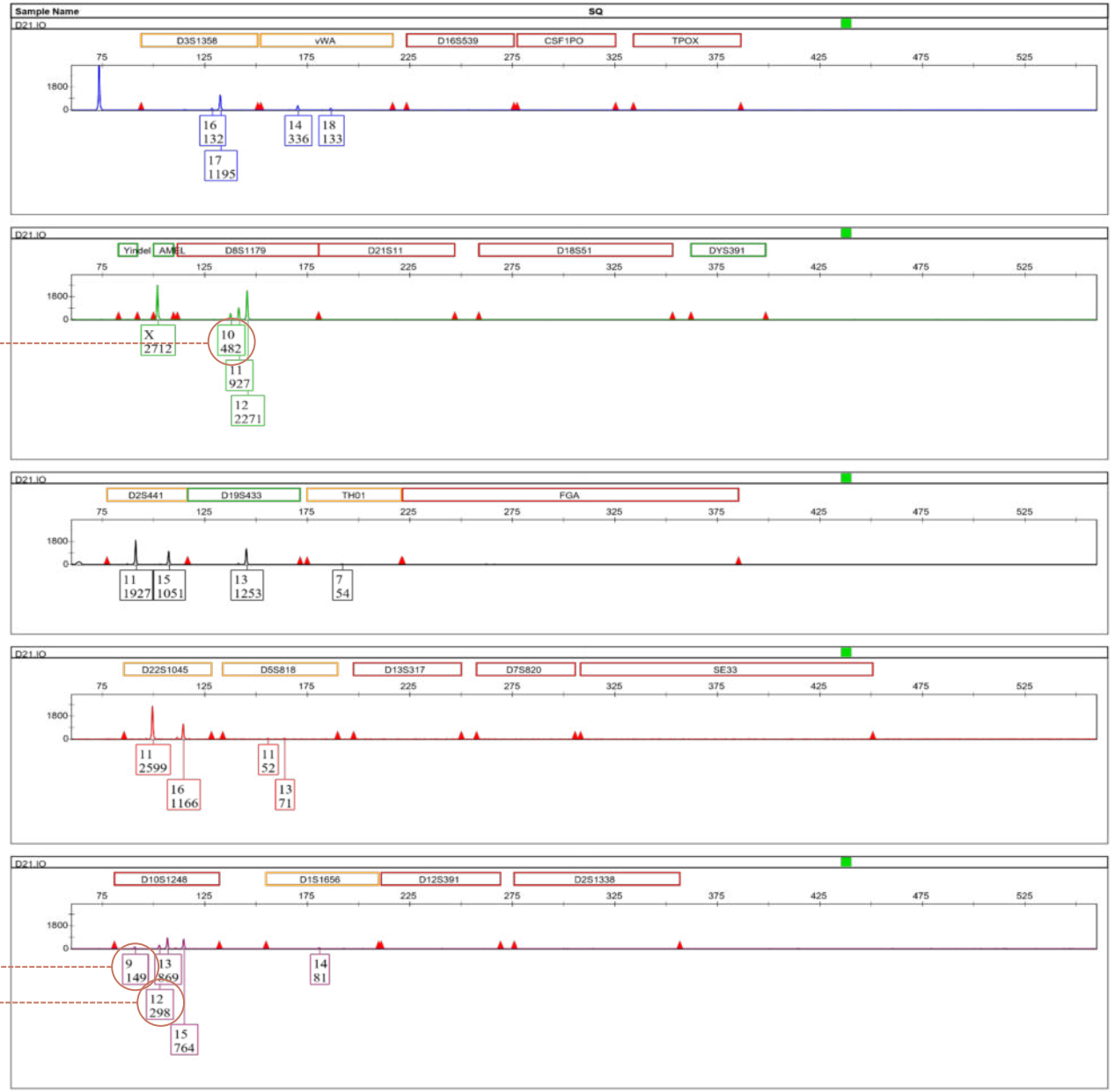


D21.Organi Interni Post-Esumazione

	Allele 1	Allele 2
D3S1358	17	17
vWA	14	18
D16S539	11	13
CSF1PO	10	12
TPOX	8	9
Y indel	NA	NA
AMEL	X	X
D8S1179	11	12
D21S11	32	32.2
D18S51	12	18
DYS391	NA	NA
D2S441	11	15
D19S433	13	13
TH01	6	7
FGA	22	23
D22S1045	11	16
D5S818	11	13
D13S317	8	13
D7S820	8	11
SE33	21.2	26.2
D10S1248	13	15
D1S1656	14	17
D12S391	21	24
D2S1338	16	23

DROP-IN

DROP-IN



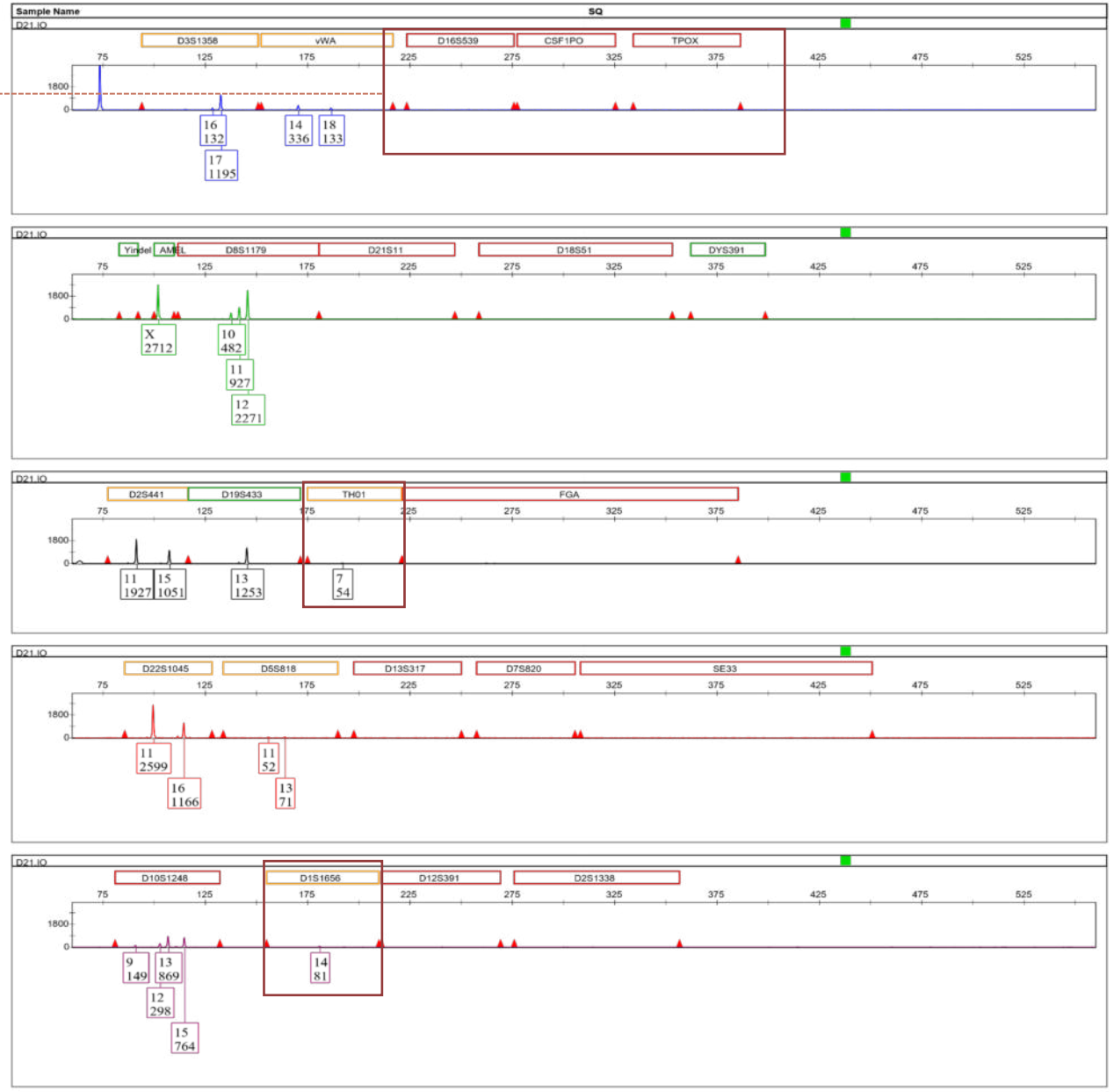
D21.Organi Interni Post-Esumazione

	Allele 1	Allele 2
D3S1358	17	17
vWA	14	18
D16S539	11	13
CSF1PO	10	12
TPOX	8	9
Y indel	NA	NA
AMEL	X	X
D8S1179	11	12
D21S11	32	32.2
D18S51	12	18
DYS391	NA	NA
D2S441	11	15
D19S433	13	13
TH01	6	7
FGA	22	23
D22S1045	11	16
D5S818	11	13
D13S317	8	13
D7S820	8	11
SE33	21.2	26.2
D10S1248	13	15
D1S1656	14	17
D12S391	21	24
D2S1338	16	23

locus DROP-OUT

DROP-OUT

DROP-OUT



Conclusioni

Il congelamento e la sepoltura possono influenzare l'identificazione personale

Risulta buona norma campionare quanti più tessuti/fluidi biologici possibili al fine di identificare con successo un cadavere sconosciuto.

Ringraziamenti

Ai donatori dei corpi e le loro famiglie, il cui dono estremamente prezioso ha reso possibile questa ricerca.

9-11 Novembre 2023, Messina
29° Congresso GeFI «La Genetica forense al servizio della persona fragile»

Grazie per l'attenzione

This presentation is the result of a study conducted in the framework of the International PhD in Global Health, Humanitarian Aid, and Disaster Medicine organized by Università del Piemonte Orientale (UPO).

UPO CRIMEDIM