



Genetisti Forensi Italiani

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

Coordinatori

Susi Pelotti - Università di Bologna
Loredana Buscemi - Università Politecnica delle Marche
Eugenia Carnevali - Az. Ospedaliera Terni, Università di Perugia
Nicoletta Cerri - ASST Spedali Civili, Università di Brescia
Carlo Previderè - Università di Pavia
Carlo Robino - Università degli Studi di Torino

Membri

Federica Alessandrini - Università Politecnica delle Marche
Filippo Barni - Reparto Investigazioni Scientifiche, Carabinieri, Roma
Andrea Berti - Reparto Investigazioni Scientifiche, Carabinieri, Roma
Carla Bini - Università di Bologna
Ilaria Boschi - Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
Francesco De Stefano - Università degli Studi di Genova
Paolo Fattorini - Università degli Studi di Trieste
Emiliano Giardina - Università degli Studi di Roma, "Tor Vergata"
Roberto Giuffrida - Direzione Centrale Anticrimine - Servizio Polizia Scientifica
Lucia Nutini - Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi-Firenze
Valerio Onofri - Azienda Ospedali Riuniti, Ancona
Andrea Piccinini - Università degli Studi di Milano
Silvano Presciuttini - Università di Pisa
Chiara Turchi - Università Politecnica delle Marche

Membri revisori

Angel Carracedo - Universidade de Santiago de Compostela
Walther Parson - Medizinische Universität Innsbruck
Lourdes Prieto - Universidade de Santiago de Compostela
Peter Schneider - Universitätsklinikum Köln

Il *Ge.F.I* (Genetisti Forensi Italiani) rappresenta l'Italian Speaking Working Group della Società Internazionale di Genetica Forense (*ISFG*) e, come da statuto, ha anche il compito di elaborare raccomandazioni prevedendo la loro revisione periodica.

Le raccomandazioni hanno valore di generale indirizzo e devono facilitare la creazione di un consenso su un nucleo di strategie operative e metodi adeguati ai compiti che il settore richiede.

Nel 2015, il *Ge.F.I.* ha raccolto la sfida delle problematiche emergenti in ambito forense relative alla all'organizzazione del laboratorio, alla complessità delle indagini a fini identificativi e all'interpretazione dei risultati analitici, iniziando un percorso volto a stilare raccomandazioni con l'obiettivo di armonizzare la risposta dei laboratori italiani ai quesiti dell'Autorità Giudiziaria.

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*).

Sulla base delle raccomandazioni* dell'*International Society for Forensic Genetics (ISFG)*, del *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM)* e dell'*European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI)*, pubblicate negli ultimi anni, si è pianificato il lavoro suddividendolo in tre sezioni, ciascuna facente capo a un gruppo di esperti.

La prima sezione è dedicata ai requisiti minimi del laboratorio per le indagini di identificazione personale comprendente i temi dell'organizzazione del laboratorio, della qualità della certificazione e dell'accreditamento, del report di laboratorio, con focus sulla qualifica del personale attraverso un percorso di formazione adeguato, condiviso e riconosciuto.

La sezione dedicata alla metodologia di accertamento tratta delle misure di prevenzione della contaminazione e delle metodiche di analisi dei reperti e dei campioni biologici di interesse forense.

La terza sezione, relativa alla criteriologia valutativa di profili genetici STRs autosomici, è stata indubbiamente e come prevedibile, la più laboriosa. Dalla definizione dei criteri analitico-valutativi propedeutici, alla valutazione di conformità dei controlli di analisi e alla verifica della presenza di artefatti, fino alla procedura di interpretazione dei risultati, è frutto di numerose riunioni e del confronto di posizioni, mai ideologiche, ma basate su argomentazioni di rango scientifico.

Di particolare rilievo è la valutazione probabilistica del peso dell'evidenza posto che, come da tutti condiviso, *“una conclusione di compatibilità non suffragata da un calcolo statistico non è utilizzabile ai fini di identificazione”*.

*

International Society for Forensic Genetics (ISFG): <https://www.isfg.org/Publications/DNA+CommissionScientific>

Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM): <https://www.swgdam.org/publications>

European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) DNA working group: <http://enfsi.eu/about-enfsi/structure/working-groups/dna/>

INDICE

| | |
|---|----|
| SEZIONE 1: REQUISITI MINIMI DEL LABORATORIO | 5 |
| 1. Organizzazione del laboratorio | 5 |
| 1.1 Introduzione..... | 5 |
| 1.2 Raccomandazioni generali | 5 |
| 1.3 Raccomandazioni relative al personale..... | 6 |
| 1.4 Raccomandazioni relative alla formazione | 6 |
| 1.5 Raccomandazioni relative all'analisi del DNA | 6 |
| 2. Assicurazione di qualità..... | 6 |
| 2.1 Controlli di qualità interni..... | 7 |
| 2.2 Controlli di qualità esterni interlaboratorio..... | 7 |
| 3. Accreditemento per la Banca dati del DNA..... | 7 |
| 3.1 Indicazioni generali..... | 8 |
| 4. Report di laboratorio..... | 8 |
| Bibliografia | 10 |
| SEZIONE 2: METODI DI LABORATORIO | 12 |
| 1. Analisi di tracce biologiche..... | 12 |
| 1.1 Misure di prevenzione e identificazione della contaminazione | 12 |
| 1.1.1 Introduzione e definizioni | 12 |
| 1.1.2 Misure di prevenzione della contaminazione sulla scena del crimine | 12 |
| 1.1.3 Misure di prevenzione e individuazione della contaminazione in laboratorio..... | 13 |
| 1.2 Ricerca di tracce latenti..... | 13 |
| 1.3 Modalità di prelievo di campioni biologici da e sul cadavere..... | 14 |
| 1.4 La catena di custodia..... | 14 |
| 2. Attività di laboratorio | 14 |
| 2.1 Diagnosi di natura delle tracce biologiche | 14 |
| 2.1.1 Test microscopici | 15 |
| 2.1.2 Test chimico-enzimatici | 15 |
| 2.1.3 Test immunologici | 15 |
| 2.1.4 Test biomolecolari | 16 |
| 2.1.5 Interpretazione coordinata del test di diagnosi di natura e del test genetico | 16 |
| 2.2 Estrazione del DNA | 16 |
| 2.2.1 Premessa | 16 |
| 2.2.2 Principali tecniche estrattive impiegate in ambito forense..... | 17 |
| 2.2.3 Estrazione differenziale..... | 17 |
| 2.3 Quantificazione del DNA..... | 17 |
| 2.4 Analisi dei marcatori genetici..... | 18 |
| 2.4.1 Polimorfismi STR | 18 |
| 2.4.2 STR del DNA autosomico..... | 18 |
| 2.4.3 STR del cromosoma Y | 19 |
| 2.4.4 STR del cromosoma X | 19 |
| 2.4.5 Marcatori per la diagnosi di genere..... | 20 |
| 2.4.6 I polimorfismi del DNA mitocondriale (mtDNA) | 20 |
| 2.4.6.1 Nomenclatura degli aplotipi mitocondriali | 20 |
| 2.4.7 SNPs e Indels | 21 |
| 2.4.8 Massively Parallel Sequencing (MPS)..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 2.4.9 Interpretazione dei risultati di tipizzazione genica di marcatori aploidi | 21 |
| Bibliografia | 24 |

SEZIONE 3: CRITERIOLOGIA VALUTATIVA NELL'INTERPRETAZIONE DEI PROFILI GENETICI STRs AUTOSOMICI27

| | |
|--|----|
| 1. Criteri analitico-valutativi propedeutici all'interpretazione dei risultati di tipizzazione genica | 27 |
| 2. Valutazione di conformità dei controlli di analisi | 28 |
| 2.1 Standard interno e DNA <i>Ladder allelico</i> | 28 |
| 2.2 Controllo positivo di amplificazione | 28 |
| 2.3 Controllo negativo di estrazione e controllo negativo di amplificazione | 29 |
| 2.4 Database di eliminazione | 30 |
| 3. Verifica della presenza di artefatti di amplificazione e di corsa elettroforetica..... | 30 |
| 4. Interpretazione dei risultati della tipizzazione genica di campioni e reperti biologici | 30 |
| 4.1 Valutazione delle caratteristiche dell'elettroferogramma | 30 |
| 4.2. Procedura di interpretazione dei risultati e di comparazione dei profili genetici | 32 |
| 4.2.1. Procedura di interpretazione di profili genetici da campioni di riferimento e da tracce biologiche a singolo contributore | 32 |
| 4.2.2. Procedura di comparazione di profili genetici a singolo contributore | 32 |
| 4.2.3. Procedura di interpretazione di un profilo genetico misto da reperto biologico | 33 |
| 4.2.4 Procedura di comparazione di un profilo genetico misto da reperto biologico | 34 |
| 4.3 La valutazione probabilistica del peso dell'evidenza nel processo di interpretazione dei profili genetici | 34 |
| 4.4 Metodi di calcolo: principali indici di valutazione probabilistica | 35 |
| 4.5 Software di calcolo | 35 |
| Bibliografia | 37 |

SEZIONE 1

REQUISITI MINIMI DEL LABORATORIO

1. Organizzazione del laboratorio

1.1 Introduzione

L'attività del laboratorio di genetica forense deve essere organizzata mediante la stesura di procedure operative e metodi di prova.

Ogni laboratorio deve, ove possibile, utilizzare procedure di prova definiti da norme, regole tecniche o metodi ufficiali in vigore.

Tutti i metodi utilizzati, le procedure, le norme, i manuali di riferimento, le istruzioni delle apparecchiature relativi all'attività del laboratorio devono essere mantenuti aggiornati e resi disponibili al personale.

La prevenzione della contaminazione rappresenta sicuramente il più importante requisito per ogni laboratorio di genetica forense, considerata l'elevata sensibilità dei sistemi di tipizzazione basati sulla metodica PCR.

1.2 Raccomandazioni generali

- I laboratori di genetica forense dovrebbero garantire la totale separazione fisica delle principali aree di lavoro, rispettivamente destinate alla ispezione dei reperti ed al campionamento tracce, all'estrazione del DNA, ai processi pre- ed ai processi post-PCR. Nell'area del laboratorio dovrebbero essere altresì previsti locali adibiti a spogliatoio per il personale.
- Ogni laboratorio dovrebbe utilizzare reagenti e materiali di consumo per la biologia molecolare; sono preferibili materiali di consumo con certificazione di assenza di DNA umano e/o monouso.
- Ogni laboratorio deve assicurare la tracciabilità e l'identificazione dei reperti/campioni/tracce analizzate.
- Ogni laboratorio deve assicurare la tracciabilità di tutte le operazioni analitiche effettuate e la conservazione della documentazione tecnica annessa.
- Ogni metodo analitico impiegato in laboratorio deve essere definito, documentato, validato e approvato dal sistema di qualità interno e reso disponibile agli operatori.
- Il metodo interno deve essere messo a disposizione dell'Autorità Giudiziaria e dei consulenti/periti qualora ne venga fatta richiesta motivata.
- I reagenti impiegati in laboratorio non dovrebbero essere utilizzati se hanno superato la data di scadenza.
- Ogni laboratorio deve istituire un *database di eliminazione* (che dovrebbe includere tutto il personale di laboratorio, i frequentatori e, ove possibile, i tecnici di provenienza esterna, gli addetti alle pulizie, i consulenti di parte, i periti, ed eventualmente gli operatori che, a vario titolo, sono entrati in contatto con i reperti/campioni biologico-forensi, come gli operatori di Polizia Giudiziaria, il personale del servizio sanitario d'emergenza, etc.) qualora gli elementi circostanziali del caso facciano ritenere plausibile un possibile evento di contaminazione. In caso di rifiuto da parte di esterni, deve essere annotato l'accesso. Il database non deve consentire l'identificazione diretta dei soggetti a cui appartiene il prelievo biologico, a cui verrà assegnato un codice alfanumerico seguendo un criterio di pseudoanonimizzazione: una persona autorizzata ha il file che permette di ricollegare i codici alla persona cui è stato effettuato il prelievo, in caso che questo sia rilevante per le indagini o per individuare una possibile contaminazione. Nella procedura documentata andranno specificati: modalità di gestione dei profili, personale autorizzato alla gestione del dato genetico, i tempi di permanenza e i metodi di

cancellazione, che dovranno essere inseriti nel consenso informato rilasciato dal soggetto all'atto del prelievo.

- Tutti i report tecnici (es: rilievo fotografico dei *presumptive tests*, report della analisi qualitativa-quantitativa del DNA, elettroferogrammi completi di altezza dei picchi allelici e size, raw data del sequenziatore, ed ogni altro rapporto strumentale) devono essere messi a disposizione dei consulenti/periti qualora ne venga fatta richiesta.
- Nell'ambito dell'esecuzione degli incarichi giudiziari, i dati analizzati ed i relativi elaborati, possono essere ispezionati da consulenti di parte, solo previa autorizzazione della Autorità Giudiziaria.
- I laboratori che si occupano di casi forensi dovrebbero essere certificati ISO 9001:2015 e, per inserire i dati nel database nazionale del DNA, devono anche essere accreditati UNI EN ISO/IEC 17025.

1.3 Raccomandazioni relative al personale

- La formazione e la competenza del personale sono un punto di partenza fondamentale per ogni laboratorio di genetica forense.
- *Gli analisti di laboratorio* di genetica forense devono possedere titoli di studio adeguati e riconosciuti, secondo quanto stabilito dai requisiti dettati dalla norma UNI EN ISO/IEC 17025.
- *Il responsabile del laboratorio* deve:
 - valutare i titoli e le conoscenze acquisite del personale del laboratorio attraverso il controllo della relativa documentazione;
 - formare l'analista sulle conoscenze specifiche riguardanti l'ambito delle indagini di genetica-forense effettuate nel laboratorio.

1.4 Raccomandazioni relative alla formazione

- La formazione preferibilmente si basa sulla rete di collaborazione che include: Università, Forze di Polizia, aziende private, società nazionali ed internazionali di genetica forense (*GeFI*, *ISFG*, *ENFSI*, ect), e la piattaforma europea *EUROFORGEN-NoE*.

1.5 Raccomandazioni relative all'analisi del DNA

- I campioni di riferimento relativi ad un caso devono essere sempre analizzati in una fase temporalmente distinta dall'analisi dei reperti ed a questa successiva, o in altro locale dedicato. Tra l'analisi del campione di riferimento e dei reperti deve essere effettuata la decontaminazione delle aree di lavoro, secondo quanto riportato nelle apposite procedure
- Pianificazione del flusso di lavoro
- Ogni analisi deve includere appropriati controlli positivi e negativi
- Deve essere implementato apposito sistema di registrazione, cartaceo o elettronico, di documentazione interna al laboratorio per garantire la tracciabilità degli operatori, degli strumenti, dei reagenti, dei campioni, dei metodi di prova e delle condizioni ambientali, al fine di identificare eventuali fonti di contaminazione, scambio di campioni o di dati, o altri errori
- I risultati ottenuti dall'analisi del DNA dei campioni in esame devono essere sempre comparati con il database di eliminazione prima della stesura del report finale.

2. Assicurazione di qualità

I laboratori che svolgono indagini di genetica forense sono gravati da problematiche specifiche come la contaminazione e l'analisi di tracce critiche (DNA degradato, Low template DNA, ect). Si impone, quindi, che il laboratorio svolga la propria attività con competenza specifica, documentata attraverso l'analisi di controlli di qualità interni ed esterni.

2.1 Controlli di qualità interni

I controlli di qualità interni devono essere applicati ad ogni sessione analitica.

-Nel caso in cui i controlli di qualità manifestino non conformità devono essere pianificate azioni correttive.

-I risultati dei controlli di qualità analitici devono essere conservati e periodicamente analizzati per valutare le performance del laboratorio ed applicare eventuali azioni correttive nei metodi interni.

2.2 Controlli di qualità esterni interlaboratorio

I laboratori devono verificare la propria competenza nell'esecuzione di prove analitiche e nell'interpretazione dei risultati nelle indagini genetico-forensi mediante controlli di qualità in forma di esercizi interlaboratorio, termine con cui si intende l'organizzazione, l'esecuzione e la valutazione di prove su materiali identici o simili, da parte di due o più laboratori e in base a condizioni prestabilite.

Comprendono:

i *Proficiency Testing (PT)*, ai quali tutti i laboratori che svolgono indagini genetico forensi, su tracce biologiche o analisi di paternità/parentela, dovrebbero partecipare;

i *confronti interlaboratorio*, che servono per dimostrare la riproducibilità di un metodo e la fondamentale validità forense.

I *PT* consistono nell'analizzare tracce biologiche (tracce di sangue, saliva, sperma e/o altri fluidi biologici, formazioni pilifere, etc), nello svolgere esercizi teorici di statistica applicata e nel valutare l'accuratezza e la precisione dei risultati ottenuti con certificazione finale.

La finalità è anche quella di valutare la variabilità interlaboratorio e l'entità e la tipologia degli errori commessi dai laboratori, così da poter stilare raccomandazioni specifiche.

Questi strumenti sono richiamati dalla norma ISO/IEC 17025, che prevede almeno un *PT* all'anno.

L'esperienza dei confronti interlaboratorio e dei *PT* mostra con chiara evidenza che la riduzione degli errori è legata strettamente all'incremento della standardizzazione, non solo dei metodi e delle tecnologie impiegate, ma anche e soprattutto dell'interpretazione dei risultati analitici.

I principali progetti internazionali sono:

-*GHEP* Intercomparison Program "Analysis of DNA polymorphisms in bloodstains and other biological samples", organizzato dal gruppo di lavoro di lingua spagnola-portoghese dell'ISFG (*GHEP-ISFG*). Si articola in due livelli (base e avanzato) e due moduli (test di parentela o test forense);

-*GEDNAP* German DNA Profiling, organizzato dal gruppo di lingua tedesca dell'EDNAP (European DNA profiling group). Organizza due *PT* ogni anno, ognuno dei quali è composto da più moduli a scelta.

A livello nazionale vi è il "*Ge.F.I. DNA Proficiency Test*", unico programma di valutazione esterna delle analisi genetico forensi a cui partecipano laboratori pubblici e privati, a cura di un comitato tecnico formato da tre esperti di genetica forense, di cui uno straniero. Il *Ge.F.I. DNA Proficiency Test* consiste nella tipizzazione di profili relativi a campioni di riferimento e tracce forensi analizzando, a scelta, i seguenti moduli con certificazione finale:

-caratterizzazione della natura dei fluidi biologici

-STRs autosomici

-Y-STRs

-mtDNA

-calcolo biostatistico

-indagine di parentela teorica.

3. Accredimento per la Banca dati del DNA

La norma europea EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura" definisce i criteri che i laboratori devono rispettare per dimostrare la loro competenza

tecnica ed il rispetto di un sistema di gestione della qualità, che consentono di ottenere risultati di prova e di taratura professionalmente qualificati.

Uno dei requisiti del sistema EN ISO/IEC 17025 è che le metodiche applicate nei laboratori devono essere validate. Il sistema EN ISO/IEC 17025 rappresenta uno standard di riferimento cogente per i laboratori che sviluppano un metodo interno e lo accreditano, mentre le indicazioni più dettagliate possono essere fornite dagli esperti del settore.

Ogni laboratorio di genetica forense deve stabilire criteri minimi di validazione per le proprie procedure (validazione interna). La gamma e l'accuratezza dei valori ottenibili da metodi validati (per esempio l'incertezza dei risultati, i limiti di rivelazione, la selettività del metodo, la linearità, il limite di ripetibilità e/o di riproducibilità, la robustezza nei confronti di influenze esterne e/o la sensibilità incrociata nei confronti di interferenze provenienti dalla matrice del campione/oggetto da sottoporre a prova), così come valutati per l'utilizzo previsto, devono corrispondere alle esigenze dell'applicazione forense. A tal proposito possono essere un utile strumento di riferimento le linee guida *ENFSI*, *SWGDM*, *EA*, *ILAC* in tema di validazione dei metodi.

Ogni modifica/variazione di un metodo di prova normalizzato o interno validato deve essere oggetto di validazione interna. I criteri da applicare per la validazione del nuovo metodo devono rispecchiare quelli espressi nei documenti *ENFSI* (L. 85/2009 art. 11 c.1).

Vi è l'assoluta necessità che la prova da validare sia conforme agli standard internazionali così da assicurare la confrontabilità dei profili genetici tra laboratori diversi.

Il laboratorio di genetica forense dovrebbe porsi come obiettivo primario quello dell'accreditamento ISO/IEC 17025:2005, fermo restando che il mancato raggiungimento dell'accreditamento impedisce al Laboratorio di alimentare la Banca Dati Nazionale del DNA (L. 85/2009).

Accredia è l'unico organismo nazionale italiano autorizzato a svolgere attività di accreditamento e vigilanza del mercato (Reg. (CE) 765/2008 e DM 22.12.2009).

3.1 Indicazioni generali

- Ogni modifica di una metodica, in grado di avere una qualche influenza sul risultato, richiede una convalida interna. È essenziale dimostrare che i profili ottenuti utilizzando la nuova procedura siano di migliore o equivalente qualità rispetto a quelli ottenuti con la procedura precedentemente utilizzata.
- Le condizioni ambientali devono essere controllate.
- Nel protocollo di validazione di ogni nuova metodica deve essere esaminata la variabilità operatore-dipendente.
- Per l'approvazione di uno specifico parametro (ripetibilità, ect) devono essere analizzati almeno 5 campioni (escluso il controllo negativo).

4. Report di laboratorio

Esistono diverse tipologie di report:

1) Consulenza tecnica, perizia o indagine tecnica di Polizia Giudiziaria:

È la relazione tecnica di genetica forense che viene prodotta a seguito di incarico/delega dell'A.G o su richiesta da privati.

Questo tipo di report dovrebbe contenere:

- quesito/i posto/i (se formulati)
- informazioni e/o documentazione riguardanti il caso in esame, qualora disponibili e qualora strettamente necessarie per la comprensione della strategia di indagine e dei risultati ottenuti;
- stato dei reperti, catena di custodia (conservazione, trasporto, contenitore, sigilli e stato dei sigilli, firma, verbale di consegna, verbale di accettazione);

- elenco dei reperti da esaminare e relativa codifica interna del laboratorio e riferimento, ove presente, ad altre codifiche legate al reperto, utilizzate in precedenza (es: codifica utilizzata nei verbali di sequestro; in precedenti indagini, ect);
- identificazione non ambigua della sostanza, materiale o del prodotto (reperto) campionato;
- area del reperto campionata, documentata mediante fotografie con riferimento metrico;
- richieste delle parti autorizzate;
- strategia delle analisi condotte, laddove necessaria;
- materiali e metodi analitici utilizzati per le analisi;
- i rapporti strumentali delle analisi eseguite (es: rilievo fotografico dei presumptive tests, report della analisi qualitativa-quantitativa del DNA, elettroferogrammi completi di altezza dei picchi allelici e size, e ogni altro rapporto strumentale, come per esempio il report del software utilizzato per l'analisi statistica) e comunque a richiesta delle parti ogni rapporto deve essere reso disponibile;
- i risultati ottenuti e le conclusioni a cui l'esperto è giunto per rispondere al quesito iniziale.

2) Rapporto di Prova

Il rapporto di prova, il cui contenuto è definito nella norma ISO/IEC 17025 ai par. 5.10.2 e 5.10.3.1 e nei documenti ACCREDIA applicabili, documenta l'esito finale di una analisi forense con l'indicazione del/dei profili genetici ottenuti e del metodo di prova accreditato utilizzato in conformità alla norma di riferimento.

3) Indagine tecnica o rapporto preliminare di Polizia Giudiziaria:

Rappresenta una comunicazione sintetica per informare l'A.G. su elementi di novità inerenti determinati aspetti di natura investigativa. Tale comunicazione non necessita di una dettagliata descrizione di tutti gli aspetti tecnici.

Bibliografia

Accredia <http://www.accredia.it>

Carracedo A, Giardina E, Mosquera-Miguel A, Manzo L, Alvarez-Iglesias V, Schneider PM. Making progress in education: The EUROFORGEN master degree pilot project in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet.* 2017 May;28:e12-e13

EA-4/18 - guidance on the level and frequency of proficiency testing participation, 2010

Education and Training in Forensic Science. A Guide for Forensic Science Laboratories, Educational Institutions, and Students. NIJ, 2004 <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/203099.pdf>

Euroforngen NoE: <http://www.euroforngen.eu/training/>

European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), Concept training document, v1.0, 2010

European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), Contamination prevention guidelines, v1.0, 2010

European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), Recommended minimum criteria for the validation of various aspects of the DNA profiling process, v1.0, 2010

European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), DNA Database management review and recommendations, 2016

European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), ENFSI Guideline for evaluative reporting in forensic science. Strengthening the evaluation of forensic results across Europe (STEOFRAE), 2015

Gill P., Brenner CH., Buckleton JS., Carracedo A., Krawczak M., Mayr WR., Morling N., Prinz M., Schneider PM., Weir BS. (2006), DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures, *Forensic Sci Int.* 160, 90-101

ILAC G19:08/2014 Modules in a Forensic Science Process, 2014

Legge 30 giugno 2009, n. 85, "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 transfrontaliera, in particolare allo scopo di contrastare il terrorismo, la criminalità transfrontaliera e la migrazione illegale (Trattato di Prum). 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", *Gazzetta Ufficiale* n. 160 del 13 luglio 2009 - Supplemento ordinario n. 108

Morling N, Allen RW, Carracedo A, Gada H, Guidet F, Hallenberg C, Martin W, Mayr WR, Olaisen B, Pascali VL, Schneider PM. (2002), Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. *Forensic Sci. Int.* 129(3), 148-157

Schneider PM. Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Sci Int.* 2007;165:238-43

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) Quality assurance standards for DNA databasing laboratories 9/01/2011

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) Training Guidelines 17/1/2013

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) Contamination Prevention and Detection. Guidelines for forensic DNA Laboratories 12/01/2017

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 general requirements for the competence of testing and calibration laboratories

UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 general requirements for proficiency testing.

SEZIONE 2

METODI DI LABORATORIO

1. Analisi di tracce biologiche

1.1 Misure di prevenzione e identificazione della contaminazione

1.1.1 Introduzione e definizioni

Ai fini della presente linea guida, la contaminazione è definita come: "l'introduzione di DNA, o materiale biologico contenente DNA, su un reperto al momento o dopo che un processo forense controllato inizia". Questa definizione è distinta dal "trasferimento avventizio", che invece si riferisce al trasferimento di materiale biologico su un reperto prima che il reperto sia raccolto o che le prime attività forensi abbiano avuto inizio. Le attività investigative forensi hanno inizio quando la scena del crimine è stata isolata e posta in sicurezza.

Le principali fonti di contaminazione del DNA sono:

- 1) gli operatori che maneggiano il reperto o il campione di DNA (sulla scena del crimine, in laboratorio, etc...);
- 2) i reagenti o consumabili in precedenza contaminati (ad esempio, tamponi, provette, reagenti);
- 3) contaminazione da reperto a reperto o da campione di DNA a campione di DNA (*cross contamination*) nelle fasi di raccolta, trasporto, conservazione o campionamento di tracce da un reperto

La contaminazione può avvenire:

- 1) direttamente (ad esempio parlando liberamente sopra un reperto e depositando saliva)
- 2) indirettamente (ad esempio, materiale biologico presente sulla parte esterna di un plico contenente un reperto può essere trasferito sui guanti di un operatore, che aprendo il plico senza cambiarsi i guanti prima di maneggiare il contenuto trasferisce il materiale contaminante).

La contaminazione può essere sporadica, cioè derivante da un evento che colpisce solo un campione di DNA inserito in una serie di campioni o "diffusa", in conseguenza di un evento che colpisce un intero lotto o serie di campioni di DNA allo stesso tempo nel corso di una specifica fase delle analisi (estrazione del DNA, amplificazione, etc...).

1.1.2 Misure di prevenzione della contaminazione sulla scena del crimine

Limitazione dell'accesso al solo personale autorizzato

Tutto il personale il cui ruolo preveda la presenza sulla scena del crimine (anche quello non specificamente addetto alle attività tecniche di sopralluogo; primi soccorritori e personale sanitario, avvocati, Pubblico Ministero, etc) deve essere formato e pienamente competente per quanto riguarda le misure anticontaminazione.

Minimizzazione della possibilità di contaminazione diretta attraverso l'utilizzo di dispositivi di protezione individuale

Ogni operatore che accede ad una scena del crimine "complessa" deve indossare i Dispositivi di Protezione Individuale (DPI):

- a) Mascherina facciale;
- b) Cappuccio o retina per capelli;
- c) Primo paio di guanti;
- d) Tuta monouso;
- e) Copriscarpe (devono essere tolti o cambiati quando si esce dall' ambiente o entrando in una zona separata di interesse all'interno della stessa scena);

f) Altre paia di guanti: i guanti devono essere cambiati regolarmente in un luogo designato distante dalla zona in esame, e sempre dopo la manipolazione dei reperti che possono essere utilizzati per l'analisi del DNA.

Per scene del crimine più “semplici” i seguenti DPI devono come minimo essere indossati: mascherina facciale; paio di guanti e se si raccolgono tracce biologiche anche un secondo paio di guanti.

Al fine di evitare la contaminazione crociata tra diverse aree di una scena del crimine, l'accesso alle singole aree dovrebbe essere controllato.

In relazione alla complessità della singola scena del crimine, è fortemente consigliato cambiarsi i DPI e decontaminare le attrezzature prima di accedere a diverse aree della stessa scena.

Al fine di evitare possibili contaminazioni crociate al momento dell'imballaggio dei reperti raccolti sulla scena del crimine, in linea generale, ogni reperto dovrebbe essere confezionato singolarmente e in contenitori/involucri adeguati per materiale (ad es. materiale traspirante per tracce non completamente essiccate) e dimensioni, avendo cura di portare il contenitore/involucro verso il reperto e non viceversa.

Dipendentemente dalla natura del reperto e dal suo stato (reperto in condizioni di essiccazione, reperto bagnato, reperto deperibile a temperatura ambiente, etc.) occorre inoltre prontamente individuare le adeguate condizioni ambientali di conservazione (temperatura ambiente, 4°C, -20°C, etc.)

Al fine di garantire la catena di custodia è infine fondamentale che ciascun reperto confezionato sia classificato in maniera univoca ed inequivocabile.

Pulizia approfondita delle attrezzature utilizzate sulla scena del crimine

Le apparecchiature non monouso utilizzate sulla scena del crimine devono essere adeguatamente decontaminate prima del riutilizzo (a seconda delle tipologie mediante irraggiamento UV e/o trattamento con opportuno liquido decontaminante). Particolare cautela deve essere adottata quando le attrezzature impiegate sulla scena di un determinato crimine sono riutilizzate, per una scena o un evento collegato al medesimo fatto reato (in special modo su ambienti e reperti di un sospettato/indagato).

Utilizzo di materiali e consumabili che vengono in contatto diretto con il materiale destinato all'analisi di DNA:

i materiali e i consumabili impiegati per la raccolta, la conservazione e l'analisi di materiale per indagini forense devono essere monouso (ove possibile) e sterili (vedasi precedente riferimento alla normativa ISO).

I criteri di massima sopra descritti sono da intendersi estesi anche alle attività svolte in laboratorio che precedono quelle di analisi vera e propria del DNA (estrazione, amplificazione, etc.), quali ricezione e ispezione dei campioni per identificazione e prelievo delle tracce d'interesse.

1.1.3 Misure di prevenzione e individuazione della contaminazione in laboratorio

Si rimanda alla sezione *Requisiti minimi del laboratorio*-paragrafo 1.2, pag 5.

1.2 Ricerca di tracce latenti

Il personale specializzato che ispeziona la scena del crimine procede alle attività di ricerca oltre che di tracce evidenti, anche di quelle latenti, impiegando -di volta in volta- dispositivi di protezione e test orientativi idonei per ogni tipologia di traccia.

Il primo screening non invasivo per la ricerca di potenziali tracce biologiche latenti prevede l'utilizzo di sistemi dotati di lampade a emissione di luce nel range dell'ultravioletto e del visibile (c.d. luci forensi), capaci di esaltare l'osservazione e consentire la registrazione fotografica e la raccolta della traccia non visibile ad occhio nudo.

L'uso di luci forensi ha significato puramente orientativo e di selezione delle tracce, non consentendo una certa diagnosi di natura delle stesse.

Quanto all'esaltazione di tracce di sangue latenti mediante Luminol, si applicano i criteri generali successivamente riportati per diagnosi di natura mediante test chimico-enzimatici (punto 2.1.2).

1.3 Modalità di prelievo di campioni biologici da e sul cadavere

Nel caso in cui sulla scena del crimine sia presente un cadavere, eventuali prelievi di campioni biologici di raffronto e tracce da quest'ultimo dovranno essere effettuati in accordo con la Raccomandazione No. R (99) 3 del Consiglio d'Europa sull'armonizzazione dei protocolli dell'autopsia medico-legale.

L'International Society for Forensic Genetics ha redatto specifiche raccomandazioni in merito al tipo di tessuto preferenzialmente da prelevare a fini di identificazione, a seconda dello stato di conservazione del cadavere.

Un strumento orientativo per il prelievo di tracce da vittima di reato vivente è contenuto nelle Linee Guida *Ge.F.I.* per la repertazione di tracce biologiche per le analisi di genetica forense nel percorso assistenziale delle vittime di violenza sessuale e/o maltrattamento (<http://www.gefi-isfg.org/>).

1.4 La catena di custodia

La Catena di custodia è l'assicurazione dell'identificazione di tutte le persone che hanno avuto la custodia di un reperto e del luogo in cui tali reperti sono stati raccolti in ordine cronologico a partire dalla raccolta fino poi eventualmente al completo utilizzo o distruzione.

La catena di custodia, correttamente eseguita, rappresenta un percorso ininterrotto di raccolta, custodia, controllo, trasferimento, e deposito dei reperti. Campioni derivanti da reperti primari come ad esempio l'estratto del DNA devono avere una propria catena di custodia mantenuta nella stessa misura del reperto originale.

La catena di custodia può essere garantita attraverso strumenti cartacei ed elettronici o da una qualsiasi combinazione dei precedenti.

Il sistema manuale di registrazione deve comunque includere un mezzo idoneo per tracciare il trasferimento di reperti da persona a persona e all'interno del luogo di archiviazione.

La documentazione della catena di custodia dovrebbe includere i seguenti elementi minimi:

- descrizione del reperto/oggetto
- numero identificativo unico (per esempio, numero del caso)
- dove sono stati raccolti i reperti
- dove è stato conservato il reperto
- chi era in possesso del reperto e per quale scopo
- cosa è stato fatto sul reperto (ad esempio, analisi o riconfezionamento)
- informazioni relative alla data e ora di ogni attività effettuata.

Le registrazioni relative alla catena di custodia devono essere conservate per un periodo di tempo congruo anche in relazione alle disposizioni dell'Autorità Giudiziaria.

L'accesso al luogo dove sono depositati i reperti deve essere limitato esclusivamente a coloro che sono autorizzati a movimentare e restituire i reperti.

2. Attività di laboratorio

2.1 Diagnosi di natura delle tracce biologiche

La determinazione della natura delle tracce repertate consente da un lato la selezione preliminare di campioni d'interesse (discriminando ad es. tra potenziale materiale biologico e non biologico, tra materiale biologico umano e non umano, etc.) e dall'altro permette di integrare il dato genetico con informazioni utili per la ricostruzione della dinamica del fatto delittuoso (origine tissutale di tracce biologiche umane).

Poiché tuttavia i test di diagnosi di natura possono comportare la distruzione di parte della matrice biologica di una traccia, o la sua diluizione, l'operatore può decidere di omettere questo passaggio,

in particolare in presenza di tracce latenti o microscopiche e in casi in cui la determinazione dell'origine tissutale del campione è scarsamente rilevante, rispetto all'identificazione genetica del suo donatore. In questo caso la decisione dovrà essere adeguatamente motivata nel report finale e presa possibilmente in accordo con eventuali consulenti delle parti.

Il singolo caso in cui la preliminare diagnosi di natura è da ritenersi obbligatoria è quello in cui si sospetta che la traccia contenga una miscela di liquidi biologici comprendenti sperma (tipicamente tracce repertate in relazione a delitti di violenza sessuale). La conferma o meno della presenza di sperma, in questi casi, determina infatti la scelta dei successivi protocolli estrattivi (cosiddetta estrazione differenziale) potendo quindi influenzare profondamente il buon esito delle analisi.

2.1.1 Test microscopici

Si basano sull'osservazione diretta di elementi cellulari caratteristici di un determinato fluido biologico al microscopio ottico o a fluorescenza (utilizzando anticorpi monoclonali fluorescenti, specifici per un dato antigene tissutale). Dovrebbero essere in particolare impiegati per la ricerca di spermatozoi, per i quali sono disponibili protocolli di colorazione dedicati, in grado di evidenziare in maniera differenziale le diverse parti (testa, coda), il numero e il rapporto con la componente epiteliale in caso di tamponi vaginali, orali o rettali.

Il mancato riscontro di spermatozoi all'esame microscopico, non consente di escludere la presenza di liquido seminale nella traccia (ad es. soggetti azoospermici o vasectomizzati, campioni scarsi o relativamente degradati), che dovrà essere verificata mediante test immunologico/biomolecolare, in grado di evidenziare la componente non cellulare dello sperma.

L'analisi morfologica al microscopio –da condursi con il supporto di fonti specializzate e database di riferimento- può essere inoltre d'ausilio per differenziare tra fibre naturali/sintetiche e formazioni pilifere umane/animali, fungendo da primo screening per la selezione delle formazioni da sottoporre ad analisi del DNA. In formazioni pilifere umane, l'esame microscopico consente inoltre di documentare oltre alla morfologia, la fase evolutiva del pelo utile per le successive scelte analitiche.

2.1.2 Test chimico-enzimatici

Sfruttano la capacità di un substrato di cambiare colore, o emettere luminescenza (luminol), in presenza di un composto chimico o enzima presente nel tessuto target. Test di questo tipo, descritti in letteratura o forniti come prodotti commerciali, sono disponibili essenzialmente nei confronti dei seguenti fluidi biologici (e relativi target chimico-enzimatici): sangue (gruppo eme dell'emoglobina); saliva (alfa-amilasi); sperma (fosfatasi acida prostatica).

Si tratta di test "presuntivi", cioè poco specifici (generano un elevato numero di falsi positivi), ma molto sensibili (pochi falsi negativi). Risultano dunque utili per selezionare, entro un vasto numero di tracce pervenute in laboratorio (talora anche direttamente sulla scena del crimine), quelle potenzialmente utili.

Non forniscono invece certezza riguardo all'effettiva natura della traccia.

2.1.3 Test immunologici

Si tratta di metodi fondati sull'interazione tra anticorpi monoclonali prodotti in laboratorio e antigene tessuto specifico. Numerosi sistemi commerciali di questo tipo, in parte mutuati dalla pratica clinica (ad es. test per la ricerca di sangue umano occulto nelle feci) in parte creati espressamente per l'attività forense sono attualmente disponibili sul mercato per i seguenti tessuti (e relativi target antigenici): sangue (emoglobina, glicoforina A); saliva (alfa-amilasi); sperma (antigene prostatico specifico, semenogelina). Recentemente è stato reso commercialmente disponibile anche un test per l'identificazione di urina, basato su anticorpi policlonali diretti contro la proteina di Tamm Horsfall umana.

Sono test di tipo “confermativo”, cioè altamente specifici; occorre tuttavia tener conto di possibile rare cross-reattività, in quanto l’antigene utilizzato per evidenziare un determinato tessuto target è spesso presente (seppur a concentrazioni inferiori) anche in altri tessuti umani.

La sensibilità di questi saggi è inoltre limitata, con possibilità di falsi negativi in tracce esigue o precedentemente sottoposte a lavaggio.

2.1.4 Test biomolecolari

In anni recenti, approcci molecolari alla diagnosi di natura sono stati proposti in alternativa o a integrazione dei metodi immunologici. Il principale vantaggio di tali metodiche è rappresentato dall’elevata sensibilità e dal risparmio di materiale biologico.

Sebbene queste metodiche appaiano senza dubbio promettenti e alcune di esse siano già state oggetto di studi di validazione inter-laboratorio, è importante sottolineare come non esistano attualmente protocolli standardizzati (resi ad esempio disponibili commercialmente), né set di marcatori universalmente condivisi, né un approccio interpretativo univoco del dato analitico. Pertanto i risultati ottenuti devono essere interpretati con cautela e alla luce della più aggiornata letteratura scientifica in relazione alla specificità e alla possibile influenza sull’esito del test di fattori fisiopatologici tipici dei soggetti interessati e di fattori ambientali.

2.1.5 Interpretazione coordinata del test di diagnosi di natura e del test genetico

Al fine di consentire una corretta interpretazione del risultato, in caso di utilizzo di test per diagnosi di natura, l’operatore deve includere nella relazione tecnica:

- indicazione dei reagenti commerciali utilizzati o, in alternativa, del protocollo di preparazione dei reagenti stessi, con eventuali riferimenti bibliografici attestanti la validazione in ambito forense
 - una sintetica descrizione della modalità di effettuazione del test, in particolare quando esse si discostino dalle istruzioni fornite dalla ditta produttrice (ad es. tempo di lettura del test chimico-enzimatico/immunologico); tali modifiche dovranno essere inoltre giustificate alla luce della letteratura scientifica disponibile
 - una sintetica e chiara descrizione dei limiti di sensibilità e specificità del tipo di test applicato desunta dal manuale d’istruzioni di prodotto commerciale e/o dalla letteratura scientifica
- Stante l’estrema sensibilità dei test genetici identificativi, l’operatore è libero di procedere con l’estrazione, quantificazione, amplificazione e tipizzazione del DNA da una traccia che abbia fornito esito negativo a test di diagnosi di natura.

In presenza di sola positività a test chimico-enzimatico a bassa specificità non corroborata da positività ad un test di tipo “confermativo” (esame microscopico nel caso di ricerca di spermatozoi; test immunologico; test molecolare), l’eventuale profilo genetico ottenuto non potrà, nella relazione tecnica, essere riferito quale certamente proveniente da uno specifico fluido biologico. In tali casi, eventuali valutazioni sulla natura della traccia hanno solo carattere deduttivo sulla base di dati circostanziali.

2.2 Estrazione del DNA

2.2.1 Premessa

La scelta del protocollo estrattivo è demandata al singolo laboratorio, sulla base di fattori quali: dotazioni strumentali, esperienza degli operatori, tipologia di campione trattato; etc.

Comune a tutte le tecniche è l’adozione di precauzioni volte a prevenire e, nel caso, identificare prontamente la contaminazione (si rimanda a *Requisiti minimi del laboratorio-1.5* Raccomandazioni relative all’analisi del DNA).

Nell’ambito di un singolo caso, i campioni di raffronto devono essere analizzati in un’area e/o in tempi diversi rispetto alle tracce repertate (ove possibile dopo aver ottenuto i risultati analitici sulle tracce stesse).

Indipendentemente dalla tecnica utilizzata per l'estrazione del DNA, nella relazione tecnica l'operatore è tenuto a indicare con precisione la tecnica, manuale o automatizzata, lo strumento e/o il kit commerciale utilizzato, eventuali modifiche apportate alla procedura consigliata dal kit fornendone la motivazione.

Nel caso in cui si utilizzi una metodica manuale messa a punto nel laboratorio, deve essere consultabile la validazione interna eseguita.

2.2.2 Principali tecniche estrattive impiegate in ambito forense

Attualmente, le tecniche di estrazione più diffuse presso i laboratori di genetica forense comprendono l'estrazione organica in fenolo cloroformio, la lisi in presenza di resine chelanti (seguita da eventuale purificazione), l'estrazione in fase solida su "spin column" con membrane di silice e mediante resine magnetiche.

La disponibilità di tecnologie per la purificazione del DNA che utilizzano resine magnetiche e membrane di silice ha reso possibile l'automazione del processo di estrazione mediante l'utilizzo di differenti piattaforme commerciali in grado di processare un numero variabile di campioni.

Per campioni di raffronto (quali ad esempio saliva depositata su appositi supporti trattati con reagenti stabilizzatori del DNA) è attualmente possibile applicare anche protocolli di PCR diretta, che eliminano o riducono all'estremo l'esigenza di preliminare trattamento estrattivo.

Indipendentemente dalla metodologia di estrazione, alcune tipologie di campioni, quali tessuto osseo e formazioni dentarie, necessitano di una fase preliminare prima di procedere all'estrazione del DNA. Essa prevede innanzitutto la pulizia superficiale del campione. Nella processazione dei frammenti di ossa compatte si rende necessaria la polverizzazione e decalcificazione in EDTA per un tempo variabile, a seconda della quantità di materiale prelevato. Nel caso delle formazioni dentarie è necessario sezionare o frantumare il dente per consentire l'accesso dei reagenti alla polpa dentaria.

Una pulizia preliminare all'estrazione del DNA è inoltre raccomandata in caso di formazioni pilifere.

2.2.3 Estrazione differenziale

In tracce miste nelle quali sia certa/presunta la presenza di sperma (ad es. violenza sessuale), è opportuno adottare apposito protocollo di estrazione differenziale. Esso consiste in un pretrattamento con proteinasi K a basse concentrazioni e tampone di lisi per il recupero della "frazione epiteliale" (contenente il DNA di cellule diverse da spermatozoi), che viene così separata mediante centrifugazione dalla frazione spermatozoaria (resistente alla lisi). Il successivo trattamento della frazione spermatica con il tampone di estrazione aggiunto di ditiotreitolo (DTT) consente di aggredire le membrane nucleari degli spermatozoi estraendone il DNA.

L'estrazione differenziale può inoltre essere applicata a fusti di formazioni pilifere contaminati da liquidi biologici (sangue, saliva, mucosa vaginale). In questo caso, la prima frazione conterrà il DNA dei suddetti fluidi biologici, la seconda il DNA proveniente dal fusto della formazione pilifera.

2.3 Quantificazione del DNA

L'estrema sensibilità dei sistemi di amplificazione STR richiede che il metodo di quantificazione preliminare sia, quantomeno, altrettanto sensibile.

La quantificazione del DNA genomico umano isolato da tracce è prerequisito importante per l'ottimizzazione della successiva reazione di amplificazione mediante PCR al fine di minimizzare la presenza di artefatti che possano alterare la qualità del profilo genetico.

E' necessario descrivere nel report finale il sistema commerciale e lo strumento RT-PCR utilizzato, i risultati analitici ottenuti e l'eventuale presenza di inibitori e (ove possibile) lo stato di degradazione del DNA e la quantità di DNA maschile e femminile.

Ogni laboratorio potrà valutare l'utilità di definire una soglia al di sotto della quale sono attesi risultati non utili di tipizzazione del campione. Ogni laboratorio potrà decidere di proseguire con l'analisi dei marcatori STR anche a fronte di un risultato negativo alla quantificazione.

Per quanto riguarda i campioni di raffronto raccolti da vivente o cadavere in corso d'autopsia, che di norma contengono quantità relativamente abbondanti di DNA, la quantificazione può essere effettuata anche con metodiche meno sensibili rispetto alla qPCR, come spettrofotometria o fluorimetria. In alternativa, ove si utilizzino protocolli di estrazione normalizzati, al termine dei quali si prevede di ottenere dai campioni di raffronto una concentrazione standardizzata e nota di DNA genomico, la quantificazione può essere omessa.

2.4 Analisi dei marcatori genetici

2.4.1 Polimorfismi STR

Al fine di garantire la massima standardizzazione dei risultati, l'amplificazione di STR si avvale di norma di kit del commercio dedicati. I kit utilizzati e i relativi riferimenti bibliografici devono essere esplicitamente indicati nella relazione tecnica, così come eventuali scostamenti dal protocollo d'amplificazione suggerito dalla ditta produttrice: ad es. modifica del volume finale di PCR, modificazione del numero di cicli PCR. Tali modifiche dovranno essere inoltre giustificate alla luce della letteratura scientifica disponibile o documentata validazione interna.

Nel caso vi sia assoluta necessità di analizzare STR addizionali non inclusi in kit commerciali, deve essere illustrata chiaramente la procedura e la validazione interna/esterna eseguita (ad es. calibrazione della scala allelica di raffronto secondo nomenclatura allelica conforme a linee guida ISFG; partecipazione a esercizi collettivi comprendenti un controllo di qualità o proficiency test, etc.). Anche per STR addizionali devono essere disponibili adeguati database popolazionistici.

2.4.2 STR del DNA autosomico

Le indagini genetiche identificative sono di norma svolte mediante l'analisi di polimorfismi genetici STR localizzati su cromosomi non sessuali (autosomi). In tabella sono riportati i marcatori previsti da European Standard Set (ESS) e Combined DNA Index System (CODIS):

| Extended ESS | CODIS | Expanded CODIS |
|--------------|---------|----------------|
| D3S1358 | D3S1358 | D3S1358 |
| vWA | vWA | vWA |
| D8S1179 | D8S1179 | D8S1179 |
| D21S11 | D21S11 | D21S11 |
| D18S51 | D18S51 | D18S51 |
| TH01 | TH01 | TH01 |
| FGA | FGA | FGA |
| D1S1656 | - | D1S1656 |
| D2S441 | - | D2S441 |
| D10S1248 | - | D10S1248 |
| D12S391 | - | D12S391 |
| D22S10145 | - | D22S10145 |
| - | CSF1PO | CSF1PO |
| - | TPOX | TPOX |
| - | D5S818 | D5S818 |
| - | D7S820 | D7S820 |
| - | D13S317 | D13S317 |
| - | D16S539 | D16S539 |
| - | - | D19S433 |
| - | - | D2S1338 |

2.4.3 STR del cromosoma Y

L'analisi di STR linea maschile-specifici localizzati sul cromosoma Y (Y-STR) trova applicazione assieme o in alternativa all'analisi di STR autosomici in molteplici circostanze quali ad esempio: analisi di tracce miste maschili/femminili (ad es. violenze sessuali); indagini di parentela; ricerca di persone scomparse.

Il profilo genetico generato dalla combinazione degli alleli di più Y-STR è chiamato "aplotipo".

L'aplotipo minimo da indagare è da molti anni identificato nel core-set denominato "minimal haplotype".

Oggi sono disponibili sistemi commerciali di multiplex PCR comprendenti fino a 27 Y-STR, in alcuni casi comprendenti anche "Rapidly Mutating" (RM) Y-STR, dotati di tasso di mutazione particolarmente elevato, che hanno dimostrato di poter incrementare la differenziazione di soggetti appartenenti alla stessa linea paterna.

Ai fini forensi si raccomanda di utilizzare almeno i 17 Y-STR indicati in tabella.

| Y-STR | Indicazioni | Note | Y-STR | Indicazioni | Note |
|----------|--------------|-------------------|----------|-------------|----------|
| DYS19 | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS449 | Opzionale | RM Y-STR |
| DYS385 | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS460 | Opzionale | |
| DYS389I | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS481 | Opzionale | |
| DYS389II | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS518 | Opzionale | RM Y-STR |
| DYS390 | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS533 | Opzionale | |
| DYS391 | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS549 | Opzionale | |
| DYS392 | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS570 | Opzionale | RM Y-STR |
| DYS393 | Raccomandato | Minimal haplotype | DYS576 | Opzionale | RM Y-STR |
| DYS437 | Raccomandato | | DYS627 | Opzionale | RM Y-STR |
| DYS438 | Raccomandato | | DYS643 | Opzionale | |
| DYS439 | Raccomandato | | DYF387S1 | Opzionale | RM Y-STR |
| DYS448 | Raccomandato | | | | |
| DYS456 | Raccomandato | | | | |
| DYS458 | Raccomandato | | | | |
| DYS635 | Raccomandato | | | | |
| YGATAH4 | Raccomandato | | | | |

2.4.4 STR del cromosoma X

Gli X-STR vengono prevalentemente applicati allo studio del rapporto di parentela in casi complessi, spesso a complemento dell'analisi di STR autosomici e del cromosoma Y, in particolare: indagini di paternità deficitarie in cui sono coinvolte figlie femmine; persone scomparse; incesto; identificazione delle vittime di attentati e disastri di massa.

Un aspetto da considerare è che i loci sono fisicamente concatenati sullo stesso cromosoma e quindi non vengono ereditati in modo indipendente l'uno dall'altro (c.d. *linkage*). Inoltre, marcatori strettamente concatenati mostrano spesso *linkage disequilibrium (LD)*, cioè l'associazione non casuale degli alleli in un aplotipo.

I loci generalmente analizzati sul cromosoma X sono suddivisi in 4 gruppi di linkage e il set di dati ottenuti da ciascuno di questi gruppi costituisce l'aplotipo:

- Linkage group 1 (Xp22): DXS10148, DXS10135 e DXS8378;
- Linkage group 2 (Xp12): DXS7132, DXS10079, DXS10074 e DXS10075;
- Linkage group 3 (Xp26): DXS10103, HPRTB e DXS10101;
- Linkage group 4 (Xp28): DXS8377, DXS10146, DXS10147, DXS10134 e DXS7423).

Gli aplotipi vengono ricostruiti mediante kit del commercio, o saggi sviluppati in laboratorio, che contengono da 4 a 12 marcatori del cromosoma X (da uno a tre per gruppo di linkage). Ai fini della

valutazione biostatistica è dunque opportuno disporre di adeguati database aplotipici per i marcatori che compongono i 4 gruppi di linkage.

La DNA Commission dell'*ISFG* ha recentemente redatto linee guida per l'uso dei microsatelliti del cromosoma X negli studi parentali in cui si raccomanda di utilizzare l'analisi dei marcatori X a supplemento dell'analisi dei marcatori autosomici standard quando questa fornisce un risultato inconclusivo.

2.4.5 Marcatori per la diagnosi di genere

Di regola, i convenzionali sistemi per la tipizzazione di STR autosomici e X-STR includono uno o più marcatori per la determinazione del sesso del donatore di una traccia. Quello più diffuso è rappresentato dal gene dell'Amelogenina, localizzato nella regione pseudoautosomica dei cromosomi sessuali, che presenta nel primo introne una sequenza sul cromosoma X più corta di 6 paia di basi rispetto a quella sul cromosoma Y. Un'ampia delezione del tratto di cromosoma Y interessato è relativamente frequente in maschi provenienti dal subcontinente indiano (2-8%), i cui campioni risulteranno pertanto al test come di sesso femminile. In casi che coinvolgono verosimilmente soggetti provenienti da questa area geografica è pertanto opportuno integrare il dato con altri marcatori localizzati sul cromosoma Y. La mancata amplificazione del frammento Y-specifico con test dell'Amelogenina è evento più raro ma non del tutto trascurabile anche in popolazioni europee (un individuo ogni 5000 all'incirca).

2.4.6 I polimorfismi del DNA mitocondriale (mtDNA)

Lo studio di aplotipi del mtDNA trova applicazione in tracce contenenti DNA nucleare altamente degradato o costituite da cellule anucleate (ad es. peli telogen o privi di bulbo).

Allo stato, la tecnica prevalente in ambito forense per l'analisi di aplotipi mtDNA è rappresentata dal sequenziamento con metodo di Sanger (pur essendo prevedibile che nel prossimo futuro questa sarà completamente soppiantata da tecniche di Next Generation Sequencing, vedi sezione 2.4.8).

Storicamente, i protocolli sviluppati in ambito forense prevedono il sequenziamento di specifiche regioni ipervariabili (HVS-I, 16024-16365; HVS-II, 73-340 e, secondariamente, HVS-III, 340-576) localizzate entro la regione di controllo del mtDNA.

Per il rischio particolarmente elevato di contaminazione nell'analisi del mtDNA, ogni laboratorio è tenuto a osservare una buona pratica di laboratorio e le raccomandazioni contenute nelle linee guida pubblicate dall'*ISFG* nel 2000, revisionate e sviluppate nel 2014.

In tutte le fasi del processo di laboratorio devono essere eseguiti controlli negativi e positivi così come bianchi dei reagenti di estrazione.

La mancanza di kit commerciali a supporto del processo di laboratorio, l'elevato rischio di contaminazione e di generare artefatti di sequenziamento influiscono sulla qualità dell'analisi di mtDNA in forense. Inoltre la mancanza di sistemi d'automazione nei processi che intercorrono tra la produzione del dato di laboratorio e la stesura del report analitico rappresentano un aspetto critico dell'analisi di mtDNA. Per tali motivi è di assoluta importanza l'accurata revisione degli aplotipi secondo le linee-guida sopra menzionate.

In generale, i laboratori che impiegano l'analisi del mtDNA in casi forensi devono indicare chiaramente nei report analitici la procedura utilizzata (primer di PCR, porzione della regione di controllo considerata, etc.) e la validazione interna/esterna eseguita. A questo proposito è raccomandata la regolare partecipazione ad appropriati *proficiency test*.

2.4.6.1 Nomenclatura degli aplotipi mitocondriali

Le sequenze di mtDNA devono essere allineate e le variazioni nucleotidiche annotate rispetto alla *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS, NC001807), secondo i criteri di nomenclatura indicati in letteratura.

E' necessario che ciascun laboratorio adotti un criterio consistente nella nomenclatura, esplicitandolo nel report analitico.

Il sistema di nomenclatura è in accordo con la filogenesi mitocondriale secondo le linee guida pubblicate dall'*ISFG* nel 2000 e nel 2014.

Il criterio deve essere il medesimo adottato nel database popolazionistico utilizzato per la stima delle frequenze aplotipiche, oppure è possibile ricorrere a database in grado di effettuare ricerche indipendenti dall'allineamento quali *EDNAP Mitochondrial DNA Population Database (EMPOP)*, www.empop.online.

2.4.7 SNPs e Indels

Indels (polimorfismi di inserzione/delezione) possono essere utilizzati come marcatori aggiuntivi in casi di paternità deficitarie.

SNPs a fini identificativi possono essere utili per la tipizzazione di campioni contenenti DNA degradato e sono inclusi nei pannelli di marcatori tipizzati con tecniche di sequenziamento di nuova generazione (vedi 2.4.8).

2.4.8 Massively Parallel Sequencing (MPS)

Con il termine "Massively Parallel Sequencing" (MPS) si intende una vasta gamma di tecniche di sequenziamento parallelo massivo, in grado di processare un gran numero di campioni in un singolo esperimento e ottenere migliaia di letture di ogni singola base.

In generale i metodi di MPS si basano su un arricchimento iniziale del DNA target, mediante PCR o cattura con probe, seguito dalla preparazione di una library di frammenti di DNA d'interesse combinati ad opportuni adattatori che vengono quindi sottoposti ad amplificazione clonale e sequenziamento.

Recentemente sono stati introdotti sul mercato sistemi commerciali dedicati ad applicazioni forensi per l'analisi MPS, tanto di STR, quanto di polimorfismi di singolo nucleotide (single nucleotide polymorphisms, SNP) utili sia all'identificazione individuale che alla determinazione di caratteristiche somatiche (colore degli occhi e dei capelli) e dell'origine bio-geografica, nonché per il sequenziamento di mtDNA.

Stante la novità delle metodiche e la continua evoluzione dei sistemi MPS attualmente disponibili sul mercato, se ne raccomanda l'utilizzo solo se l'intero workflow di lavoro è stato validato internamente secondo le procedure di assicurazione di qualità del laboratorio e se la tecnologia impiegata è opportunamente supportata o da una validazione specifica effettuata dall'azienda produttrice (developmental validation) e/o da letteratura scientifica su riviste di settore.

2.4.9 Interpretazione dei risultati di tipizzazione genica di marcatori aploidi

Y-STR

Stima della frequenza aplotipica

La stima della frequenza aplotipica si rende necessaria per esprimere il peso dell'evidenza quando vi è piena coincidenza aplotipica tra campioni di interesse in:

- indagini identificative (traccia a contribuente singolo)
- indagini di consanguineità,

Poiché i singoli Y-STR sono tutti concatenati sul medesimo cromosoma e non soggetti a ricombinazione meiotica, la regola del prodotto non può essere applicata per stimare la frequenza di un aplotipo; al contrario si devono utilizzare ampi database di riferimento che raccolgono le frequenze degli aplotipi piuttosto che di singoli alleli.

Esistono vari database pubblici di frequenze aplotipiche. Quello rappresentativo del maggior numero di popolazioni è *YHRD* (www.yhrd.org) che al momento contiene oltre 188.000 minimal haplotypes (aggiornato a settembre 2017). Il database comprende 5203 cromosomi Y italiani, che rendono l'Italia uno dei paesi più rappresentati nel *YHRD*.

I tool associati al sito *YHRD* consentono di calcolare la frequenza aplotipica (associando, ove applicabile, anche un intervallo di confidenza) con vari possibili approcci tra quelli descritti in letteratura.

Nel report si deve indicare quale/quali approcci statistici sono stati impiegati per calcolare la frequenza aplotipica riportata e se la stima si riferisce all'intero database o a singole "metapopolazioni" (gruppi di popolazioni tra loro strettamente interconnesse per fattori genetici, culturali e geografici) in cui esso è suddiviso (i campioni europei, ad esempio, sono raggruppati in *YHRD* in tre diverse meta popolazioni: est, sud-est, ovest) o al database "nazionale" (definito dai confini politici del paese di riferimento).

Occorre inoltre indicare la versione del database (release number) nei confronti della quale è stata effettuata la ricerca e il set di Y-STR considerati (minimal haplotype, etc...).

Nel report finale è importante sottolineare che un determinato aplotipo Y-STR è condiviso da tutti i soggetti di sesso maschile con un comune antenato maschile recente. È possibile, utilizzando marcatori RM Y-STR, discriminare soggetti appartenenti alla stessa linea paterna.

X-STR

Rimandando alle linee guida di recente pubblicate, si evidenzia che il calcolo biostatistico è concettualmente simile a quello previsto dalle linee guida internazionali per gli STR autosomici e del cromosoma Y e dunque basato sul calcolo del rapporto di verosimiglianza date le due ipotesi alternative di consanguineità/non consanguineità. In caso di X-STR è tuttavia necessario tenere conto della presenza di linkage e del possibile *LD* tra marcatori.

L'effetto di *LD* può essere valutato solo disponendo di database aplotipici di riferimento. Tuttavia tanto gli archivi informatici (www.chrx-str.org) quanto le pubblicazioni scientifiche in cui ad oggi sono stati raccolti dati sulla variabilità umana di X-STR di interesse forense comprendono informazioni aplotipiche assai limitate. Per la popolazione italiana, il più vasto database attualmente disponibili è composto da 200 individui.

Sono attualmente disponibili numerosi software sviluppati con algoritmi matematici in grado di analizzare marcatori genetici caratterizzati da linkage (e talora *LD*), quali X-STR, generando gli opportuni valori di LR.

L'operatore dovrà essere esplicito nell'indicare nel report finale: l'approccio di calcolo (valutazione del solo linkage o anche di *LD*) e software impiegato, il database di frequenze alleliche/aplotipiche selezionato, i valori di tasso di ricombinazione e il tasso di mutazione adottati.

mtDNA

L'aplotipo mitocondriale ottenuto da un reperto forense può essere direttamente confrontato con l'aplotipo appartenente a un campione di riferimento oppure, per esempio nel caso dell'identificazione di un cadavere, con aplotipi ottenuti da soggetti imparentati per via materna. Dall'esito della comparazione di aplotipi mtDNA, possono emergere tre giudizi: **esclusione, non esclusione, giudizio inconclusivo** secondo le indicazioni riportate nelle linee guida sull'interpretazione del mtDNA redatte dall'*ISFG* nel 2000 e nel 2014

Nel caso di non esclusione, il peso dell'evidenza è espresso mediante stima della frequenza dell'aplotipo mitocondriale in questione in un adeguato database popolazionistico. La ricerca nel database popolazionistico dovrebbe essere eseguita considerando tutte le sequenze disponibili, con riguardo all'intervallo di sequenziamento (interpretazione) considerato.

Le posizioni a elevata variabilità come le varianti in lunghezza nei tratti omopolimerici non dovrebbero essere considerate nella ricerca nei database per la stima delle frequenze. Le posizioni eteroplasmiche dovrebbero essere inserite durante la ricerca in modo da non escludere nessuna delle varianti eteroplasmiche.

Esistono vari database pubblici di frequenze aplotipiche mitocondriali. In particolare *EMPOP* è il database attualmente raccomandato da *ISFG*, in ragione dei multipli sistemi di controllo di qualità

delle sequenze archiviate e dell'ampiezza del campione di popolazione (oltre 30.000 aplotipi suddivisi in "metapopolazioni", di cui 398 italiani, in base al più recente Release 11).

I laboratori devono comunque esplicitare ed essere in grado di giustificare scientificamente la scelta del database e l'approccio statistico utilizzato nella refertazione dei risultati.

I report analitici che includono stime di frequenze aplotipiche ottenute mediante *EMPOP* dovrebbero indicare: versione di *EMPOP* utilizzata; range nucleotidico della ricerca; tipo di match ("pattern", cioè comprensivo di tutte le possibili basi che determinano una posizione eteroplasmica, oppure "literal"); posizioni interessate da polimorfismi di lunghezza escluse dalla ricerca; sottopopolazione entro la quale è stata effettuata la stima.

Il rapporto di verosimiglianza per il mtDNA è calcolato come riportato in: Parson W. et al. *ISFG Guidelines* (2014).

E' peraltro doveroso sottolineare nel report finale che un determinato aplotipo mitocondriale è condiviso da tutti i soggetti che sono imparentati in linea materna.

Bibliografia

Bandelt HJ, Lahermo P, Richards M, Macaulay V. Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. *Int J Legal Med.* 2001;115:64-9.

Bini C, Riccardi LN, Ceccardi S, Carano F, Sarno S, Luiselli D, Pelotti S. Expanding X-chromosomal forensic haplotype frequencies database: Italian population data of four linkage groups. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;15:127-30

Budowle B, Polanskey D, Fisher C, Den Hartog B, Kepler R, Elling J. Automated Alignment and Nomenclature for Consistent Treatment of Polymorphisms in the Human Mitochondrial DNA Control Region, *J Forensic Sci.* 2010;55:1190-1195

Cadenas AM, Regueiro M, Gayden T, Singh N, Zhivotovsky LA, Underhill PA, Herrera RJ. Male amelogenin dropouts: phylogenetic context, origins and implications. *Forensic Sci Int.* 2007;166:155-63.[http://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/texts_and_documents/RecR\(99\)3.pdf](http://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/texts_and_documents/RecR(99)3.pdf)

Carracedo A., Bär W., Lincoln P., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P., Budowle B., Brinkmann B., Gill P., Holland M., Tully G., Wilson M. (2000), 'DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing.', *Forensic Sci Int.* 11, 79-85

<https://empop.online>

Ge.FI 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 <http://www.gefi-isfg.org/>

Gill P., Brenner C., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Jobling MA., De K., Kayser M., Krawczak M., Mayr WR., Morling N., Olaisen B., Pascali V., Prinz M., Roewer L., Schneider PM., Sajantila A., Tyler-smith C. (2001), 'DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs', *Forensic Sci Int.* 124, 5-10

Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, Carracedo A, Guidet F, Luque JA, Lessig R, Mayr WR, Pascali VL, Prinz M, Schneider PM, Morling N. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007;1:223-231

Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM; International Society of Forensic Genetics. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Int J Legal Med.* 2006;120:191-200.

Hares DR. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;17:33-34. Hares DR. Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;17:33-4.

Kayser M, Sajantila A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 2001;118:116-21

Kaye N Ballantyne et al, Toward Male Individualization with Rapidly Mutating Y-Chromosomal Short Tandem Repeats, *Hum Mutat.* 2014; 35: 1021–1032

Kling D, Dell'Amico B, Tillmar AO. FamLinkX - implementation of a general model for likelihood computations for X-chromosomal marker data. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;17:1-7

Irwin JA, Saunier JL, Niederstätter H, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, Brandstätter A, Parson W, Parsons TJ. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol.* 2009y;68:516-27.

Nothnagel M, Szibor R, Vollrath O, Augustin C, Edelmann J, Geppert M, Alves C, Gusmão L, Vennemann M, Hou Y, Immel UD, Inturri S, Luo H, Lutz-Bonengel S, Robino C, Roewer L, Rolf B, Sanft J, Shin KJ, Sim JE, Wiegand P, Winkler C, Krawczak M, Hering S. Collaborative genetic mapping of 12 forensic short tandem repeat (STR) loci on the human X chromosome. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6:778-84.

Parson W, Bandelt HJ. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1:13-9

Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, Pokorak E, Prinz M, Salas A, Schneider PM, Parsons TJ; DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;13:134-42.

Phillips C, Ballard D, Gill P, Court DS, Carracedo A, Lareu MV. Accurate measurement of genetic distances between syntenic STR pairs using HapMap high density SNP data. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6:354-65

Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, Schneider PM; International Society for Forensic Genetics. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1:3-12.

<http://www.gefi-isfg.org/temp/2202201374428.pdf>

Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol.* 2004;26:133-46.

Röck AW, Dür A, van Oven M, Parson W. Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Dec;7(6):601-9. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.07.005. Epub 2013 Aug 12

Rolf B, Keil W, Brinkmann B, Roewer L, Fimmers R. Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability for paternity in cases of mutations. *Int J Legal Med.* 2001;115:12-5

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Analysis by Forensic DNA Testing Laboratories (2013) http://swgdam.org/SWGDAM%20mtDNA_Interpretation_Guidelines_APPROVED_073013.pdf

Sijen T. Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;18:21-32.

Steinlechner M, Berger B, Niederstätter H, Parson W. Rare failures in the amelogenin sex test. *Int J Legal Med.* 2002 Apr;116(2):117-20

Tillmar AO, Kling D, Butler JM, Parson W, Prinz M, Schneider PM, Egeland T, Gusmão L. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2017 ;29:269-275.

Toni C, Domenici R, Presciuttini S. Genotype probabilities of pairs of individuals for X-chromosome markers. *Transfusion.* 2007;47:1276-80.

Wilson, MR, Allard MW, Monson K, Miller KWP, Budowle B. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. *Forensic Sci Int.* 2002;129:35-42.

Willuweit S, Roewer L. The new Y Chromosome Haplotype Reference Database. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;15:43-8.

SEZIONE 3

CRITERIOLOGIA VALUTATIVA NELL'INTERPRETAZIONE DEI PROFILI GENETICI STRs AUTOSOMICI

1. Criteri analitico-valutativi propedeutici all'interpretazione dei risultati di tipizzazione genetica

Nelle indagini di genetica forense (identificazione personale, consanguineità e identificazione di vittime in disastri di massa (Disaster Victims Identification, DVI) è necessario: che ogni laboratorio definisca preliminarmente criteri analitico-valutativi da applicare ai tracciati elettroforetici (dati grezzi, o file .fsa o .hid). Le seguenti fasi sono, quindi, da considerarsi propedeutiche all'interpretazione del profilo genetico:

A) **Definizione di valori soglia per la valutazione dei tracciati elettroforetici**, la cui funzione è quella di consentire l'identificazione dei segnali allelici peculiari del campione/reperto biologico nell'elettroferogramma, escludendo gli artefatti. I valori soglia sono definiti a seguito di validazioni interne di laboratorio e applicati ai dati grezzi delle corse elettroforetiche. Il metodo utilizzato per la validazione deve essere condiviso dalla comunità scientifica internazionale e deve essere documentato nelle procedure di laboratorio.

- **La soglia analitica (*Analytical Threshold, AT* o *Limit of Detection, LoD*)**, può essere definita come il valore, espresso in RFU, che permette di discriminare un segnale analitico (allele) dal rumore di fondo (background noise). E' necessario specificare nelle procedure di laboratorio il relativo grado di confidenza con cui si è giunti a determinare tale valore soglia. Vengono considerati dal software di tipizzazione genetica soltanto picchi elettroforetici di intensità pari o superiori alla *AT*, i quali possono, quindi, essere identificati con la relativa denominazione allelica. E' possibile impostare un valore di *AT* differenziato per ogni banda spettrale oppure unico da applicare a tutte le bande spettrali.

- **La soglia di linearità (*Limit of Linearity, LoL*)** del sistema analitico utilizzato è il valore, espresso in RFU, corrispondente al punto di saturazione del rilevatore della strumentazione utilizzata (sequenziatore). Oltre tale soglia lo strumento non produce più una risposta lineare del segnale all'incremento della quantità di amplificato. La presenza di alleli oltre il *LoL* si traduce in picchi sdoppiati, o tagliati, in un incremento del rumore di fondo, in segnali aspecifici che possono complicare l'interpretazione dei risultati. In tali condizioni, il campione/reperto biologico deve essere sottoposto ad una nuova procedura di multiplex-PCR con una quantità inferiore di DNA che tenga conto anche del dato di quantificazione, ovvero i prodotti amplificati devono essere opportunamente diluiti in modo che gli alleli del profilo genetico abbiano altezze in RFU inferiori al *LoL*.

- **La soglia delle bande stutter (*stutter threshold*)** può essere definita come quel valore limite, espresso in termini relativi (o percentuali) rispetto al picco principale, al di sotto del quale segnali analitici in posizione stutter (*backward stutter* -1 o *forward stutter* +1) possono essere considerati come artefatti di polimerizzazione. Il valore della soglia bande stutter viene definito, per ogni specifico locus, come rapporto fra l'altezza (o l'area) del segnale analitico in posizione stutter e quella dell'allele di riferimento. E' possibile impostare nel software di genotipizzazione un valore di soglia bande stutter per ogni locus oppure un valore unico applicabile a tutti i loci.

- **La soglia stocastica (*Stochastic Threshold, ST*)** rappresenta un indicatore di qualità dei segnali allelici per allertare l'analista circa la possibilità che non tutta l'informazione genetica del campione/reperto biologico possa essere stata rilevata nel corso dell'analisi. La *ST* risulta essenziale specie nel caso di analisi di reperti caratterizzati da una limitata quantità di DNA e/o da una significativa degradazione. In tali condizioni, eventi stocastici possano produrre artefatti di

amplificazione quali sbilanciamento allelico nei loci eterozigoti, perdita allelica nei loci eterozigoti e/o omozigoti (*drop-out*), incremento delle bande stutter e eventi di comparsa allelica (*drop-in*). La *Stochastic Threshold* è, quindi, un valore espresso in RFU, al di sopra del quale è ragionevole assumere - specificando il relativo grado di confidenza- che non sia avvenuto un fenomeno di *drop out* allelico. La soglia stocastica deve necessariamente essere definita empiricamente da ogni laboratorio attraverso validazioni interne da condursi su ciascun sistema di multiplex-PCR.

B) Definizione di parametri e criteri valutativi

Il tracciato dovrà essere valutato in rapporto a:

- **numero di alleli per ogni locus**, chiaramente rilevato dal software di genotipizzazione, evidenzia l'eventuale presenza di più di due segnali allelici a più loci, allertando l'analista circa la possibilità di un profilo commisto. In questo caso, i valori del rapporto dei segnali allelici (*Mixture ratio, Mr*) e della proporzione dei segnali allelici nella miscela (*Mixture proportion, Mx*), sia per singolo locus che per intero tracciato elettroforetico, potranno essere calcolati e valutati secondo le modalità descritte per tali parametri nel glossario reperibile in: SWGDAM Interpretation Guidelines 2017.

- **bilanciamento degli alleli nei loci eterozigoti (*Heterozygote balance, Hb*)** o rapporto tra l'altezza dei picchi (*Peak Height Ratio, PHR*) nei loci eterozigoti è un indice del grado di sbilanciamento tra gli alleli di un locus eterozigote. Solitamente, in reperti/campioni biologici in condizioni qualitativamente e quantitativamente ottimali, il valore di *Hb* ad un locus è ≥ 0.6 (60%). Le modalità di calcolo di tale parametro sono esplicitate nel glossario reperibile in: SWGDAM Interpretation Guidelines 2017.

2. Valutazione di conformità dei controlli di analisi

Una volta definiti i criteri analitico-valutativi, si procede alla valutazione dell'assegnazione dei picchi nello *standard interno*, dei tracciati elettroforetici ottenuti dal *ladder allelico*, dai campioni di *controllo positivo e negativo (di estrazione e di amplificazione)* e alla verifica dei risultati di tipizzazione dei campioni/reperti biologici in *database di esclusione*.

2.1 Standard interno e DNA Ladder allelico

a) **Standard interno.** Si dovrà verificare la corretta separazione elettroforetica e la corretta assegnazione delle dimensioni di tutti i frammenti contemplati nel manuale d'uso del sistema di multiplex-PCR.

b) **DNA Ladder allelico.** L'elettroferogramma relativo al DNA *ladder allelico* dovrà essere necessariamente previsto in ogni sessione di elettroforesi capillare, per ogni sistema di multiplex-PCR utilizzato. Nel caso in cui debba essere analizzato un gran numero di campioni nella stessa sessione di corsa elettroforetica (piastre da 96 campioni) dovrà essere corso più di un ladder allelico. Non sarà possibile utilizzare ladder allelici di altre sessioni di elettroforesi. Si dovrà verificare la corretta separazione elettroforetica e la corretta assegnazione degli alleli. Qualora compaiano assegnazioni alleliche non previste o difformi (*off-ladder*), si dovrà procedere a una verifica dell'attribuzione dello standard interno e, nel caso in cui la criticità non venga superata, si dovrà necessariamente effettuare una nuova corsa elettroforetica.

2.2 Controllo positivo di amplificazione

Al fine di validare l'analisi dei reperti/campione si deve inizialmente procedere alla valutazione dell'elettroferogramma ottenuto da almeno un controllo positivo per ogni sessione di amplificazione, il quale deve presentare una corretta assegnazione dei genotipi ad ognuno dei loci

analizzati. Qualora tale campione di controllo fornisca risultati difformi dai genotipi attesi, ovvero non fornisca alcun risultato, anche dopo nuova corsa elettroforetica, sarà necessario sottoporre a nuova amplificazione tutti gli estratti dei campioni/reperti biologici di quella sessione di analisi.

2.3 Controllo negativo di estrazione e controllo negativo di amplificazione

La valutazione dell'attendibilità dei risultati di tipizzazione richiede obbligatoriamente la predisposizione di due tipologie di controlli negativi costituiti, rispettivamente, dal campione di controllo dei reagenti utilizzati per l'estrazione del DNA dai reperti/campioni biologici (*controllo negativo di estrazione*) e da quello dei reagenti utilizzati per allestire la reazione di amplificazione (*controllo negativo di PCR o negativo di amplificazione*).

- Controllo negativo di estrazione

In ogni sessione di analisi di campioni/reperti biologici deve essere contestualmente sottoposto a procedura di estrazione del DNA un campione contenente tutti i reagenti impiegati per tale procedura, ad eccezione della matrice biologica. Questo campione deve essere sottoposto alla procedura di tipizzazione della medesima sessione di analisi di campioni/reperti biologici (quantificazione, multiplex-PCR, elettroforesi capillare).

1. Nel caso in cui nel controllo negativo di estrazione non compaiano segnali allelici superiori alla AT, l'analisi può essere considerata da subito conforme a quanto atteso.
2. Nel caso in cui in tale campione di controllo siano evidenziati picchi elettroforetici corrispondenti ad alleli, il laboratorio dovrà stabilire e documentare i criteri di valutazione che hanno condotto a ritenere conformi o meno i risultati di tale sessione di estrazione di campioni/reperti. La valutazione di conformità dovrà tener conto della possibilità che tale risultato analitico possa avere avuto una significativa ricaduta sull'esito delle analisi condotte su tutti i campioni/reperti di quella sessione.

Controllo negativo di amplificazione

In ogni sessione di amplificazione deve essere preferibilmente allestito un *doppio campione di controllo negativo di amplificazione*, costituito dai reagenti utilizzati per amplificare il sistema multiplex-PCR e da acqua a complementare il volume. Tali campioni dovranno essere posizionati, preferibilmente, all'inizio e alla fine delle sessioni di amplificazione e di corsa elettroforetica dei campioni/reperti biologici.

1. Se nelle due repliche non compaiano segnali allelici superiori alla AT, l'analisi può essere considerata da subito conforme a quanto atteso.
2. Se nelle due repliche compaiano picchi allelici superiori alla AT che si consolidano (stesso allele presente nelle analisi di tipizzazione dei due controlli negativi), si dovrà procedere ad una verifica della presenza degli alleli consolidati nei tracciati riferiti a campioni/reperti biologici della stessa sessione di analisi, valutando se tale risultato analitico (contaminazione) possa avere una significativa ricaduta sull'esito delle analisi condotte su tutti i campioni/reperti biologici di quella sessione.
3. Se nelle due repliche compaiano picchi allelici superiori alla AT che però non si consolidano (l'allele non si osserva in entrambe le due analisi di tipizzazione dei controlli negativi) si dovrà procedere a una verifica del possibile rischio che tale risultato analitico possa avere una significativa ricaduta sull'esito delle analisi condotte su tutti i campioni/reperti biologici di quella sessione.

Per le ipotesi di cui al punto 2 e 3, al termine del processo valutativo che dovrà essere documentato, il laboratorio si dovrà esprimere sulla conformità o non conformità dei risultati di tale sessione di analisi di campioni/reperti biologici.

Nel caso di sessioni di amplificazioni con numero limitato di campioni/reperti (≤ 5), sarà possibile allestire un unico controllo negativo. In tal caso, non dovranno comparire segnali allelici superiori alla AT in tale campione di controllo.

2.4 Database di eliminazione

Una volta verificata la conformità dei risultati di tipizzazione dei controlli e la corretta separazione elettroforetica del *ladder allelico*, si dovrà procedere a confrontare gli elettroferogrammi dei campioni/reperti biologici con i profili genetici archiviati in database di eliminazione (vedi Requisiti minimi del laboratorio-1.2 Raccomandazioni generali) e con i profili genetici di tutti i campioni/reperti biologici sottoposti ad accertamento nel laboratorio in un arco temporale sufficientemente lungo, in ragione del flusso di lavoro di ogni singolo laboratorio, per escludere una cross-contaminazione tra campioni/reperti biologici precedentemente sottoposti ad analisi.

3. Verifica della presenza di artefatti di amplificazione e di corsa elettroforetica

E' compito dell'analista identificare nei tracciati elettroforetici gli artefatti di amplificazione e di corsa e verificarne l'eventuale ricaduta sull'esito delle analisi condotte sui campioni/reperti biologici.

Qui di seguito si riporta un elenco degli artefatti (per il glossario si rimanda a: SWGDAM, Interpretation Guidelines, 2017):

- a. Stutter.
- b. Spikes.
- c. Pull-up.
- d. Dye-blobs
- e. Picco sdoppiato (split peak ovvero shoulder and tail peak).

4. Interpretazione dei risultati della tipizzazione genetica di campioni e reperti biologici

Per l'interpretazione dei risultati della tipizzazione genetica di campioni e reperti biologici si deve procedere in ordine:

- Valutando le caratteristiche dell'elettroferogramma
- Adottando procedure di interpretazione mirate.

4.1 Valutazione delle caratteristiche dell'elettroferogramma

In accordo alla letteratura scientifica internazionale la procedura di interpretazione di un elettroferogramma è una attività basata sulla cosiddetta *opinione dell'esperto* ("*expert opinion*"), che eventualmente coinvolga anche più esperti, cioè su un processo valutativo e interpretativo che, pur risentendo di una ineliminabile quota di soggettività dell'analista, deve essere basato sulla valutazione di dati analitici oggettivi e degli elementi circostanziali del caso. I dati oggettivi che devono essere valutati dall'analista sono:

- *le caratteristiche qualitative*: presenza/assenza degli alleli ad ogni locus rispetto alla AT ed alla soglia bande stutter; presenza/assenza di più di due alleli ad ogni locus; presenza/assenza di bande artefattuali e di fenomeni stocastici;
- *le caratteristiche quantitative*: altezza dei segnali con riferimento alla AT, alla ST ed alla soglia bande stutter; livello di bilanciamento dei segnali nei loci eterozigoti (*Heterozygote balance*); numero di alleli per locus di altezza pari o superiore alla AT e alla ST; proporzione tra segnali allelici quando il numero degli alleli ad un locus >2 (*Mixture ratio* e/o *Mixture proportion*).

L'analista deve avvalersi degli indicatori valutativi preimpostati nel software di genotipizzazione, ricorrendo comunque anche alla propria "*expert opinion*".

La valutazione delle caratteristiche dell'elettroferogramma permetterà di stabilire:

A se il profilo genetico derivi dal contributo biologico di un singolo soggetto (**profilo genetico a singolo contributore**)

B se il profilo genetico derivi dal contributo biologico di almeno due soggetti (**profilo genetico misto**). Il numero di soggetti che può aver contribuito alla genesi di una traccia viene valutato principalmente tramite il *numero massimo di alleli per locus (massima conta allelica, Maximum Allele Count, MAC)*, anche se altri metodi possono essere utilizzati sulla base della letteratura scientifica;

C se il profilo genetico si trovi in condizioni di complessità

Per essere considerato un profilo genetico in condizioni complesse, deve ricorrere almeno una delle seguenti caratteristiche:

- alleli di altezza inferiore alla *ST* a uno o più loci tipizzati;
- un numero di alleli per locus maggiore di quattro a uno o più loci tipizzati;
- profili genetici parziali (recanti un numero di loci correttamente tipizzati inferiori a quanto previsto dal pannello di multiplex-PCR), in accordo alle raccomandazioni ISFG del 2012.

Il grado di complessità cresce all'aumentare del numero di alleli per ogni locus e all'entità con cui si manifestano i fenomeni sopra descritti.

Occorre adottare in queste situazioni procedure di consolidamento per la verifica della ripetibilità dei dati con repliche di tipizzazione. L'esecuzione delle repliche di tipizzazione prevede l'amplificazione con sistemi di multiplex-PCR dello stesso estratto di DNA mantenendo costanti le condizioni di amplificazione (quantità di DNA stampo e numero di cicli) ed il sistema di multiplex-PCR utilizzato. È tuttavia ammesso anche variare le condizioni, modificando uno o più parametri quali la quantità di DNA e/o il numero di cicli di PCR e/o utilizzando un diverso sistema di multiplex-PCR che consenta di aggiungere informazioni al profilo della traccia purché tali variazioni siano state preventivamente validate. Anche in questo caso, è tuttavia necessario effettuare repliche di tipizzazione nelle nuove condizioni di amplificazione.

E' comunque sempre necessario esplicitare il sistema multiplex-PCR utilizzato per la singola genotipizzazione e le quantità di DNA utilizzate per le amplificazioni.

I profili genetici ottenuti nelle diverse repliche di amplificazione possono essere utilizzati per costruire un profilo genetico "*consensus*", nel quale sono riportati gli alleli che si presentano nel maggior numero delle repliche di amplificazione considerate e/o un profilo "*compositus*", nel quale vengono registrati tutti gli alleli ottenuti nelle differenti amplificazioni.

D se il profilo genetico risulti idoneo oppure inidoneo a comparazioni

La situazione in cui l'elettroferogramma non presenta alcun allele o soli pochi alleli al di sopra della *AT* rappresenta un caso incontrovertibile per dichiarare **l'inidoneità del profilo genetico alla comparazione**.

Ogni differente situazione andrà valutata secondo l'"*expert opinion*" e le modalità di interpretazione dovranno essere documentate.

In generale:

1. **profili genetici a singolo contributore** in cui risultano tipizzati in maniera affidabile (consolidati) almeno 10 loci, anche in condizioni di complessità, sono da ritenersi idonei a comparazioni ;
2. **profili genetici a singolo contributore** in cui risultano tipizzati in maniera affidabile (consolidati) meno di 10 loci. In questi casi i profili sono da ritenersi potenzialmente idonei a comparazioni;
3. **profili genetici a più contributori** in cui risultano tipizzati in maniera affidabile (consolidati) almeno 10 loci, anche se in condizioni di complessità e/o con un numero elevato di alleli per locus, sono da ritenersi potenzialmente idonei a comparazioni;
4. **profili genetici a più contributori** in cui risultano tipizzati in maniera affidabile (consolidati) meno di 10 loci, soprattutto se in condizioni di complessità e/o con un elevato numero di alleli per locus, è sconsigliata la comparazione e, comunque, deve essere valutata con estrema cautela.

Nei casi 3 e 4, qualora l'analista, secondo la propria "*expert opinion*" e secondo le procedure interne del laboratorio, valuti come idonei o non idonei a comparazioni profili genetici con tali caratteristiche, dovrà comunque motivare e documentare scientificamente i criteri adottati a fondamento della propria valutazione.

4.2. Procedura di interpretazione dei risultati e di comparazione dei profili genetici

4.2.1. Procedura di interpretazione di profili genetici da campioni di riferimento e da tracce biologiche a singolo contributore

Profili genetici a singolo contributore (vedi paragrafo 4.1)

- L'analisi di tipizzazione di un **campione biologico** deve fornire un profilo genetico a singolo contributore. In caso contrario si dovrà procedere a un ulteriore prelievo dal soggetto di confronto. Infatti, eccezionalmente, sono possibili genotipi derivanti da singolo contributore caratterizzati da tre alleli ad un singolo locus, generalmente dovuti ad anomalie genetiche quali trisomie, duplicazioni cromosomiche segmentali o mutazioni somatiche e casi (es. trapianto di midollo) in cui il tampone buccale può esibire un profilo misto. In tali casi il laboratorio dovrà acquisire adeguata documentazione.
- L'analisi di tipizzazione di un **reperto biologico** fornisce un profilo genetico a singolo contributore quando, dalla disamina del profilo, si osservano uno o due alleli per ogni locus, salvo l'eccezione di anomalie genetiche sopra riportate. È possibile (a discrezione dell'analista) consolidare il profilo replicando la tipizzazione anche se la prima amplificazione non ha evidenziato un profilo in condizioni di complessità. L'analisi di tipizzazione di un reperto biologico può fornire un profilo genetico a singolo contributore in condizioni di complessità. L'interpretazione di tali profili genetici dovrà essere condotta seguendo le raccomandazioni proposte dall'ISFG.

4.2.2. Procedura di comparazione di profili genetici a singolo contributore

Una volta ottenuto il profilo genetico utile per comparazioni, dall'analisi di un singolo reperto o da più reperti, vi è la necessità di confrontare il risultato con un campione biologico di riferimento.

In generale, dalla comparazione dei profili genetici si può definire se:

- a. l'individuo conosciuto è escluso come possibile contributore (esclusione);
 - b. l'individuo conosciuto non può essere escluso (è incluso) come possibile contributore del profilo genetico ottenuto dal reperto (inclusione);
 - c. i risultati della tipizzazione del DNA sono inconclusivi.
- a. **Esclusione (discordanza, non match)**. Se tra il profilo genetico derivante dal reperto e quello del campione di confronto sussistono differenze tali da non poter essere ragionevolmente giustificate né da fenomeni stocastici, né da fenomeni di degradazione, né da eventi di variazione (*SNPs o indels*) della sequenza nucleotidica, tale discordanza è biologicamente coerente con l'ipotesi di esclusione del soggetto come donatore della traccia. Se esiste una singola discordanza in un profilo con almeno 10 loci e la traccia e il campione di riferimento sono stati analizzati con diversi kit commerciali, si raccomanda di verificare i risultati utilizzando lo stesso kit commerciale. Nel caso in cui il profilo genetico del reperto si trovi in condizioni di complessità è consigliato verificare l'eventuale esclusione con una valutazione probabilistica in termini di LR con modelli semicontinui e/o continui.
 - b. **Inclusione (concordanza, match)**. Tra il profilo genetico derivante dal reperto e il profilo genetico del campione di confronto sussiste una piena concordanza tra i genotipi. Tale concordanza è biologicamente coerente con l'ipotesi di inclusione del soggetto come donatore

della traccia. L'inclusione deve essere sempre supportata da una valutazione probabilistica in termini di rapporto di verosimiglianza (LR) con modelli discreti e/o semicontinui e/o continui.

Il massimo dell'evidenza in favore dell'ipotesi dell'accusa è dato da valori di LR maggiori di 10^6 (un milione), cui è associato un “supporto estremamente forte all'ipotesi dell'accusa rispetto a quella della difesa”, ovvero che “l'evidenza è estremamente più probabile data l'ipotesi dell'accusa rispetto a quella della difesa”. La tabella che contiene i valori numerici di riferimento di LR e il relativo predicato verbale a supporto di tale valore è presente all'interno del documento pubblicato dall'ENFSI.

- c. **Inconclusività.** Tale risultato descrive la situazione in cui, dal confronto del profilo genetico del reperto con quello di un campione di confronto, non è possibile trarre, a seguito di valutazione probabilistica, un giudizio di inclusione ovvero di esclusione. L'analista potrà comunque stabilire ulteriori criteri di valutazione circa l'inconclusività del risultato motivando dettagliatamente tale decisione nel report finale.

4.2.3. Procedura di interpretazione di un profilo genetico misto da reperto biologico

Profili genetici misti (vedi paragrafo 4.1)

Un profilo misto si origina quando due o più soggetti contribuiscono, con propri fluidi biologici, a produrre una traccia rilevata su un reperto.

Allo stesso modo dei profili a singolo contributore, i profili genetici misti possono risentire di fenomeni degradativi e di fenomeni stocastici ma il grado di complessità risulta più accentuato rispetto ai profili a singolo contributore perché i contributi genetici al profilo misto possono essere interessati in maniera differente (e, spesso, non rilevabile) da tali fenomeni. L'interpretazione del profilo genetico misto dovrà essere condotta seguendo le raccomandazioni proposte dall'ISFG qui di seguito riassunte.

a. **Profilo genetico misto con singolo contributore maggioritario.**

In una traccia mista in cui siano presenti più di due alleli per molti loci è, a volte, possibile estrapolare un contributore maggioritario, quando uno o due alleli di ciascun locus della traccia sono in rapporto di altezza $\geq 3:1$ ¹ rispetto agli altri alleli dello stesso locus. In questi casi il profilo maggioritario così estrapolato potrà essere considerato come un profilo a singolo contributore (vedi par 4.2.1) per il confronto con un campione di riferimento e si potrà procedere al calcolo statistico (approccio ristretto, ovvero “*restricted combinatorial approach*”). È comunque possibile procedere al calcolo senza l'estrapolazione del contributore maggioritario (approccio non ristretto ovvero “*unrestricted approach*”) [SWGDM, 2017].

b. **Profilo genetico misto in assenza di un contributore maggioritario e di fenomeni stocastici.**

Nel caso di profili misti senza un evidente contributore maggioritario, è necessario procedere alla stima del numero dei contributori. Se per tutti i loci di un profilo completo sono presenti non più di 4 alleli, si può assumere che il numero dei contributori non correlati sia almeno due. Se il numero dei contributori è maggiore di due (più di quattro alleli per più loci) è opportuno

¹ Questo rapporto è richiamato, in relazione all'estrapolazione di un contributore maggioritario in tracce miste, all'art. 10 del DPR 7 aprile 2016, n°87 (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).

considerare nel calcolo statistico diversi scenari relativamente al numero dei contributori noti e non noti, possibilmente da concordare fra le parti. Le ipotesi contrapposte per le quali si calcola il valore dell'LR devono essere scientificamente consistenti rispetto alla composizione della traccia.

c. **Profilo genetico misto in assenza di un contribuente maggioritario e in presenza di fenomeni stocastici.**

Pone difficoltà aggiuntive rispetto al profilo misto in assenza di effetti stocastici. Fondamentale importanza assume il consolidamento nella verifica della ripetibilità dei dati con repliche di tipizzazione (vedi paragrafo 4.1). I genotipi potranno essere inferiti seguendo il metodo “*consensus*” e/o quello “*compositus*”.

4.2.4 Procedura di comparazione di un profilo genetico misto da reperto biologico

Il confronto del profilo genetico misto, utile per comparazioni, di un singolo reperto può portare a tre diverse conclusioni.

- a. **Esclusione (incompatibilità).** Se nel profilo genetico derivante dal reperto non si riscontrano gli alleli del campione di confronto e il mancato riscontro non può essere ragionevolmente giustificato né da fenomeni stocastici né da fenomeni di degradazione né da eventi di variazione della sequenza nucleotidica, tale incompatibilità è biologicamente coerente con l'ipotesi di esclusione del soggetto come contribuente della traccia mista. Quando il profilo genetico della traccia si trova in condizioni di complessità è raccomandato verificare l'eventuale esclusione con una valutazione probabilistica in termini di LR con modelli semicontinui e/o continui.
- b. **Inclusione (compatibilità).** Se nel profilo genetico derivante dal reperto si riscontrano gli alleli presenti nel profilo genetico del campione di confronto e l'eventuale mancato riscontro di alcuni alleli può essere ragionevolmente giustificato da fenomeni stocastici e da fenomeni di degradazione, tale compatibilità è biologicamente coerente con l'ipotesi di inclusione del soggetto come contribuente della traccia mista. L'eventuale mancato riscontro ad alcuni loci deve essere segnalato nel report ed è obbligatorio supportare la compatibilità con una valutazione probabilistica in termini di LR con modelli semicontinui e/o continui e/o discreti.
- c. **Inconclusività.** Tale risultato descrive la situazione in cui, dal confronto del profilo genetico del reperto con quello di un campione di confronto, non è possibile trarre, a seguito di valutazione probabilistica, un giudizio di inclusione ovvero di esclusione. L'analista potrà comunque stabilire ulteriori criteri di valutazione circa l'inconclusività del risultato motivando dettagliatamente tale decisione nel report finale.

4.3 La valutazione probabilistica del peso dell'evidenza nel processo di interpretazione dei profili genetici

La valutazione statistica del peso dell'evidenza è condotta per definire il significato dell'inclusione o dell'esclusione e richiede di specificare i valori di alcuni parametri necessari a sviluppare il calcolo statistico:

- **le frequenze alleliche della popolazione di riferimento.** La popolazione di riferimento è quella in cui avviene il fatto di interesse giudiziario. E' possibile usare anche frequenze alleliche riferite alla popolazione della vittima/sospetto/persona di interesse se informazioni circostanziali sulla provenienza etnica di tali soggetti sono disponibili. Il database delle frequenze utilizzato in ciascun caso particolare deve sempre essere chiaramente indicato.

Per la popolazione italiana, il GeFI, attraverso progetti collaborativi, ha reso disponibile il database delle frequenze italiane per la maggior parte dei loci in uso compresi nei kit commerciali più

diffusi. Nel caso in cui la popolazione di interesse sia quella italiana, l'uso del database del GeFI non necessita quindi di apposita motivazione; l'uso di database diversi dovrà, invece, essere esplicitato. Nel caso in cui la persona di interesse appartenga ad una popolazione ben definita e diversa dalla popolazione italiana, si raccomanda l'uso di un database di frequenze alleliche specifico di quella popolazione, che sia pubblicato su riviste soggette a peer-review.

- **Il parametro detto FST o Θ (teta).** La variazione delle frequenze alleliche fra popolazioni locali dà luogo al fenomeno cosiddetto della stratificazione, o sottostrutturazione, della popolazione totale. Esso causa un aumento della frequenza di soggetti omozigoti in confronto a quella attesa sulla base della legge di Hardy-Weinberg, ed è misurato da un singolo parametro, che varia fra zero (nessuna stratificazione) e 1 (valore in pratica mai realizzato). Nel caso generale in cui la popolazione di riferimento sia quella italiana, è raccomandato l'uso nel calcolo statistico di valori di FST pari a 0 o 0,01 (1%); la scelta di valori maggiori dovrà essere giustificata. Nel caso la persona di interesse appartenga ad una popolazione ben definita e diversa dalla popolazione italiana, in mancanza di data base di frequenze alleliche specifiche, si potranno usare frequenze alleliche mediate su scala continentale o sub-continentale; in questo caso tuttavia, è raccomandato l'uso nel calcolo probabilistico di valori di FST pari a 0.03 (3%) fino ad un massimo dello 0.05 (5%), e la scelta dovrà essere esplicitata.

- **Le probabilità di drop in e drop out.** In campioni (reperiti) con DNA degradato si può verificare la mancata amplificazione di alleli effettivamente presenti sul reperto (drop out) o l'amplificazione di alleli non presenti (drop in).

Le probabilità di tali eventi possono essere incluse nel calcolo statistico, anche separatamente per ciascun locus. Non è ragionevole considerare più di uno-due eventi di drop in per singolo profilo, ipotizzando una probabilità di drop in del 5%, a meno di casi particolari che devono essere adeguatamente giustificati.

I valori di probabilità di drop out vanno determinati empiricamente in base ai criteri definiti nel metodo di prova e/o nelle procedure interne e/o a simulazioni matematiche.

4.4 Metodi di calcolo: principali indici di valutazione probabilistica

1. **Rapporto di verosimiglianza (Likelihood Ratio, LR).** L'LR è il metodo raccomandato per la valutazione dell'evidenza in genetica forense. In accordo alla letteratura scientifica internazionale, ai valori di LR calcolati vengono associati predicati verbali che ne esprimono il significato in termini discorsivi, attraverso modulazioni sempre più stringenti della significatività del supporto che i dati offrono all'ipotesi dell'accusa o della difesa. Il riferimento è la tabella presente nel documento ENFSI.

E' possibile, in aggiunta al calcolo dell'LR, utilizzare ulteriori approcci statistici quali:

2. **La probabilità combinata di esclusione (Combined Probability of Exclusion, CPE)** o di inclusione (Combined Probability of Inclusion, CPI) o il calcolo del Random Man Not Excluded, RMNE [10,11]. Tali approcci forniscono una stima della frazione di una popolazione di riferimento che non può essere esclusa come contributore della mistura genetica.

3. **La Probabilità di condivisione casuale (Random Match Probability, RMP).** Tale calcolo può essere impiegato sia su profili genetici a singolo contributore che su profili genetici misti in cui sia possibile individuare chiaramente un contributore rispetto agli altri (la RMP si calcola sul profilo genetico a singolo contributore individuato).

4.5 Software di calcolo

L'ISFG mette a disposizione per le analisi di statistica forense software "open source" ed "user friendly" (<http://www.isfg.org/Software>), fra cui programmi cosiddetti semicontinui, che includono le probabilità di drop in e drop out, ampiamente validati a livello internazionale. L'applicazione di

modelli semicontinui è pertanto raccomandata ed è applicabile anche ai casi che non presentano fenomeni stocastici.

E' consentito anche l'impiego di programmi basati su modelli cosiddetti continui, che includono nel calcolo anche l'altezza o l'area dei picchi così come gli effetti della degradazione e dei picchi stutter, previa loro validazione attraverso studi collaborativi internazionali.

Indipendentemente dal programma di calcolo utilizzato, deve sempre emergere nell'analisi dei dati il percorso logico seguito dall'analista per raggiungere le sue conclusioni. Non è accettabile presentare esclusivamente il risultato finale ottenuto da un software senza una adeguata discussione delle scelte operate.

Nel caso di valutazione di tracce per le quali sono state condotte repliche di amplificazione (consolidamento) a motivo della presenza di fenomeni stocastici, si raccomanda di valutare tutte le repliche e di includere nel calcolo statistico effettuato dal software tutte le ripetizioni contestualmente ovvero il profilo *consensus* o quello *compositus* ricavato dalle repliche stesse.

Una conclusione di compatibilità non suffragata da un calcolo statistico non è utilizzabile ai fini dell'identificazione di un soggetto di interesse.

Il laboratorio deve comunque documentare le proprie procedure interpretative dei profili genetici misti.

Bibliografia

Bright J.A., Gill P., Buckleton J., Composite profiles in DNA analysis, *Forensic Sci Int Genet.* 6(2012) 317-321.

Caragine T., Mikulasovich R., Tamariz J., Bajda E., Sebestyen J., Baum H., Prinz M., Validation of testing and interpretation protocols for low template DNA samples using AmpFISTR Identifier, *Croat. Med. J.*, 50 (2009), pp. 250–267

Coble MD, Buckleton J, Butler JM, Egeland T, Fimmers R, Gill P, Gusmão L, Guttman B, Krawczak M, Morling N, Parson W, Pinto N, Schneider PM, Sherry ST, Willuweit S, Prinz M. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Recommendations on the validation of software programs performing biostatistical calculations for forensic genetics applications, *Forensic Sci Int Genet.* 25 (2016):191-197.

DNA Advisory Board. Statistical and population genetics issues affecting the evaluation of the frequency of occurrence of DNA profiles calculated from pertinent population database(s). *Forensic Science Communications*; 2(2000)1–8.

Gill P., Whitaker J., Flaxman C., Brown N., Buckleton J., An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, *Forensic Science International*: 112 (2000), pp. 17–40.

Gill P., Brenner C.H., Buckleton J.S., Carracedo A., Krawczak M., Mayr W.R., Morling N., Prinz M., Schneider P.M., Weir B.S., DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures, *Forensic Sci. Int.* 160 (2006) 90–101.

Gill P, Haned H, Bleka O, Hansson O, Dørum G, Egeland T. Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures and database matches-Twenty years of research and development. *Forensic Sci Int Genet.* (2015) 18:100-117 Ladd C, Lee HC, Yang N, Bieber FR. Interpretation of complex forensic DNA mixtures. *Croat Med J.* 42 (2001):244–246

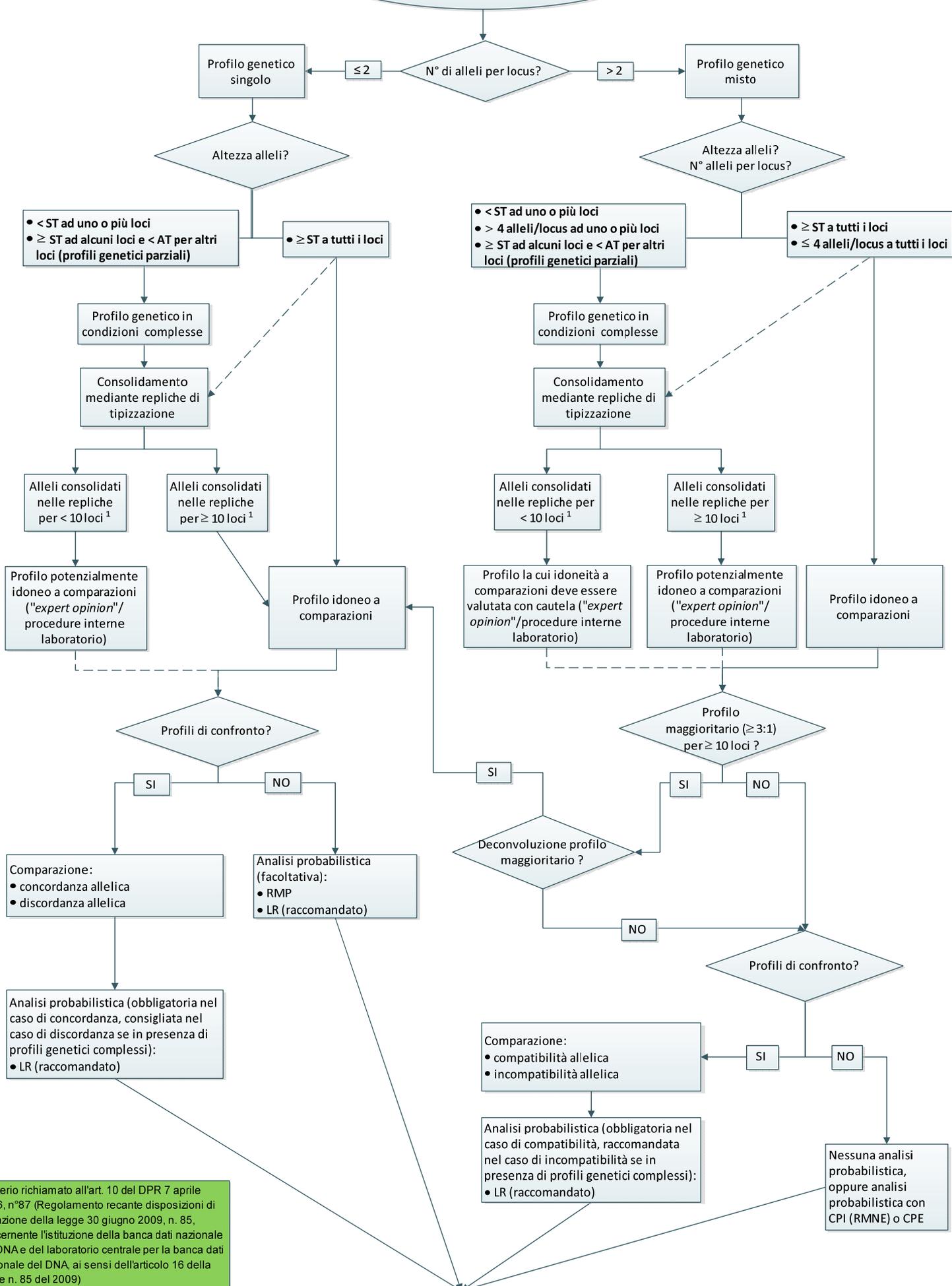
Gill P., Gusmao L., Haned H., Mayr W.R., Morling N., Parson W., Prieto L., Prinz M., Schneider H., Schneider P.M., Weir B.S., DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods, *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 679–688.

Norgaard A. & Rasmusson B. The likelihood ratio as value of evidence-more than question of numbers. *Law Probab Risk* (11 2012), 303-315. Association of Forensic Service Providers (AFSP), Standards for the formulation of evaluative forensic science expert opinion, *Science & Justice* (2009), 161-164.

ENFSI guideline for evaluative reporting in forensic science (2015) http://enfsi.eu/sites/default/files/documents/external_publications/m1_guideline.pdf

SWGDM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories (Federal Bureau of Investigation, USA, 2017, https://docs.wixstatic.com/ugd/4344b0_50e2749756a242528e6285a5bb478f4c.pdf

VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEL PROFILO GENETICO, COMPARAZIONE E ANALISI PROBABILISTICA DEL PESO DELL'EVIDENZA



¹ Criterio richiamato all'art. 10 del DPR 7 aprile 2016, n°87 (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)

→ Protocollo raccomandato
 - - - - - Protocollo facoltativo/opzionale
 AT = analytical threshold (soglia analitica)
 ST = stochastic threshold (soglia stocastica)

REFERTO
Profilo genetico idoneo a comparazioni e valutazione probabilistica del peso dell'evidenza (se prevista)