

**GRUPPO DEGLI EMATOLOGI FORENSI ITALIANI (GEFI)  
SOCIETA' ITALIANA DI GENETICA UMANA (SIGU)**

*A cura di*

*Vincenzo L. Pascali (GEFI)*

*Giuseppe Novelli, Pierfranco Pignatti (SIGU)*

**RACCOMANDAZIONE SULLE INDAGINI BIOLOGICHE DI PATERNITA'  
E LE INDAGINI D'IDENTIFICAZIONE CRIMINALE**

*1. Premessa*

**Il Gruppo Ematologi Forensi Italiani**

Questa raccomandazione è redatta dal gruppo degli ematologi forensi italiani (G.E.F.I). Il GEFI è l'associazione di ricercatori ed esperti che operano nel settore dell'identificazione genetica forense. Nato nel 1966, per iniziativa di ricercatori prevalentemente provenienti dall'area medico legale, esso è il gruppo di lavoro di lingua italiana dell' International Society of Forensic Genetics (ISFG).

Per origine e legami culturali, il GEFI riconosce oggi come propri referenti scientifici: la Società Italiana di Medicina Legale  
la Società Italiana di Genetica Umana  
ed è aperto al contributo di ricercatori e specialisti di altre aree affini. Per tradizione e perdurante interesse, ha un significativo ruolo il legame tra il GEFI e l'area della trasfusione del sangue e dell'immunoematologia (rappresentate dalle società SIT e AICT).

Il GEFI è il naturale punto di sintesi delle esperienze di ricerca l'organo di accreditamento per l'attività casistica nel settore dell'identificazione forense. Esso è dunque la casa comune di chiunque abbia interesse scientifico e professionale in questo settore. La sua ideale base di aderenti è oggi costituita da ricercatori ed esperti provenienti dalle aree della medicina legale, della genetica umana e della genetica molecolare, dell'ematologia.

Il comitato direttivo del GEFI è impegnato a promuovere rapporti di cooperazione scientifica con tutte le Società e le comunità scientifiche delle discipline di riferimento.

**La comunità dei genetisti forensi**

Il vasto panorama delle indagini di genetica forense e i temi scientifici ad essi sottesi sono oggi oggetto di studio da parte di una vasta comunità scientifica internazionale. La speciale connotazione della disciplina giustifica pienamente l'esistenza di laboratori interamente dedicati alla ricerca e alle applicazioni casistiche di questo settore. Il processo di autonoma strutturazione dei laboratori forensi è da anni una realtà in molti paesi europei e negli Stati Uniti ed è oggi chiaramente in atto anche in

Italia. A tale processo partecipano enti pubblici (Istituti di medicina legale, laboratori di polizia scientifica ed altri) e laboratori privati. Centri e laboratori di genetica forense si sono sviluppati in completa autonomia rispetto alla fondamentali discipline biologiche e mediche di riferimento (medicina legale, genetica, biologia molecolare). Alcuni di essi mantengono organiche forme di collaborazione con organismi e gruppi di lavoro internazionali e cooperano con questi nel sorvegliare l'evoluzione scientifica e tecnologica del settore e garantire la validità dei risultati.

### **Le raccomandazioni del GEFI e della SIGU**

La genetica forense è in fase di costante evoluzione, influenzata dai seguenti fattori:

- a. l'introduzione di nuove tecniche e nuove classi di variabilità genetica.
- b. l'innovazione nelle leggi e nelle procedure penali e civili.

Questo processo innovativo impone l'adozione di linee guida e la loro revisione periodica. Le linee guida hanno valore di generale indirizzo e devono facilitare la creazione di un consenso su un nucleo di metodi e loci genetici adeguato ai compiti analitici che il settore richiede.

Le raccomandazioni del GEFI rispondono a tale esigenza e sono dedicate a generali o specifici aspetti dell'identificazione dell'uomo attraverso il suo genoma.

Questo documento è nella linea ideale di altre risoluzioni pubblicate dal GEFI e dalla SIGU, le integra e ne sostituisce quanto non più attuale.

### **A chi è indirizzata questa raccomandazione**

Il GEFI e la SIGU ritengono uno dei rischi maggiori di errore o di insufficienza delle indagini - che può vanificarle - risiede nel frequente operare, nel settore della genetica forense, di periti privi di competenza e di requisiti minimi di esperienza. La mancanza, in Italia, di una normativa che imponga l'accreditamento di laboratori e di operatori, espone giudici, pubblici ministeri e cittadini al corrente rischio di incorrere in "pseudoesperti" e in indagini insufficienti, lacunose e prive di minimi requisiti di validità. Il problema è inoltre acuito dalla mancanza di diffusione delle informazioni sull'argomento.

Per contribuire a risolvere questo problema, il GEFI e la SIGU si sono impegnate in una campagna di informazione scientifica e di divulgazione presso il pubblico.

Questo documento si propone di contribuire ad informare sulle correnti possibilità d'indagine nell'accertamento di rapporti parentali e nell'identificazione criminale. Esso contiene un'illustrazione di metodi biologici e di principi statistici, di requisiti tecnici e di modelli d'interpretazione delle analisi. Come implicato dal titolo, il documento ha anche l'esplicito scopo di raccomandare l'uso delle procedure che vi si descrivono.

Questa raccomandazione è rivolta agli operatori del settore e a tutti coloro che intendono di assumere l'onere e la responsabilità di eseguire indagini biologiche per l'accertamento del rapporto parentale ed indagini genetiche di identificazione criminale a fini di giustizia penale.

La R. è inoltre indirizzata ai committenti e utilizzatori delle indagini: giudici penali e civili, pubblici ministeri, avvocati.

Infine essa è anche rivolta al pubblico, che ha il diritto di essere informato sulle correnti tematiche e possibilità offerte dalla genetica impiegata a fini forensi.

## *2. Le indagini genetiche a fini forensi*

### *2.1 Identificazione di rapporti parentali*

Nella ricerca biologica di paternità e maternità oggi è possibile non solo escludere il rapporto parentale ma anche fornire prove positive di paternità, maternità e altre relazioni di parentela. Le prove genetiche sono effettuabili su qualsiasi campione biologico costituito da cellule con nucleo (elettivamente su prelievi di sangue e di saliva) provenienti dal figlio e dai presunti genitori (oppure da probandi tra i quali si ipotizzi una relazione parentale e se ne desideri perseguire l'asseverazione con prove genetiche).

Le prove di laboratorio utilizzano marcatori genetici dotati di alto grado di variabilità ed altamente affidabili.

Il panorama dei sistemi genetici oggi utilizzabili è assai vario e comprende marcatori utilizzati in epoca precedente all'utilizzo del DNA ricombinante (gruppi sanguigni, sistema maggiore di istocompatibilità - HLA), polimorfismi del DNA nucleare diploide e aploide, e siti variabili del DNA mitocondriale.

In questa materia è necessario indicare linee di orientamento che consentano l'uso di un comune gruppo di sistemi da parte dei laboratori.

Le indagini effettuate sul DNA nucleare autosomico oggi elettivamente disponibili per indagini parentali comprendono polimorfismi minisatelliti, polimorfismi microsattelliti (Short Tandem Repeats, STRs) e polimorfismi di sequenza (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Gli STRs hanno tuttavia oggi (per diffusione, numero di loci, contenuto polimorfo, quantità di inerente informazione già disponibile, facilità di esecuzione e standardizzazione di metodologie d'analisi e - non ultimo - disponibilità di kits commerciali per le tipizzazioni) un ruolo predominante nel settore. Stante la disponibilità e la facile accessibilità di tali marcatori, non vi è particolare ragione per utilizzare altre fonti di variabilità in "casi ordinari". E' demandato ovviamente a ciascun esperto di utilizzare altri sistemi con i quali ha buona pratica di laboratorio e di conoscenza scientifica (ad esempio il sistema HLA, ovvero ulteriori marcatori molecolari ulteriori rispetto a quelli di base), in circostanze del tutto speciali. Pur rinunciando ad indicare una lista di sistemi canonici, il GEFI e la SIGU sono pienamente consapevoli dell'esistenza di marcatori disponibili in gruppi di co-amplificazione mediante la *polymerase chain reaction* (cioè determinabili insieme nello stesso esperimento) e del fatto che alcuni gruppi di co-amplificazione sono disponibili commercialmente. Ciò costituisce un'ovvia base per la costituzione di protocolli convenienti e largamente condivisibili. Pur non esprimendo alcuna preferenza nei confronti dei vari protocollo tecnici disponibili, il GEFI e la SIGU invitano all'uso di quei marcatori di più larga diffusione, che abbiano spiccate caratteristiche di riproducibilità e verifica.

Si pone peraltro l'accento sulle seguenti ed irrinunciabili condizioni:

- a. ogni laboratorio deve costituire le proprie analisi su un protocollo tendenzialmente stabile, il cui contenuto polimorfo sia adeguato: ciò è funzione sia del numero di loci genetici che della somma del contenuto di polimorfismo di ognuno; la polidispersione dell'informazione genetica su più loci è preferibile alla sua concentrazione su pochi polimorfismi. Si ritiene che l'utilizzo di dodici-quindici microsatelliti (ciascuno dotato di eterozigotità equivalente a circa 0.70-0.90) possono garantire la soluzione di un tipico caso di discussa paternità.
- b. tutti i laboratori devono disporre una base di marcatori genetici aggiuntivi al protocollo standard, ai quali si possa far ricorso in casi dubbi.

Quanto ai metodi, la tipizzazione di STRs si basa sull'amplificazione selettiva di copie del marcatore genetico mediante la tecnica PCR (polymerase chain reaction) e l'analisi di differenze in lunghezza dei frammenti che ne sono generati. L'analisi si svolge con metodi manuali e con metodi semiautomatici strumentali. Tali metodi sono da considerarsi in principio equivalenti, a condizione che siano rispettati i più comuni parametri di "good practice" (suo di standards allelici e di peso molecolare, controllo della risoluzione, controlli positivi e negativi, ecc.).

In casi particolari cioè in assenza della madre, ovvero del padre, nel caso di soggetti deceduti, indagini sono comunque possibili: analisi su consanguinei (ascendenti o discendenti), analisi su reperti d'autopsia previa esumazione del cadavere, indagini sul cromosoma Y in caso di discendenza maschile. Particolare rilievo assume in molti di questi casi l'analisi statistica, che deve essere intrapresa da personale competente nella valutazione probabilistica dei caratteri ereditati lungo le linee parentali disponibili.

Tutte le prove di accertamento parentale (si tratti di casi tipici oppure difettivi) devono concludersi con la valutazione probabilistica delle prove di compatibilità ovvero l'enunciazione chiara delle incompatibilità.

L'uso di concetti, calcoli, notazioni probabilistici risponde a precise esigenze scientifiche e a norme di buona pratica. In nessun modo tale uso può essere considerato come limitativo o sminuire il valore delle procedure di identificazione genetica. Il potere di queste è anzi straordinario e la formulazione di un giudizio basato sulle sole prove genetiche ne valorizza l'efficacia.

Particolare attenzione deve essere riposta nella distinzione tra l'esito della prova e la decisione in ordine all'esistenza della realtà biologica che l'analisi intende provare. Quest'ultima si realizza complessivamente nel giudizio del magistrato (o del fruitore dell'analisi, in caso di accertamento commissionato da privati) e può integrarsi con prove di qualsiasi altro genere. Tuttavia, per il suo carattere di obiettività ed il suo potere "evidenziario", la prova biologica deve essere presentata in termini di prova irrinunciabile e primaria.

L'espressione probabilistica del convincimento sulla realtà biologica è un fondamentale punto di raccordo con le altre eventuali prove a disposizione del magistrato o di chiunque abbia titolo per assumere decisioni.

E' opinione corrente – anche tra esperti della materia – che l'incompatibilità sia certa, che essa si sottragga al giudizio probabilistico e che sia generalmente esprimibile con affermazioni perentorie di non paternità o non parentela. E' sempre più evidente tuttavia che questa assunzione è drastica e non tiene in considerazione alcuni oggettivi elementi che integrano il giudizio sulle prove. Tra questi:

- a. l'esistenza di mutazioni nella linea germinale del presunto padre, trasmesse al figlio (la distinzione formale tra mutazione e incompatibilità genetica è spesso difficile);
- b. l'occorrenza di errori che, sia pure sporadica e statisticamente improbabile, non può essere ignorata, specie quando siano dall'analista espresse convinzioni probabilistiche estremamente impegnative (ad esempio, sia riportato un altissimo calcolo di probabilità di paternità).

In linea di principio, tenendo conto di errori e mutazioni, anche l'ipotesi di non-paternità può essere descritta in termini probabilistici. La sua espressione in questi termini contribuirebbe anzi ad unificare sul piano formale l'espressione del giudizio in materia di discussa parentela. Non è tuttavia possibile ignorare che questo aspetto della genetica forense è in fase di elaborazione e che l'opinione comune privilegia l'espressione del giudizio in termini di 'certezza'.

A prescindere da questo problema, l'espressione della probabilità di paternità in termini numerici deve assumere la forma dei seguenti indici probabilistici:

LR (*likelihood ratio*, o rapporto di verosimiglianza) =  $X/Y$  (X, fattore di segregazione; Y, frequenza del carattere trasmesso). La LR è un numero intero, la cui grandezza esprime il favore con cui l'ipotesi di paternità gode rispetto a quella di non-paternità, o in altre parole la probabilità di individuare soggetti per caso compatibili con l'assetto genetico di provenienza paterna del figlio.

P (probabilità di paternità) =  $1/(1+(Y/X))$ . Questa formula è definita "probabilità di paternità", e consiste praticamente in una trasformazione algebrica della LR. Meglio espressa in decimali dell'unità (ad es: 0.9995) oppure (più criticabilmente) in percentuale (ad es: 99.95), essa esprime gli stessi concetti già enunciati per LR.

E' opinione comune che la paternità sia praticamente provata quando  $P > 0.9972$ . Questa convinzione ha radici storiche in quanto indicata da uno degli autori forensi che più hanno contribuito all'introduzione di criteri probabilistici nella valutazione delle prove di Paternità (Eric Essen-Moeller, 1938). Passata tale soglia, la paternità si considera 'praticamente provata' secondo un predicato verbale di impiego comune.

L'uso di soglie e predicati verbali è progressivamente obsoleto. E' raro che un protocollo di indagine del tipo di quelli appena delineati che illustri la compatibilità genetica tra un presunto padre e un figlio non oltrepassi di almeno due ordini di grandezza tale soglia. Pur nella consapevolezza della consuetudine all'uso di soglie e predicati verbali, il GEFI e la SIGU invitano tutti gli esperti e specialisti ad esprimere l'opinione probabilistica nella sua più autentica accezione, usando due notazioni ( P e LR ) e promuovendo la comprensione del loro significato presso magistrati ed operatori del diritto.

## ***2.2 L'analisi genetica di tracce a scopo di identificazione criminale***

Le indagini genetiche svolte oggi a fini di giustizia penale sono spesso legate a casi giudiziari spesso di grande importanza, connessi all'identificazione degli autori di gravi reati. Poiché in tutti questi casi vi sono delicati interessi (la libertà di eventuali imputati, le esigenze di giustizia delle parti offese ed altri), il relativo settore d'indagine è - se possibile - ancora più delicato di quello che concerne le indagini sulla filiazione.

Mentre è virtualmente impossibile lasciare irrisolto un caso di accertamento parentale, i rischi di errore o di insuccesso sono intrinseci all'analisi dei casi criminali. L'uso di tecnologie evolute e accurate precauzioni può ridurre drasticamente tali rischi ma non annullarlo. I rischi di errore o insuccesso sono legati all'esiguità e alla degradazione del materiale genetico e alla contaminazione ambientale dei reperti. Queste ragioni impongono che ad occuparsi del settore siano laboratori particolarmente esperti e rendono il settore inaccessibile all'operato di analisti occasionali. Le cause di errore e di insuccesso devono essere ben conosciute dall'esperto il quale deve analizzarne la possibile occorrenza nella relazione scritta, non mancando mai di evidenziare i possibili limiti della propria indagine.

Le analisi d'identificazione forense si applicano oggi a tracce di sangue, di sperma, di saliva e di urina, bulbi di formazioni pilifere, frammenti di organi e tessuti, in particolare denti ed ossa, preparati istologici e materiale da istoteca. Si segnala la possibilità che indagini sino compiute su fusti di capelli e su impronte digitali. Preliminare ad ogni indagine molecolare è lo sviluppo del reperto, per quanto possibile, alle preventive diagnosi generica e di specie di appartenenza del campione.

La scelta dei metodi di identificazione criminale e dei relativi polimorfismi è grandemente condizionata dalla natura e dalla quantità del campione. In dipendenza di varie circostanze, si possono utilizzare polimorfismi del DNA nucleare (autosomici e del cromosoma Y) e regioni variabili del DNA mitocondriale. I risultati possono essere prodotti con tecniche manuali ovvero strumentali. Per la scelta dei marcatori nucleari, si rimanda a quanto detto in precedenza per le indagini di paternità. Un accento speciale deve essere posto sulla necessità della coamplificazione, poiché questa procedura incide criticamente sull'efficacia del risultato finale.

Quanto al DNA mitocondriale, le regioni oggi universalmente utilizzate sono poste della regione di controllo, talvolta indicata come D-loop. La tecnica di analisi mitocondriale si basa sull'amplificazione di frammenti e sul loro sequenziamento mediante il metodo di F. Sanger (1977). E' opportuno talvolta effettuare anche lo studio degli aplotipi mitocondriali e riferirsi a questi come sistema di comparazione. Un tipico test di identificazione deve verificare la completa identità di caratteri tra la traccia contenuta dal reperto e l'individuo con cui essa si confronta. I criteri con cui si postula l'identità sono tipici di ciascuna tecnica e devono essere ben conosciuti.

Svolto il confronto analitico e verificata l'identità, l'operatore è chiamato ad utilizzare dati statistici che esprimano il valore probatorio dei caratteri identici. L'informazione statistica deve utilizzare i seguenti criteri:

1. rapporto di verosimiglianza dell'ipotesi di identità contro quella di associazione casuale, secondo la formula  $LR = 1/p$  ( $p$  = frequenza del carattere rinvenuto nei due termini del confronto secondo formule probabilistiche correnti). Più alto è il rapporto di verosimiglianza, maggiore è la forza con cui si asserisce l'identità. Tipicamente, un LR pari a 1000 indica che vi sono 1000 probabilità a favore dell'ipotesi che i due termini siano identici contro una che siano diversi.

2. probabilità di associazione casuale dei caratteri identici (corrispondente alla probabilità di rinvenire lo stesso genotipo in un individuo assunto a caso nella popolazione di riferimento). Questa corrisponde alla frequenza con cui il carattere che identifica è presente nella popolazione di riferimento.

In relazione ai parametri statistici, l'uso di percentuali (ad esempio, quelle della trasformazione algebrica della formula di Esse Moeller) o di qualsiasi altra notazione al di fuori dei parametri sopra indicati genera ambiguità e può indurre in errori interpretativi.

### ***2.3 Diffusione e validità di queste informazioni***

A causa dell'evoluzione delle conoscenze e della tecnologia nel settore, le Raccomandazioni e le informazioni (compresa la presente) del GEFI e della SIGU, hanno un valore limitato nel tempo e sono soggette ad aggiornamento. Ogni aspetto nuovo della tecnologia o dei polimorfismi deve essere criticamente considerata e sperimentato con modelli di simulazione e in casi reali selezionati. E' dunque logico attendersi un periodo di adeguata valutazione prima di introdurre nuovi profili. L'introduzione di nuovi profili deve rispondere a criteri di efficacia e di relativa convenienza.

La validazione dei metodi, e le correlative linee-guida debbono ricercare il consenso più ampio della comunità scientifica e non essere patrimonio di un singolo esperto o di gruppi di esperti quantunque accreditati di esperienza. Ogni novità in sede peritale deve essere segnalata per offrire la possibilità di contraddittorio critico sul metodo e non sui risultati. Ciò è particolarmente importante per il sistema giudiziario del nostro paese che non dispone di istanze preliminari di convalida dei metodi di scienza prestatati all'amministrazione della giustizia.

Le Raccomandazioni del GEFI e della SIGU, che recepiscono orientamenti scientifici sui quali vie ampio consenso internazionale, devono essere seguite da uno sforzo di educazione ed informazione, mediante materiale informativo a disposizione di *tutti* – *segnatamente dei* magistrati, degli avvocati, della comunità dei periti e delle parti.

Questa Raccomandazione sarà diffusa nelle riviste giuridiche, nelle riviste di Medicina Legale e di Genetica ed infine nei seguenti siti Internet:

Ministero di Grazia e Giustizia

Società Italiana di Medicina Legale

Società Italiana di Genetica Umana (SIGU)

Associazione di Genetica Italiana (AGI)

Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV)

Federazione Italiana Società Biologiche (FISBi)

Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIIBT)

A partire dal mese di Aprile 2000, il sito GEFI (<http://www.mclink.it/personal/MD1696/gefi/>) e il sito SIGU (<http://sigu.univr.it>) conterranno informazioni più dettagliate, anche di natura tecnica, rispetto a questo documento che ha lo scopo di fornire un quadro di insieme dei problemi attuali e delle prospettive future di questo importante settore dell'indagine biomedica.