

Genetica e laboratorio di medicina legale

19

Salvatore Procaccianti, Gregorio Seidita, Paolo Procaccianti*

*È ricercando l'impossibile che l'uomo ha sempre realizzato il possibile.
Coloro che si sono saggiamente limitati a ciò che appariva loro come possibile,
non hanno mai avanzato di un solo passo*
Michail Bakunin (Tver', 1814 – Berna, 1876)

OBIETTIVI DEL CAPITOLO

- Definire i criteri dell'identificazione genetica individuale
- Illustrare le procedure validate e di uso corrente
- Descrivere modalità e ambiti di intervento del personale tecnico
- Fornire una *Scheda sinottica* di consultazione rapida

La genetica forense è uno dei più importanti settori dell'identificazione individuale. Il progresso delle conoscenze scientifiche nel campo della biologia molecolare ne ha, negli ultimi decenni, determinato un rapido sviluppo.

All'origine di questo processo sono le ricerche sulla porzione ipervariabile del genoma, condotte da Sir Alec J. Jeffreys nell'università di Leicester a partire dal 1995.

Non occorre tuttavia dimenticare che l'identificazione personale umana non è solo basata sulle tecniche di biologia molecolare, ma si iscrive in un ampio contesto di campi, metodi e procedure.

Se ne illustrerà il panorama attuale.

METODOLOGIA OPERATIVA NELLE INDAGINI FORENSI

SOPRALLUOGO GIUDIZIARIO

Il sopralluogo giudiziario è quell'insieme di operazioni tecniche, generalmente svolte da personale specializzato, per mezzo delle quali sono studiati e analizzati gli scenari del crimine, in modo da fissarli il più precisamente possibile. È l'attività fondamentale, un momento unico che richiede professionalità e specializzazione. Durante il sopralluogo gli investigatori individuano quelle che possono essere le

*Si ringrazia, per la collaborazione nella revisione del capitolo, il Prof. Vincenzo Pascali.

fonti dirette di prova, ne determinano innanzitutto la sede, la posizione, l'aspetto, assegnano a ogni elemento un codice identificativo e li fissano per mezzo di rilievi tecnici. Molto spesso è proprio l'esatta esecuzione del sopralluogo che determina il successo o l'insuccesso di un'indagine. Le nuove norme difensive danno facoltà al difensore di assistere alle operazioni, anche con propri esperti (art. 391-*sexies* c.p.p.), che possono compiere attività investigativa autonoma.

ESAME DELLA LOCALITÀ

La località può essere un luogo aperto (strada pubblica, piazza, campagna, spiaggia), un ambiente chiuso (abitazione, roulotte) o un mezzo semovente (automobile, pullman, treno, aereo ecc.). La descrizione deve procedere con metodo analitico secondo l'ordine topografico, cominciando dal generale per finire al particolare, utilizzando anche piante topografiche, fotografie ecc.

Località aperta. Occorre rilevare le vie d'accesso, lo stato del terreno (solido, fangoso), le condizioni di visibilità, la temperatura e l'umidità ambientali (per la loro influenza sui fenomeni cadaverici), la presenza di siepi, mura o palizzate, l'esistenza di corsi o di pozzi d'acqua (dove si può trovare il cadavere o l'arma del delitto).

Ambienti chiusi. Vengono descritti gli accessi, le stanze adiacenti, le porte, le finestre, il tipo di riscaldamento (per stabilire eventuali intossicazioni da monossido di carbonio), lo stato dei pavimenti e delle pareti, gli oggetti presenti, l'ordine o il disordine, le varie tracce e in particolare quelle nei servizi igienici e nei lavandini.

Veicoli semoventi. Vengono esaminate la posizione delle vittime, le tracce lasciate dagli pneumatici in frenata, la perdita di olio o di carburante, i segni dovuti all'impatto dei veicoli contro paracarri, muri o alberi, i frammenti di cristallo, i resti di vernice, il disegno del battistrada, i frustoli di pelle e di grasso sottocutaneo, i ciuffi di peli e il sangue trovati sul veicolo.

Vanno sempre ricercati *segni di lotta*, che si possono desumere dal calpestamento del terreno, dagli arbusti spezzati, dal disordine degli ambienti; *segni di scasso* sulle porte e sulle finestre; *segni di trascinamento* del cadavere in base alle tracce sul terreno; *segni di gas tossici*; *segni di intossicazioni o avvelenamenti*; *segni di proiettili* su pareti, tronchi, foglie, reperti di bossoli e cartucce.

ESAME DELLE IMPRONTE

Le impronte sono tracce lasciate dall'uomo, dagli animali, dai veicoli e da oggetti vari nella località ispezionata. Si possono trovare sul cadavere o sui suoi vestiti, sul terreno, sul pavimento, sulle pareti, sui mobili, sulle porte ecc.

Le impronte si possono formare per compressione su materiali cedevoli, come la sabbia, il fango, la neve, lo sterco; per asportazione quando si toccano oggetti polverosi, verniciati di fresco o untuosi; per apposizione quando si imbrattano oggetti o superfici con le mani bagnate di sudore o sporche di sangue.

Impronte digitali. Si formano su qualsiasi oggetto per apposizione o asportazione. Per fotografare impronte poco visibili occorre esaltarle spalmando con un fine pennello una polvere chiara se il supporto è scuro (alluminio, cerussa), una polvere scura se il supporto è chiaro (grafite, ossido di rame) oppure scegliendo il colore della polvere che meglio contrasta con quello del substrato. Analogamente, le impronte delle mani possono rivelarsi utili studiandone sia i caratteri normali (diametri, pliche palmari, lunghezza e larghezza delle dita) sia quelli patologici (amputazioni di dita o di falangi, polidattilia ecc.).

Impronte dei piedi. Sia nudi sia calzati (orme), le tracce dei piedi permettono di risalire all'età e alla statura della persona, al suo modo di camminare o di correre, ad anomalie congenite o acquisite. Le impronte plantari possono essere studiate analogamente a quelle palmari: anche le calzature lasciano orme che possono essere confrontate. Le orme per compressione si rilevano facendone un calco con materiali adatti (gesso, cera, paraffina e gelatina).

Impronte dei denti. Si trovano sulla cute o sugli alimenti consistenti (pane, burro e frutta) e si rilevano mediante un calco, un disegno a ricalco o rilievi fotografici. Per l'identificazione occorre studiare l'impronta totale, le anomalie dentarie, le righe d'incisione lasciati dalle scanalature dei denti e i segni di protesi.

ESAME DELLE MACCHIE

Le macchie di sangue possono appartenere alla vittima o all'aggressore; le macchie di sperma possono indicare atti sessuali così come le macchie di vomito fanno sospettare un avvelenamento; le macchie di liquidi corrosivi possono indicare un suicidio con caustici; le macchie di unto, vernice, carbone, farina ecc. possono essere legate alla professione dei protagonisti; le macchie di polvere o di fango sul cadavere o sui suoi vestiti possono indicare un trascinarsi o un rotolamento. Macchie di altri liquidi organici (meconio, feci, urine, fluido vaginale, colostro, saliva, liquido amniotico ecc.) assumono importanza varia nei singoli casi. Le indagini di identificazione dipendono dalla quantità, tipo, stato, età della traccia. Il riscontro di macchie organiche può innescare una lunga serie di accertamenti che, in una sequenza a cascata, hanno come obiettivo ultimo l'identificazione del soggetto da cui proviene la sostanza. I limiti della ricerca e dell'accuratezza dell'indagine sono dati dalla quantità di materiale a disposizione, dallo stato di conservazione e per ultimo dal livello tecnologico del laboratorio.

FONTI DI PROVA

Nella Figura 19.1 si riporta la sequenza delle fasi per l'acquisizione delle fonti di prova.

REPERTAIONE

La repertazione è l'insieme delle operazioni mediante cui gli investigatori raccolgono, custodiscono e preservano tutto ciò che può avere attinenza al fatto.

Dal punto di vista dell'intervento vi dovrà essere un'equilibrata attività materiale di conservazione, considerando che non può essere repertato tutto. Le modalità di formazione dei reperti sono attentamente disciplinate dalla legge¹.

Nulla deve essere spostato, toccato, cancellato, modificato, prima che tutti gli accertamenti tecnico-scientifici siano stati eseguiti, salvo che non si tratti di soccorrere dei feriti o garantire la sicurezza del personale.

¹Regolamento per l'esecuzione del Codice di procedura penale, artt. 10 e 11 D.M. 30 settembre 1989, n. 334.

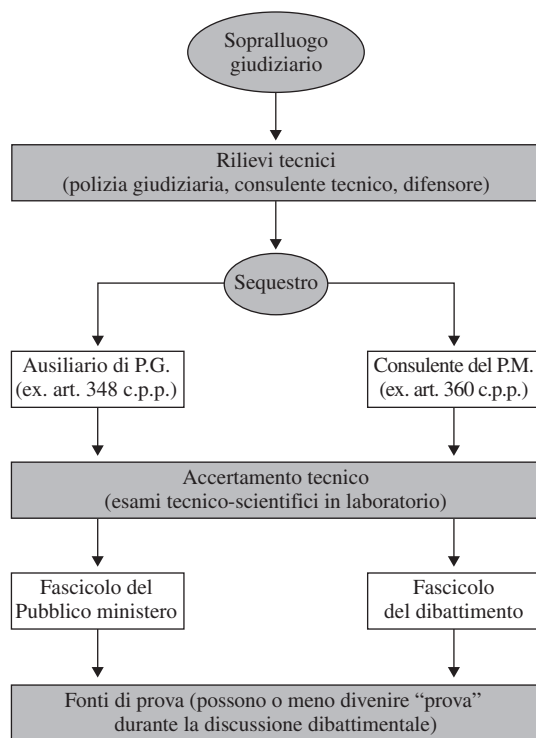


Figura 19.1 Sequenza delle fasi di acquisizione delle fonti di prova.

Nell'accedere ai luoghi occorre prestare particolare attenzione a non portarvi del fango, terra, polvere ecc., a muoversi con molta cautela, evitando di camminare su superfici che possano presentare tracce di passi utili. Munirsi possibilmente di guanti monouso, calzari monouso, mascherine protettive, tute speciali di protezione ecc. Particolare attenzione verrà dunque riservata alla classificazione e alla documentazione.

Corpo di reato

Con corpo di reato si intendono (art. 253 c.p.p., comma 2):

- le cose sulle quali o mediante le quali il reato è stato commesso (per esempio, rottura del vetro e martello);
- le cose che costituiscono il prodotto, il profitto o il prezzo del reato (è il caso della refurtiva).

Per garantire la disponibilità di un elemento di prova al procedimento, si attua il sequestro giudiziario (artt. 253 e seguenti; art. 354; art. 365 c.p.p.), atto attraverso il quale la Polizia giudiziaria sottrae all'avente diritto il bene assoggettato a custodia (cosa mobile o immobile) che rappresenta corpo di reato o cosa pertinente al reato.

Per quanto riguarda i campioni biologici, molto spesso può essere nominato un *custode giudiziale*, in genere il responsabile della struttura sanitaria.

Il campione biologico, oltre a essere soggetto a degradazione, è inquinabile per la possibilità di contaminazioni da parte di chi lo abbia manipolato prima e dopo la repertazione.

Di seguito si riporta la natura del materiale biologico utile ai fini dell'identificazione personale:

- sangue, in forma liquida o essiccata, che forma macchie o è presente su oggetti;
- saliva presente su bicchieri, mozziconi di sigaretta, gomme da masticare;
- sperma (su fazzoletti, preservativi, indumenti);
- formazioni pilifere (su pettini e spazzole, cappelli, passamontagna, indumenti);
- urina (anche macchie);
- feci;
- forfora;
- cellule epiteliali (su oggetti, guanti, armi del delitto).

Rilievo e accertamento²

L'investigatore compie un rilievo per potere poi procedere all'accertamento. Qualora vi sia un soggetto indagato vi è un limite invalicabile per la Polizia giudiziaria, che non può essere superato né per iniziativa né su delega, rappresentato dall'irripetibilità dell'accertamento tecnico.

La norma degli artt. 360 e 117 c.p.p. offre l'obbligatorietà dell'avviso al difensore, il quale può assistere, anche tramite i propri consulenti, al conferimento dell'incarico, partecipare agli esami e formulare osservazioni e riserve. In mancanza dell'avviso sussiste nullità procedurale³. Tale obbligo non ricorre, invece, qualora gli accertamenti siano di tipo ripetibile. D'altra parte, effettuare esami tecnici irripetibili, senza dare preventivo avviso alle parti, porta all'inutilizzabilità della prova nel dibattimento. Il consulente può essere chiamato a esprimere un proprio parere preliminare sull'effettiva possibilità di condurre un esame ripetibile su un certo materiale.

In mancanza d'indagati, il Pubblico ministero può autorizzare la Polizia giudiziaria al compimento anche di accertamenti unici quando vi sia il pericolo che il ritardo dell'esecuzione determini una distruzione degli stessi.

Nel Box 19.1 si riportano le modalità tecniche di repertazione.

LABORATORIO DI GENETICA FORENSE

Nell'indagine di laboratorio, dovranno essere introdotti metodi preliminari per compiere tutte quelle metodologie necessarie all'identificazione della natura del materiale repertato.

Dopo una fase ricognitiva, di natura ispettiva, il reperto dovrà essere descritto e identificato. Il reperto, una volta pervenuto al laboratorio, dovrà essere avviato lungo un percorso ideale, attraverso una serie di step successivi prima di poter essere utilizzato per le analisi vere e proprie (Figura 19.2).

²Prelievo (prelievi di tracce ematiche, asportazioni d'impronte digitali o di residui di polveri da sparo ecc.) e successiva analisi di laboratorio (profilo del DNA, comparazioni dei profili con il DNA ecc.).

³Cass. pen. Sez. IV, 06 dicembre 1996, n. 54.

BOX 19.1 MODALITÀ TECNICHE DI REPERTAZIONE

- In caso di tracce di sangue liquido, predisporre dei campionamenti su carta da filtro, da lasciare asciugare a temperatura ambiente e poi chiuderle in buste di carta sigillate.
- In caso di violenza carnale, prelevare diversi campionamenti (tamponi ≥ 3), lasciare asciugare a temperatura ambiente se si prevedono tempi lunghi prima della loro consegna in laboratorio.
- Effettuare diversi campionamenti sul luogo del sopralluogo anche se le tracce hanno un'origine comune.
- Non mescolare in uno stesso contenitore reperti provenienti da sedi diverse.
- Fare almeno un prelievo come controllo negativo dall'oggetto sul quale è presente una macchia.
- Qualsiasi campione umido deve essere fatto asciugare all'aria prima di essere conservato nei contenitori.
- Etichettare ogni reperto con la relativa documentazione fotografica del luogo e della sede esatta del prelievo.
- Conservare i campioni biologici in frigorifero a $+4^{\circ}\text{C}$ per tempi brevi o a -20°C se si prevedono tempi più lunghi prima delle analisi di laboratorio.
- Per assicurare un'alta percentuale di successo sulle determinazioni genetiche, è quindi necessario applicare con rigore le corrette tecniche di refertazione e conservazione.

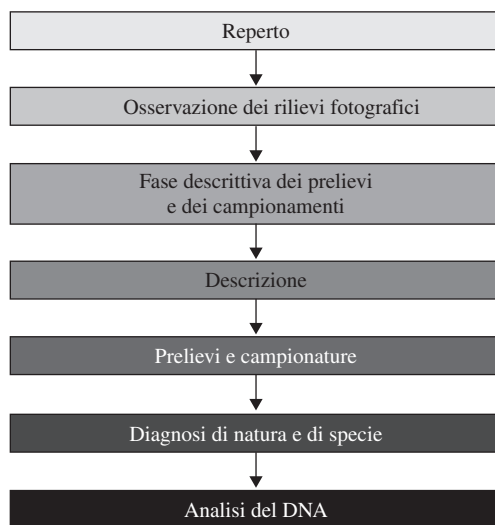


Figura 19.2 Laboratorio di genetica forense (sequenza di step successivi).

OSSERVAZIONE

È la fase preliminare nella quale si individua il tipo di accertamenti che è possibile eseguire sul reperto. Nella maggior parte dei casi, il reperto è consegnato in laboratorio in plichi sigillati, accompagnati da sommarie descrizioni.

Solo dopo l'apertura è possibile procedere alla vera e propria ispezione del materiale. All'osservazione dovrebbe essere dedicato tutto il tempo necessario affinché ogni particolare sia valutato con attenzione. Compito dell'esperto forense, in questa fase, dovrebbe essere quello di individuare tutte le probabili fonti di prova alle quali sarà possibile attingere dall'oggetto in sequestro e indicarle al magistrato per le valutazioni opportune.

CATALOGAZIONE

La corretta catalogazione di un reperto permetterà di individuarlo durante tutte le fasi analitiche. È opportuno identificare i reperti con un codice univoco. I laboratori che devono esaminare una notevole mole di reperti affidano il processo di identificazione dei campioni a sistemi automatici basati sulla generazione di codici a barre.

RILIEVI FOTOGRAFICI

La fotografia non sostituisce i rilievi descrittivi, ma li integra. Il reperto dovrebbe essere fotografato nella sua interezza e in ogni particolare. I rilievi fotografici sul reperto dovrebbero essere fatti, in ogni caso, prima che esso sia sottoposto alle fasi dei prelievi. In seguito dovrebbero essere eseguite nuove riprese, che mostrino il tipo di campionatura, la sede del prelievo e il prelievo stesso prima che sia conservato.

PRELIEVI

Costituiscono l'acquisizione di un campione biologico di riferimento da un soggetto vivente o defunto o dalla *scena criminis*. Il prelievo di sostanza ematica rappresenta il materiale d'interesse biologico più comune, può essere conservato per lungo tempo a temperatura controllata. Esso può essere raccolto in provette munite di un anticoagulante (acido etilendiamminotetraacetico, EDTA), conservato in frigorifero a +4 °C per 3-5 giorni, oppure conservato a -20 °C per un tempo maggiore. Il prelievo di saliva va conservato a -20 °C fino al momento dell'analisi.

Dal cadavere possono essere ottenuti diversi tipi di materiali idonei alla determinazione del profilo genetico, in funzione dell'epoca della morte e/o dello stato di conservazione. Talvolta le procedure di prelievo comportano la preliminare reidratazione della traccia.

CAMPIONATURE

Durante la fase di campionamento ogni reperto dovrebbe essere trattato e conservato in modo tale da evitare eventuali contaminazioni da altro materiale biologico. Molto spesso abbiamo campioni costituiti da frammenti cellulari di tipo omogeneo, dove sono uniti materiali della stessa natura (sangue-sangue, saliva-saliva), o di tipo eterogeneo, dove diversi tessuti sono mescolati (capelli imbrattati di sangue, tracce di saliva mescolate con liquido seminale).

Nel caso di colature o macchie ampie di sostanza ematica sarà importante fare più repertazioni, descrivendone le sedi, poiché potrebbe trattarsi di una traccia non omogenea.

DIAGNOSI DI GENERE

Le metodiche per la diagnosi generica delle tracce ematiche tendono a svelare la presenza dell'emoglobina e dei suoi derivati. Le prove per la diagnosi di orientamento sono numerose (test alla benzidina, test alla fenoltaleina, test alla tetrametilbenzidina, test microcristallografici ecc.).

Oggi i metodi immunologici molto specifici costituiscono i mezzi più largamente applicati. L'emoglobina presente nei campioni reagisce con anticorpi monoclonali anti-emoglobina, l'immunocomplesso viene rilevato o con tecniche precipitanti o con tecniche cromatografiche; sono disponibili numerosi kit commerciali.

Tracce latenti

Per *traccia biologica latente* si intende una traccia non esplicitamente visibile a occhio nudo e per questo motivo difficilmente individuabile dall'operatore. Classico esempio è un qualsiasi tessuto (come può essere la tappezzeria di un autoveicolo) che sia stato lavato.

Il *test del luminol* rappresenta un ausilio, a disposizione del tecnico del sopralluogo, indispensabile per la valida determinazione della natura ematica di una traccia biologica latente. Spruzzando l'ambiente con il luminol (5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione), le eventuali tracce di sangue danno una caratteristica fluorescenza azzurra (si veda l'approfondimento sul sito).

Il test del luminol, tuttavia, produce molti falsi positivi a causa della possibile reazione di ossidoriduzione con alcuni oggetti metallici (nikel, rame ecc.), perossidasi vegetali (banane, angurie, agrumi ecc.) e, pertanto, il risultato deve essere sempre confrontato con altri esami di laboratorio.

DIAGNOSI DI SPECIE

La diagnosi di specie è indirizzata a stabilire la specie cui appartengono le tracce di sangue.

I metodi immunologici, oggi largamente impiegati, sfruttano la combinazione di anticorpi monoclonali e policlonali per l'identificazione specifica dell'emoglobina umana, con una sensibilità di circa 0,2 ng/mL. Il campione, estratto con una soluzione tampone, migra per capillarità su una membrana reattiva: l'emoglobina umana eventualmente presente si lega con l'anticorpo monoclonale, coniugato con un particolare colorante, formando così il relativo complesso antigene-anticorpo.



Attenzione! A prescindere dalle indagini d'identificazione generica, specifica e individuale, le tracce ematiche (macchie di sangue) devono essere descritte e studiate nella loro forma e nella loro distribuzione nell'ambiente ai fini della ricostruzione della dinamica del fatto. Così, gli spruzzi a distanza con piccole gocce a punto esclamativo nella lesione di grossi vasi arteriosi, le gocce ovalari se cadute da un corpo in movimento, le gocce rotonde con margini sfrangiati se cadute da oltre un metro, le pozze su terreni impermeabili, magari a delimitare una parte del corpo (gore), indicano che l'emorragia e la morte sono avvenute *in loco*. È frequente anche l'imbrattamento dell'aggressore o delle sue scarpe e si possono seguire i suoi movimenti per alcuni tratti.

DIAGNOSI GENERICA DI LIQUIDO SEMINALE

Tracce di liquido sono spesso repertate sulla scena di crimini a sfondo sessuale. Si possono rinvenire sulla cute della vittima, fra i peli del pube, nella biancheria o sul pavimento. In vagina si conserva per molte ore ed è stato rinvenuto anche in corpi riesumati andati incontro a mummificazione. È importante far notare che queste tracce non contengono necessariamente spermatozoi: è il caso di soggetti azospermici o vasectomizzati.

Le secrezioni vaginali, orali o rettali possono essere ottenute con l'aspirazione diretta o con lavaggio con fisiologica.

La diagnosi generica di sperma può essere condotta con varie tecniche, tra cui: metodi fisici, metodi chimici, metodi immunologici (si veda l'approfondimento sul sito).

FORMAZIONI PILIFERE

I peli sono molto resistenti alla degradazione e si possono trovare sul luogo del delitto. È frequente il loro trasferimento da persona a persona e/o a oggetti.

Il pelo osservato al microscopio appare costituito da più strati: la cuticola, la corticale e la midollare.

Il colore dei peli è legato ai granuli di pigmento (melanina) che si trovano principalmente nella corticale e dalla presenza di bolle di aria nella midollare. I granuli di melanina sono formati nel follicolo dai melanociti. Quando il follicolo è vicino alla fine del suo ciclo di crescita, la produzione di melanina e la formazione della midollare cessano improvvisamente. L'ultimo segmento del pelo è pertanto privo di colore e di midollare.

I follicoli dei peli dei mammiferi hanno tre distinte fasi di crescita, denominate:

- *anagen* (il follicolo produce il pelo in maniera attiva);
- *catagen* (è la fase di transizione tra anagen e telogen);
- *telogen* (il follicolo è quiescente)⁴.

In un soggetto sano l'80-90% dei follicoli è in fase *anagen*, il 2% in *catagen*, il 10-18% in *telogen*. La diagnosi generica si basa sull'osservazione al microscopio ottico della caratteristica struttura a strati del reperto pilifero. La midollare umana è amorfa e il rapporto tra il diametro del canale midollare e il diametro totale del fusto, detto *indice midollare*, nella specie umana deve essere inferiore a 0,3. La midollare degli animali è invece sempre estremamente ampia e in alcuni casi riempie quasi completamente il fusto presentando a volte caratteristiche peculiari.

RICERCA DI SALIVA

La ricerca della saliva in un reperto è generalmente limitata ai casi di rinvenimento di saliva dai lembi di una busta, dai francobolli, da bottiglie di vetro, lattine, tamponi, coperchi di plastica e altri reperti forensi prima che siano processati per l'analisi del DNA.

Il metodo più usato per l'identificazione della saliva è la determinazione dell' α -amilasi, mediante metodi qualitativi e quantitativi (si veda sul sito).

Una volta posta diagnosi di saliva, si può procedere all'estrazione del DNA contenuto nelle cellule di sfaldamento della mucosa orale, e alla successiva diagnosi individuale.

ALTRI LIQUIDI BIOLOGICI

In alcune rare occasioni può essere richiesta la diagnosi generica di altri liquidi biologici, quali l'urina, il sudore e le lacrime, che peraltro presentano una composizione tra loro simile. I metodi diagnostici si basano sulla ricerca della creatinina, di sali, di urea o di un'albumina lacrimale.

⁴I melanociti nel follicolo si contraggono e cessano di produrre e distribuire il pigmento; la base del pelo comincia ad assumere un aspetto rotondeggiante e il fusto sovrastante è composto unicamente da cellule corticali non pigmentate.

GENETICA FORENSE

L'attività di genetica forense dovrebbe limitarsi all'analisi di laboratorio, possibilmente con nessuna conoscenza dell'episodio criminoso da parte dell'analista.

La genetica forense molecolare ha assunto il ruolo di vera e propria scienza forense diventando uno strumento indispensabile per la risoluzione di casi giudiziari.

L'analisi genetica ha inizialmente affiancato quella dattiloscopica nel campo dell'identificazione personale.

Il progredire della tecnologia ha reso possibile il passaggio dall'analisi fenotipica dei caratteri a quella delle caratteristiche genetiche. Nel tempo si è così passati dallo studio della diversità a livello biologico, in altre parole analisi dei gruppi sanguigni (come ABO, Rh, Duffy ecc.), degli antigeni leucocitari HLA, delle sieroproteine, enzimi ecc. all'analisi diretta delle regioni del DNA altamente variabili, dette *polimorfismi*.

L'evoluzione della genetica forense è stata portata avanti dallo studio delle variazioni genetiche umane, iniziato agli inizi del Novecento con la scoperta dei polimorfismi dei gruppi sanguigni ABO per merito di Karl Landsteiner. La scarsa informatività di questi sistemi (limitato numero di varianti in grado di discriminare gli individui) li ha resi utili soltanto per escludere la compatibilità biologica (prova di esclusione). Fino agli anni Ottanta sono stati usati metodi basati sulla ricerca dei polimorfismi immunologici ed elettroforetici delle proteine del siero e degli enzimi eritrocitari.

I sistemi più utilizzati in ambito forense sono stati:

- i polimorfismi degli antigeni eritrocitari dei sistemi ABO, MNSs, Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran, P ecc.;
- polimorfismi degli antigeni leucocitari del sistema HLA;
- polimorfismi degli antigeni delle proteine sieriche dei sistemi Gm (catena pesante IgG) e Km (catena leggera IgG);
- polimorfismi delle proteine sieriche dei sistemi Pi (α -1-antitripsina), Tf (transferrina), Hp (aptoglobina), Gc (componente gruppo-specifico) ecc.;
- polimorfismi degli enzimi eritrocitari dei sistemi AcPI (fosfatasi acida eritrocitaria), PGM1 (fosfoglucomutasi), AK (adenilatochinasi), ADA (adenosindeaminasi), 6-PGD (6-fosfogluconato-deidrogenasi), GPT (glutamico-piruvico transaminasi), EsD (esterasi D), GLO I (glossalasi I).

Alcuni marcatori, come il gruppo ABO, sono stati utilizzati fino ai primi anni Novanta insieme alle metodiche di indagine dei polimorfismi del DNA (RFLP, Southern blot su lastre radiografiche, VNTR).

I limiti di applicabilità di questi sistemi di analisi consistevano: nella tendenza alla degradazione, nella suscettibilità verso gli enzimi batterici, nella limitata informatività con ridotta variabilità e scarsa utilità nei casi di miscele di sostanze biologiche. Inoltre i metodi basati su questi sistemi non consentivano di analizzare microtracce, ma richiedevano grandi quantitativi di materiale biologico e procedure di laboratorio complesse oltre che laboriose.

POLIMORFISMI DEL DNA

La rivoluzione delle tecniche di identificazione umana si ebbe con la scoperta dei polimorfismi del DNA. I polimorfismi del DNA di interesse forense sono delle variazioni della sequenza del DNA che differiscono tra gli individui di una data popolazione.

Nel 1984 il genetista Alec Jeffreys, nel corso di studi sul gene della mioglobina (condotti nel Regno Unito), scoprì che alcune sequenze del DNA erano ripetute più volte *in tandem* (una sequenza ripetuta in successione all'altra). Il numero di tali ripetizioni poteva variare da individuo a individuo. Queste regioni ripetitive del DNA, diffusissime nel nostro genoma, che possono trovarsi sia in regioni codificanti sia non codificanti, furono denominate *STR* dall'acronimo inglese Short Tandem Repeats. Le prime analisi sulla variabilità (polimorfismi) di queste zone del DNA furono eseguite mediante la tecnica del Southern blot, che prevedeva ibridazione dei frammenti genomici con *sonde radioattive* e presero il nome di *DNA fingerprinting*. Il metodo originario, tuttavia, non poteva essere eseguito su esigue tracce biologiche poiché richiedeva rilevanti quantità di DNA, fatto che ne limitava l'applicabilità in campo forense. Inoltre, poiché le sequenze ripetitive del DNA studiate risultavano molto lunghe in termini di coppie di basi, le stesse erano facilmente suscettibili ad alterazione della mobilità elettroforetica dovuta principalmente alla degradazione del materiale genetico per cause esogene (quali gli agenti atmosferici, i batteri ma anche l'età della traccia).

Nel 1988 si iniziò a utilizzare l'innovativa tecnica della *PCR* (Polymerase Chain Reaction), che consente di effettuare le analisi genetiche anche su quantità molto piccole di sostanza biologica.

CENNI SUL GENOMA UMANO E SULLA TECNOLOGIA DEL DNA FINGERPRINTING (DNA PROFILING)

In quasi tutte le cellule umane (fatta eccezione per i globuli rossi e le cellule in fase di degenerazione) l'informazione genetica è contenuta nel DNA presente sia all'interno del nucleo cellulare (DNA nucleare) sia in quello di alcuni organelli citoplasmatici chiamati mitocondri (DNA mitocondriale). In entrambi i casi, il DNA è il depositario dell'informazione genetica e, pertanto, delle caratteristiche ereditarie. In ogni individuo la sua sequenza si mantiene pressoché immutata in tutte le cellule dell'organismo (tranne fenomeni di chimerismo o mosaicismo) e, pertanto, è tipico di un soggetto. Per questi motivi l'analisi del DNA è la tecnica elettiva per l'identificazione personale.

Il materiale genetico nucleare è suddiviso in 23 coppie di cromosomi (22 autosomi e 1 cromosoma sessuale) che ammonta complessivamente a una sequenza lineare di oltre tre miliardi di coppie di basi.

Il DNA mitocondriale, invece, è una piccola molecola di DNA circolare, grande 16.569 coppie di basi. È ereditato esclusivamente dalla madre e, per tale motivo, è identico in individui che condividono la stessa linea materna (per esempio, i fratelli di una famiglia).

Nel campo delle indagini biologiche forensi, in virtù del maggiore potere discriminativo e qualora lo stato di conservazione del materiale biologico da esaminare lo consenta, è privilegiata l'analisi del DNA nucleare.

Come già detto, ogni individuo, in virtù dell'1% di sequenze polimorfiche, possiede una propria identità molecolare che lo contraddistingue, alla stregua di un raffinato *documento di riconoscimento*. In realtà non è necessario analizzare tutte le sequenze polimorfiche di un individuo per avere uno strumento utile per l'identificazione personale. Basta analizzare una dozzina di *loci STR* per identificare un determinato individuo in maniera unica.

PROFILO GENETICO INDIVIDUALE

Le regioni polimorfiche che adesso, grazie alla PCR, vengono esaminate, sono denominate microsatelliti o STR. Si tratta di *loci* genetici molto variabili e caratterizzati dalla ripetizione periodica di una breve sequenza (ripetizione in tandem), la cui unità di base può essere costituita da 2, 3, 4, 5 o anche 6 nucleotidi.

L'analisi di un *locus* STR consiste nel determinare il numero di unità ripetute nelle corrispondenti posizioni dei due cromosomi omologhi. Il risultato delle indagini, estese a un congruo numero di *loci* genetici⁵, genera il cosiddetto *profilo genetico individuale* utile per la diagnosi di identità ed eventualmente di paternità/maternità. Più alto è il numero delle regioni esaminate, minore sarà la probabilità che detto profilo possa essere condiviso da altre persone (salvo eccezioni come nel caso di due gemelli omozigoti che condividono lo stesso patrimonio genetico).

Tale probabilità è stimata statisticamente facendo riferimento a banche dati specifiche in cui viene riportata, per ciascun *locus*, la frequenza di distribuzione di ogni allele in una data popolazione.

L'affinamento delle tecniche, l'estrema sensibilità dei protocolli di analisi e, dato importantissimo, la riproducibilità dei dati estrapolati dagli accertamenti, ha fatto sì che tale strumento investigativo soppiantasse del tutto le tradizionali indagini biologiche di laboratorio.

L'intero processo analitico, la cui conclusione conduce alla determinazione del *profilo genetico individuale*, si sviluppa, sostanzialmente, in tre fasi.

Estrazione del DNA nucleare. In questa fase, molto delicata, le membrane citoplasmatiche e nucleari sono rotte e il DNA è purificato dalle altre componenti cellulari.

Amplificazione genica – PCR. Il DNA purificato è sottoposto a reazione di amplificazione PCR in corrispondenza dei *loci* STR scelti. L'utilizzo di *primer* fluorescenti consente di “marcare” il DNA amplificato.

Tipizzazione elettroforetica. Le regioni del DNA amplificate (gli alleli) sono separate elettroforeticamente in analizzatori genetici con tecnologia capillare. Una telecamera CCD rileva il “passaggio” dei frammenti di DNA marcati. Un software dedicato e certificato assiste l'operatore nella determinazione del genotipo.

Per approfondire le fasi del processo analitico per la determinazione del profilo genetico individuale, si rimanda al sito.

CASI PARTICOLARI D'IDENTIFICAZIONE

Vi sono situazioni in cui la possibilità di risalire al profilo dell'individuo è complicata, come nella fattispecie di commistioni di sostanze biologiche appartenenti a più individui. Nel caso di violenza carnale, la commistione di sostanza biologica maschile e femminile (vittima) può essere superata in fase di tipizzazione del DNA, impiegando i sistemi Y-STR (polimorfismi del cromosoma Y), permettendo quindi di verificare se è presente la componente maschile, attraverso il *locus* dell'amelogenina.

Limiti oggettivi. Dal punto di vista biochimico la molecola del DNA subisce processi degradativi fin dai primi momenti della morte cellulare, quando le condizioni fisiologiche dell'organismo sono alterate. Il danneggiamento chimico-fisico deriva solamente in parte dalla datazione del campione, mentre il ruolo prevalente sarebbe svolto dalle condizioni ambientali alle quali il reperto biologico stesso è stato esposto. Per esempio, la luce solare, l'umidità e la tipologia del terreno rappresentano fattori che influenzano lo stato di conservazione dei reperti biologici. Ne deriva che anche un campione relativamente recente, conservato in maniera errata, può aver subito danneggiamenti tali da renderne l'analisi difficoltosa e/o prona a errori. Per esempio, una macchia di sangue reperita durante un sopralluogo di un crimine e custodita senza le dovute precauzioni, può degradarsi anche

⁵Inizialmente il progetto internazionale CODIS ne prevedeva tredici, oggi molti kit ne analizzano quindici-sedici.

dopo 24-48 ore, inducendo processi di degradazione e/o di proliferazione di microorganismi che rendono impossibile la determinazione del profilo genetico. Per contro, campioni derivanti da resti ossei possono consentire la ricostruzione di profili genetici anche a distanza di molti anni. Ecco allora che la riproducibilità del risultato di un'analisi deve essere ritenuta il parametro fondamentale sulla cui esattezza deve basarsi necessariamente un test del DNA. In alcuni casi, è possibile confermare un test attraverso l'esecuzione di un duplicato compiuto dallo stesso laboratorio; in altri casi, la necessità di una *second opinion*, a seguito di un test effettuato a distanza da un altro gruppo, è quanto mai necessaria.

Altro fattore limitante dei test del DNA è quello quantitativo. Se è vero che anche una singola cellula può essere caratterizzata, minore è la quantità di materiale di partenza, minore è la probabilità di successo nella riproducibilità del risultato. Per esempio, l'analisi di reperti che contengono un basso numero di cellule e che si riflettono in un basso contenuto di DNA (definito in condizioni di *low copy number*) richiede l'esecuzione di esami riproducibili, per consentire di stabilire correttamente un assetto genetico. In pratica, ottenere profili per molti marcatori in queste condizioni è piuttosto difficoltoso e comunque la possibilità di introdurre errori è alta.

Le *contaminazioni* sono poi un altro fattore limitante molto importante, che inficia i risultati delle analisi genetiche e si ripercuote sull'affidabilità dei risultati conseguiti a seguito di questi test. La presenza di DNA esogeno (derivante da batteri, funghi ecc.) è costante nell'esame di campioni vecchi e/o degradati, esposti a condizioni ambientali sfavorevoli. L'effetto di questo tipo di inquinamento può condurre a vari tipi di fenomeni (comparsa o scomparsa di forme alleliche, bande accessorie, sbilanciamento dei picchi, artefatti ecc.) che rendono i profili genetici difficilmente interpretabili. Un'altra fonte di contaminazione è quella derivante dall'introduzione nel campione da esaminare di materiale biologico di diversa provenienza, che può portare a errori clamorosi nella formulazione di un risultato. Quando più di uno di questi eventi interferiscono contemporaneamente nel corso di una stessa analisi, può accadere che il genetista forense fornisca, in piena buona fede, risultati errati.

Il DNA ha poi la caratteristica di essere facilmente trasportato, a differenza, per esempio, delle impronte digitali. Così, oggetti che lo contengono potrebbero essere facilmente abbandonati sul luogo di un crimine, per sviare le indagini e incolpare persone completamente estranee al fatto delittuoso.

POLIMORFISMI DEL CROMOSOMA Y

L'analisi della variabilità del cromosoma Y si è dimostrata di fondamentale importanza negli studi di genetica di popolazione e in alcuni casi di stupro.

Il cromosoma Y è trasmesso inalterato alla progenie maschile e la trasmissione patrilineare e l'assenza di ricombinazione rendono questo un sistema adatto in specifiche circostanze. Un numero consistente di questi marcatori consente così di costruire specifici *aplogruppi*. L'intero cromosoma Y è condiviso anche dai fratelli e da tutti i discendenti per linea paterna. La sua variabilità, pertanto, può essere fortemente ridotta in specifiche popolazioni.

In virtù di queste caratteristiche, i polimorfismi del cromosoma Y sono particolarmente utili per le esclusioni, mentre la loro efficacia negli accertamenti di identità biologica risulta alle volte limitata. Tuttavia possono aiutare a risolvere casi di paternità *deficitari* in cui, per esempio, non sia disponibile il padre. È, infatti, possibile fare degli accertamenti indiretti attraverso i fratelli, i fratelli del padre, il nonno paterno o altri soggetti imparentati in linea paterna.

Nei casi di violenza sessuale, il profilo genotipico ottenuto dall'analisi del cromosoma Y consente il recupero di preziose informazioni genetiche, anche se in commistione del DNA della vittima.

Anche nei casi di tracce miste in cui sono coinvolti due o più soggetti maschili, l'analisi del cromosoma Y, essendo di tipo aploipico e presentando pertanto un solo allele per *locus*, può dare indicazione sul numero di soggetti maschili.

L'analisi del cromosoma Y è, quindi, particolarmente utile in determinate condizioni, ma, ove possibile, è di norma accompagnata dall'analisi degli STR del DNA autosomico.

Da qualche anno sono stati realizzati dei kit di amplificazione in multiplex per lo studio dei polimorfismi del cromosoma sessuale Y.

I sistemi Y-STR che compongono l'aplotipo Y sono costituiti da un core set di 8 loci che determina il *minimal haplotype* del cromosoma Y. I sistemi Y-STR del core set sono: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 e il locus multicopia DYS385a/b. Da gennaio 2003, lo U.S. Scientific Working Group on DNA Analysis Method (SWGDM) raccomanda l'uso insieme ai loci del *minimal haplotype*, di due Y-STR aggiuntivi: DYS438 e DYS439. Oggi sono disponibili in commercio kit che consentono la caratterizzazione fino a 16 loci STR e comprendono i marcatori suggeriti da SWGDAM.

POLIMORFISMI DEL CROMOSOMA X

Il cromosoma X è presente in singola copia negli individui maschili e in doppia copia in quelli femminili. Questa caratteristica può essere utile in alcune circostanze particolari. La trasmissione mendeliana di questo cromosoma dal padre alle figlie femmine è infatti obbligatoria e non risente della ricombinazione meiotica. I marcatori del cromosoma X sono ereditati *in blocco* dal padre a tutte le figlie femmine.

La presenza di molti marcatori polimorfici, in particolare del tipo STR (X-STR), e il numero crescente di studi popolazionistici permettono l'impiego del cromosoma X nella tecnologia del DNA forense.

DNA MITOCONDRIALE (MTDNA)

Anche i mitocondri contengono DNA, costituito però da un singolo cromosoma a struttura circolare a doppio filamento lungo esattamente 16.569 paia di basi (Figura 19.3). Il DNA mitocondriale è necessario per la sintesi di proteine implicate nella respirazione cellulare e trasmesso esclusivamente in linea materna. Ciò è spiegato dal fatto che i mitocondri di origine paterna, presenti soltanto nel flagello o coda dello spermatozoo, non sono coinvolti nella fecondazione dell'ovulo materno, giacché il flagello stesso subisce il distacco ed è disperso una volta che lo spermatozoo ha raggiunto la cellula uovo. Alcune regioni del DNA mitocondriale sono polimorfiche all'interno di una data popolazione. Nel caso degli SNP si tratta di mutazioni puntiformi e tali mutazioni risiedono all'interno di tre specifici segmenti contenuti all'interno di una regione chiamata D-LOOP (*displacement loop*) o regione di controllo del genoma mitocondriale. I tre segmenti compresi nella regione di controllo sono: la regione ipervariabile 1 (HV-I), la regione ipervariabile 2 (HV-II) e la regione ipervariabile 3 (HV-III).

Un'altra caratteristica di notevole interesse forense deriva dalla sua struttura molecolare e dall'elevato numero di copie per cellula. Queste peculiarità lo rendono resistente alla degradazione più del DNA nucleare, essendo, così, l'unica fonte d'informazione genetica in alcuni reperti forensi.

Gli SNP costituiscono una variazione puntiforme (sostituzione di un solo nucleotide) del DNA. Per tale motivo sono talvolta chiamati polimorfismi di sequenza (per distinguerli dai polimorfismi di lunghezza, quali i minisatelliti e gli STR).

Attualmente sono noti alcuni milioni di SNP, distribuiti uniformemente su tutto il genoma, ma si stima che essi possano essere molti di più. In media un nucleotide ogni circa 300 è un SNP. Essendo la principale fonte di diversità umana, attualmente si sta iniziando a utilizzare gli SNP per la realizzazione di nuovi sistemi di identificazione personale. Gli SNP sono prevalentemente bi-allelici. Per questo motivo, rispetto ai marcatori STR che possiedono anche decine di alleli, per ottenere un ugual potere discriminativo sarà necessario analizzare un maggiore numero di SNP. I metodi di analisi degli SNP sono in fase di studio da parte della comunità scientifica e si attende a breve una piattaforma tecnologica in grado di garantire analisi veloci, sensibili, economiche e a elevata possibilità di automazione.

Oltre alle innovazioni tecnologiche, la biologia degli SNP dovrebbe essere più vantaggiosa, rispetto agli STR, in caso di DNA degradato, essendo possibile tipizzare tutti gli SNP a partire da amplificati di dimensioni minori di 100bp. La possibilità di ottenere segnali anche a partire da DNA altamente degradato rappresenta una grande sfida e un potente strumento per la caratterizzazione delle tracce biologiche.

Attualmente i laboratori di ricerca studiano i polimorfismi degli SNP utilizzando uno spettro di tecniche che spaziano dal sequenziamento diretto all'uso di Microarrays, alla Real Time PCR, alla SBE (Single Base Extension), alla spettrometria di massa (MALDI-TOF).

Le applicazioni dei polimorfismi a singolo nucleotide nella pratica forense ricalcano quelle già coperte dagli STR:

- identificazione di campioni biologici altamente degradati;
- definizione dell'origine ancestrale di un particolare campione;
- acquisizione di informazioni fisiognomiche;
- stabilire i rapporti di parentela.

RICERCA, STUDIO E REPERTAZIONE DELLE TRACCE BIOLOGICHE E DEL DNA

Nella ricerca di una prova del delitto, la prima fase dell'analisi del DNA riguarda l'indagine delle tracce biologiche, che nel caso di un crimine ha luogo già nel corso dell'esame di sopralluogo o in occasione degli accertamenti tecnici. Occorre agire sempre con molta cura in tali attività, senza compromettere lo stato dei luoghi e verificando che esso non sia stato dolosamente modificato da terzi. In alcuni casi è utile, nell'attività di ricerca delle tracce biologiche, l'utilizzo del *crime scope*, uno strumento innovativo che esalta i residui organici attraverso l'illuminazione a lunghezza d'onda variabile.

La traccia biologica individuata e repertata viene poi immersa in una soluzione di lisi che rompe le cellule e libera il DNA presente all'interno dei nuclei (ma è possibile recuperare anche il DNA mitocondriale).

È evidente come nessun elemento debba essere sottovalutato in sede di indagini di sopralluogo: le tracce biologiche, infatti, possono presentarsi o celarsi nei modi più diversi e, di frequente, in quantità minima. Esse devono non soltanto essere individuate attraverso un'indagine visiva o meccanica, ma anche essere accuratamente ricercate nei luoghi non visibili come unghie, tappeti, lenzuola e con accurata ispezione cadaverica.

È bene considerare che il DNA può essere isolato anche da annessi cutanei che sono innanzitutto capelli e peli, i quali, se presentano il bulbo trofico, consentono l'analisi del DNA nucleare. In assenza di bulbo, o qualora il nucleo sia atrofizzato, si può estrarre e studiare il DNA mitocondriale.

È possibile utilizzare il DNA contenuto nelle unghie e nella forfora, come del resto quello presente nelle cellule epidermiche lasciate sul corpo della vittima in caso di strozzamento, o su armi o su qualsiasi altro oggetto toccato dall'assassino. Isolare cellule epidermiche dal substrato su cui si sono depositate è estremamente semplice grazie all'utilizzo o di un nastro adesivo o di un tampone imbevuto di acqua distillata.

Inoltre, anche se nei tessuti molli cadaverici la degradazione postmortale del DNA, che inizia con l'autolisi e prosegue con la distruzione delle cellule da parte dei batteri, può portare al loro inutilizzo, alcuni studi hanno evidenziato che, entro la terza settimana è ancora possibile rinvenire DNA a elevato peso molecolare in numerosi tessuti (i migliori risultati si otterrebbero con la corteccia cerebrale). L'esito positivo dell'analisi del DNA sui campioni *postmortem* dipende dallo stato di decomposizione del corpo. Affinché questa analisi abbia successo, è essenziale conoscere il tempo trascorso dalla morte e la temperatura dell'ambiente in cui è stato conservato il corpo. Il sangue può essere utilizzato soltanto se il decesso è recente; la milza, il midollo osseo e i muscoli scheletrici della coscia o del braccio sono buone fonti di DNA; i campioni di osso spugnoso (per esempio le costole) sono ricchi di DNA e le ossa sono anche la migliore fonte di DNA per quanto riguarda cadaveri in avanzato stato di decomposizione. Il DNA può essere isolato anche nella saliva, presente sul dorso dei francobolli, filtri di sigaretta, gomme da masticare e anche nei morsi sul corpo della vittima; nei denti; nelle feci (in cui è possibile tipizzare il DNA mitocondriale); nelle ossa cadaveriche, nelle quali, nel caso di resti scheletrizzati da lungo tempo, occorre tenere presente il rischio di contaminazione di DNA esogeno; nell'urina, la cui quantità di estrazione è in funzione del sesso, delle condizioni di conservazione del campione e del tasso di contaminazione batterica.

Il DNA può essere ottenuto dalla saliva con differenti varianti della tecnica estrattiva in funzione della natura dei campioni (saliva fresca, timbri e buste, macchie o cicche), che non pongono in generale nessun problema particolare.

Una volta raccolte, con estrema cura per non danneggiarle e usando strumenti adeguati (solitamente guanti e pinze di plastica), tutte le tracce biologiche devono essere correttamente conservate per mantenere l'integrità del DNA e analizzate il prima possibile. Quando si trasportano e si conservano prove che potrebbero contenere DNA, è importante che siano tenute all'asciutto e a temperatura ambiente. I campioni devono essere posti in contenitori con chiusura ermetica per tenere lontana l'umidità (mai in sacchetti di plastica chiusi che favoriscono l'ambiente umido, quindi nocivo). La luce solare diretta e le temperature calde possono danneggiare il DNA. Bisogna quindi evitare la conservazione delle prove in ambienti che potrebbero surriscaldarsi.

ANALIZZATORI GENETICI

I frammenti di DNA amplificati mediante PCR sono marcati con oligonucleotidi fluorescenti che vengono incorporati durante la reazione enzimatica. Durante l'elettroforesi capillare, un laser eccita i fluorocromi che a loro volta emettono una radiazione luminosa a una caratteristica lunghezza d'onda. Uno scanner è in grado di rilevare, durante l'elettroforesi, i diversi segnali luminosi emessi dai frammenti di DNA a diverso peso molecolare. Questi sono elaborati in forma grafica nei cosiddetti elettroferogrammi,

dove il singolo allele prende la forma di un picco di fluorescenza. Nell'analisi di frammenti una sola delle due catene è marcata, così ogni allele è evidente in un'unica banda o picco.

Esistono diversi tipi di fluorocromi che possono essere utilizzati. In funzione dei loro spettri di eccitazione/emissione possono essere utilizzati simultaneamente nelle reazioni di multiplex. Diversi kit commerciali, validati per un loro uso in ambito forense, impiegano cinque diversi fluorocromi per la lettura contemporanea di più frammenti di amplificazione. In questo modo, polimorfismi che si sovrappongono in dimensione sono analizzati contemporaneamente perché marcati con fluorocromi diversi.

I sequenziatori sono sotto il controllo di specifici programmi software che permettono di controllare i parametri elettroforetici.

Per consentire una corretta attribuzione allelica, a ciascun campione viene aggiunto un marcatore di peso molecolare noto, caratterizzato da uno specifico fluorocromo. I risultati ottenuti vengono comparati con un campione di riferimento (ladder allelico) contenente le varianti alleliche più comuni di ciascun sistema utilizzato. Grazie alla presenza in ciascun campione del medesimo riferimento (marcatore di peso molecolare), il software assegna automaticamente gli alleli, suggerendo, complessivamente, il genotipo del campione analizzato. Sarà l'operatore tecnico a valutare il processo di assegnazione automatica degli alleli.

TEST DI PATERNITÀ – LEGGI CIVILI

L'art. 30 della Costituzione conosce solo due categorie di figli: quelli nati entro e quelli nati fuori del matrimonio. I primi sono “figli legittimi”, i secondi “figli naturali”⁶.

Con il disegno di legge approvato nel Consiglio dei Ministri del 29 ottobre 2010, s'introduce il principio generale della unicità dello stato giuridico del figlio, per effetto del quale le disposizioni in tema di filiazione si applicano a tutti i figli, senza distinzioni, salvi i casi in cui vi siano ragioni per distinguere i figli nati nel matrimonio da quelli nati fuori dal matrimonio. Le definizioni di “figli nati nel matrimonio” e “figli nati fuori dal matrimonio” sostituiscono quelle precedenti di “figli legittimi” e “figli naturali”, adeguando, in tal modo, il Codice civile alla formula lessicale adottata dall'articolo 30 della Costituzione.

Sul sito si riporta come il nostro Codice civile propone le tematiche del disconoscimento di figli legittimi e del riconoscimento di figli naturali.

ACCERTAMENTO DI PATERNITÀ

L'accertamento/disconoscimento della paternità naturale è stato, nei secoli, un desiderio insoddisfatto, a causa della mancanza di conoscenze scientifiche e di mezzi tecnici idonei. Solo nel ventesimo secolo, con la scoperta del sistema AB0 e poi del fattore Rh e delle regole che ne determinavano la trasmissione ereditaria, la ricerca della paternità naturale è diventata meno aleatoria. La scoperta di altri marcatori, nel siero, nei globuli rossi e bianchi, ha permesso che l'accertamento raggiungesse soddisfacenti livelli di probabilità, ben oltre il 99%, e che il disconoscimento fosse molto facilitato. L'analisi del genotipo (DNA) ha consentito straordinari e incessanti progressi, cosicché ora l'accertamento della paternità ha raggiunto la quasi certezza.

Ogni individuo presenta nel proprio DNA uno specifico codice che definisce la sua impronta genetica. A eccezione, infatti, dei gemelli monozigoti che sono perfettamente uguali, il profilo genetico di

⁶Riforma del diritto di famiglia (legge 151/1975), in cui è stato sostituito il termine “illegittimo” con quello “naturale”.

ogni individuo è in sostanza unico, più di quanto lo siano le impronte digitali. Questa caratteristica è alla base della metodologia utilizzata per determinare se due persone sono correlate geneticamente.

Il test di paternità si basa sul principio che ogni individuo eredita il proprio patrimonio genetico dai genitori, il 50% dal padre e il 50% dalla madre, e consiste nel confrontare le caratteristiche genetiche del figlio oggetto di indagine di paternità con quelle del presunto padre e della madre.

Il padre presunto, per essere considerato biologico, dovrà vedere rappresentato metà del profilo genetico nel figlio/a.

La paternità viene “esclusa” nel caso in cui le caratteristiche genetiche del padre putativo discordino con quelle del figlio oggetto d’indagine.

La paternità viene invece “attribuita” qualora le caratteristiche genetiche del padre e del figlio concordino.

Con l’analisi del DNA, il test di paternità può essere fatto anche prima della nascita del bambino utilizzando cellule fetali ottenute attraverso il prelievo di villi coriali (PVC o villocentesi) o attraverso il prelievo di cellule amniotiche (PCA o amniocentesi). Il PVC si compie intorno alla decima-tredicesima settimana di gestazione.

L’amniocentesi si esegue generalmente dalla quindicesima alla ventiquattresima settimana di gestazione e comporta un prelievo di cellule fetali dal liquido amniotico.

Il test di paternità dopo la nascita è effettuato, invece, o utilizzando un prelievo di sangue periferico del figlio/a o, in alternativa, da un prelievo di cellule con tampone orale. I neonati possono anche essere analizzati alla nascita utilizzando un campione di sangue del cordone ombelicale o su campioni biologici ottenuti con metodiche di prelievo non invasive, quali capelli, urine, saliva o cellule da tessuti diversi.

Quando si compie il prelievo dei capelli, l’esame è effettuato sulle cellule che circondano il bulbo pilifero e, per tale motivo, è indispensabile che i capelli siano presi direttamente dal cuoio capelluto e non caduti spontaneamente. Nelle urine e nel liquido seminale l’analisi è condotta sulle cellule contenute nei relativi liquidi biologici.

I risultati ottenuti utilizzando diversi tipi di materiale biologico sono perfettamente comparabili e possiedono lo stesso grado di accuratezza.

Circa la ricerca di maternità, oggi non si può più affermare in via assoluta che *mater semper certa est* e ciò a causa del fenomeno delle “madri sostitutive”, denominazione che comprende:

- la donna che porta in gestazione un embrione impiantato nel suo utero e che le è geneticamente estraneo, perché ottenuto mediante l’unione di gameti di donatori, con l’impegno di consegnare il bambino una volta nato a chi ha commissionato e pattuito tale gestazione;
- la donna che porta in gestazione un embrione alla cui procreazione ha concorso con il dono del proprio ovulo, fecondato mediante inseminazione con lo sperma di un uomo diverso da suo marito, con l’impegno di consegnare il figlio una volta nato a chi ha commissionato e pattuito la gestazione.

Anche per il test di maternità le prove genetiche sono effettuabili su qualsiasi campione biologico costituito da cellule con nucleo.

PRINCIPIO DEL TEST DI PATERNITÀ

I cromosomi contengono il DNA che rappresenta il materiale genetico di ogni individuo.

Eccetto le cellule germinali (uova nelle femmine e spermatozoi nei maschi), che contengono 23 cromosomi (corredo aploide), tutte le cellule somatiche nucleate di ogni individuo della specie umana contengono 46 cromosomi (corredo diploide).

Al momento del concepimento, una cellula germinale maschile (spermatozoo con 23 cromosomi) si fonde con una cellula germinale femminile (uovo con 23 cromosomi) per originare un nuovo individuo con 46 cromosomi; questo DNA rimane invariato per tutta la vita. Ogni individuo, quindi, è costituito da metà patrimonio genetico (23 cromosomi) ricevuto dal padre biologico e da metà patrimonio genetico (23 cromosomi) ricevuto dalla madre biologica.

L'analisi del DNA si basa sul rilevamento di normali variazioni che sono presenti a livello di molte regioni del materiale genetico di ogni individuo (polimorfismo). Per ogni individuo, la determinazione contemporanea di queste variazioni permette di derivare il profilo genetico che in ogni persona è, in pratica, unico.

COME SI COMPIE IL TEST DI PATERNITÀ

La prima fase consiste nell'estrazione del DNA dai campioni biologici prelevati per l'esame (Tabella 19.1).

Il tratto di DNA che contiene un'informazione genetica viene definito *gene* e la sua localizzazione sui cromosomi viene definita *locus*. All'interno di ogni *locus* sono presenti due alleli, uno di provenienza paterna e uno di provenienza materna.

La determinazione del profilo genetico di un individuo comporta la tipizzazione di tredici-quindici regioni del DNA (*loci*) altamente polimorfiche in lunghezza, variabili da individuo a individuo, conosciute come regioni microsatelliti o STR.

L'analisi dei microsatelliti viene condotta mediante la reazione enzimatica di amplificazione PCR, che consente di amplificare *in vitro* una specifica regione del DNA, copiandola in varie fasi successive fino a ottenere milioni di copie.

Dopo la reazione di amplificazione enzimatica, il profilo genetico viene determinato automaticamente mediante l'impiego di un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente. I frammenti di DNA amplificati sono quindi separati per dimensione.

La valutazione comparativa dei risultati della tipizzazione può portare al riscontro di profili genetici coerenti o non coerenti con l'ipotesi di paternità, sulla base delle leggi della trasmissione ereditaria.

L'incoerenza tra profili genetici rilevati e l'ipotesi di paternità si definisce "incompatibilità".

L'incompatibilità può essere dovuta a diverse cause:

- il padre non ha generato quel figlio;
- si è di fronte a una o più eccezioni alle regole formali della trasmissione ereditaria a causa di uno o più eventi genetici rari (*falsa incompatibilità*).

L'incompatibilità è una constatazione di un fatto, ossia "i profili genetici non sono coerenti con l'ipotesi di paternità".

Secondo la regola empirica adottata, un'incompatibilità non può essere dichiarata se non in presenza di almeno tre o più incompatibilità geniche.

Quando, invece, il profilo genetico del figlio e del padre presunto concordano per ogni caratteristica genetica analizzata, si ottiene "un'attribuzione di paternità".

In questo caso viene eseguita un'analisi statistica dei risultati e infine viene espressa una probabilità di paternità che sarà tanto più prossima al 100% quanto maggiore sarà il numero di regioni di DNA analizzate.

Si investiga su 13-15 regioni del DNA raggiungendo una percentuale di attribuzione del 99,999%, come abbiamo in precedenza accennato questo valore indica che il padre presunto è il padre biologico.

Tabella 19.1 Estrazione del DNA

Campioni biologici su cui eseguire il test di paternità	Quantità
Prelievo ematico in EDTA	2 mL
Liquido amniotico	10 mL
Villi coriali	10 mg
Spot ematico su carta o tessuto	2-3 gocce
Tampone bucale	2 tamponi
DNA	2 ng
Urine	5 mL
Capelli con bulbo (strappati)	1 o più
Saliva	2 mL
Sangue fetale	10 ng
Cicche di sigaretta	1 o più
Chewing gum	1 o più
Lamette da barba	1 o più
Fazzoletti di carta	1 o più
Tracce di liquido seminale	Pochi mm ²
Altri campioni biologici	



Attenzione! Per ulteriori approfondimenti in materia si veda l'approfondimento sul sito.

Test di paternità legale. Per effettuare un accertamento di paternità che abbia valenza legale, è necessario identificare i soggetti che si sottopongono al test e acquisire le necessarie autorizzazioni, facendo compilare alle parti un apposito modulo.

In caso di minorenni non emancipati è indispensabile un'esplicita autorizzazione all'esecuzione del test rilasciata da parte degli esercenti la patria potestà.

Queste procedure si rendono necessarie al fine di verificare da un lato che il test sia effettuato effettivamente sui soggetti dichiarati, dall'altro la reale intenzione a sottoporsi a un test che ha finalità del tutto particolari e non rappresenta un semplice prelievo di sangue a fini clinici.

Il consenso che ne deriva deve quindi essere inteso come responsabile intenzione all'esecuzione dell'accertamento. Qualora vi fossero motivi d'incompatibilità tra le parti, è possibile effettuare i prelievi in tempi e luoghi diversi, purché non all'insaputa di uno o dell'altro genitore.

Al termine dell'analisi sarà redatta una dettagliata relazione tecnica comprensiva di cromatogrammi e analisi statistica dei risultati.

La relazione potrà essere utilizzata per fini processuali, in azioni di riconoscimento/disconoscimento di paternità.

RACCOMANDAZIONI DEL GeFI

Per la possibilità di colpevoli improvvisazioni, il GeFI (Gruppo dei genetisti forensi italiani, aderente alla Società italiana di medicina legale e delle assicurazioni e all'International Society for Forensic Genetics, ISFG) si è sentito in obbligo di emanare direttive scientifiche e tecniche. Il vasto panorama delle indagini

di genetica forense e i temi scientifici a 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 e altri) e laboratori privati. Centri e laboratori di genetica forense si sono sviluppati in completa autonomia rispetto alle 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 per garantire la validità dei risultati.

Il GeFI ritiene che 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.

PROVA DEL DNA NEI PROCESSI CIVILI E PENALI

L'analisi del DNA applicata al processo, sia in sede civile sia penale, costituisce una delle nuove frontiere delle scienze forensi. La sua utilità deborda dall'ambito processuale e si estende anche ad altri campi di rilevanza giuridica. La possibilità di amplificare specifiche sequenze di DNA da campioni molto diluiti è balzata dai laboratori di ricerca al controllo degli alimenti, alla diagnostica e alle procedure forensi. Da qui la crescente importanza dell'analisi del DNA che entra nel processo civile attraverso la consulenza tecnica (d'ufficio o di parte) e nel processo penale attraverso l'attività dei periti e/o dei consulenti tecnici.

La giustizia ha sempre più bisogno di certezze, di uomini e mezzi per evitare che un delitto resti impunito, di trasformare indizi e reperti in prove ai fini del procedimento giudiziario e, più ampiamente, di pervenire all'identificazione personale, sia nei processi penali sia in quelli civili.

La prova scientifica costituisce un passaggio obbligato non soltanto alla luce dell'attuale Codice di procedura penale, che stabilisce come la prova della colpevolezza o meno di un soggetto debba formarsi in dibattimento attraverso la dialettica tra difesa e accusa, ma anche alla luce delle norme civili, che sempre più spesso comportano l'utilizzazione di applicazioni tecniche e scientifiche. Ecco perché gli accertamenti tecnico-scientifici assumono, oggi come non mai, notevole importanza e significato anche sul piano probatorio, che però è legato al contesto processuale.

BANCA DATI DEL DNA

Il 24 giugno 2009 il Senato, con un larghissimo consenso, ha approvato le norme di recepimento del trattato di Prüm che prevede l'istituzione di banche dati del DNA nei Paesi aderenti e la loro reciproca connessione. In Italia, sinora, esistevano solo archivi circoscritti all'attività di forze investigative speciali come i RIS dei Carabinieri, mentre con la nuova legge sarà operativo un unico e molto più ampio archivio nazionale dei profili genetici.

Nei tempi che saranno indicati nei decreti attuativi, a cura delle forze di polizia (che potranno stipulare convenzioni anche con laboratori specializzati), dovrà essere compiuta la mappatura dei profili di tutte le persone detenute oppure sottoposte a una misura alternativa alla detenzione, in seguito a sentenza irrevocabile, ma anche di tutti i soggetti sottoposti a custodia cautelare o arresti domiciliari oppure arrestati in flagranza o sottoposti a fermo. Nella banca dati sono destinati a confluire anche i profili di sconosciuti, raccolti sul luogo del delitto, di persone scomparse e dei cadaveri non identificati.

L'Accesso, di cui deve essere garantita la tracciabilità, sarà possibile solo alle forze di polizia e all'Autorità giudiziaria, ma i profili del DNA non potranno contenere informazioni che permettano l'identificazione diretta del soggetto cui sono riferiti. Solo dopo esito positivo del confronto sarà possibile agli investigatori ottenere il nome dell'interessato. Norme specifiche, con sanzioni fino a tre anni di carcere, sono previste per il pubblico ufficiale che fa uso o diffonde dati in violazione della disciplina di protezione.

I profili dovranno essere conservati per un periodo che sarà fissato da un futuro regolamento attuativo, ma che, comunque, non potrà essere superiore a quaranta anni, mentre i campioni biologici saranno distrutti entro i venti anni. Saranno invece distrutti d'ufficio i campioni e i profili acquisiti nei confronti di una persona poi assolta con formula definitiva oppure se le operazioni di prelievo sono state compiute in maniera irregolare.

ALTRI MEZZI IDENTIFICATIVI

La Botanica forense è una nicchia riservata ad alcuni specialisti botanici, i quali, appunto, sono in grado di distinguere piante o parte di essa (fiori, foglie, pollini ecc.) a fini forensi.

Nel contesto medico-legale, il problema dell'identificazione di parti di una pianta non si pone frequentemente, ma certamente ogni medico legale che si occupi di cadaveri ha desiderato, almeno una volta nella sua vita professionale, di avere l'aiuto di un esperto botanico, che avesse voglia di dedicare la propria attenzione a una strana foglia marcita trovata sotto un corpo.

Anche l'identificazione di pollini richiede l'opera di esperti botanici.

È palese che in talune circostanze l'identificazione del polline e di parti di piante possa aiutare a risolvere problemi medico-legali, ma è altrettanto palese che questo compito non possa essere affidato al medico legale, il quale non ha la competenza tecnica necessaria.

Gli specialisti e i laboratori di genetica delle piante e agraria possono dare il loro contributo in questo settore, identificando il DNA delle piante e dei pollini, tema sul quale né i laboratori di genetica in medicina legale né i laboratori di genetica clinica hanno esperienza.

Qualche volta si pone il problema dell'identificazione dei cibi nel contenuto gastrico. Usualmente ci si basa sulla morfologia per proporre un'identificazione e chiunque abbia una certa esperienza di cadaveri umani è di solito in grado di identificare i cibi più comuni.

I fattori che ostacolano l'identificazione degli alimenti sono rappresentati dalla masticazione, dalla cottura, dalla loro permanenza in un ambiente molto acido come quello dello stomaco. Quest'ultimo fattore è capace di distruggere la molecola del DNA, mentre la masticazione e la cottura permettono la conservazione della molecola e la sua identificazione. Non abbiamo notizia che sia stata impiegata la tecnica del DNA per l'identificazione del contenuto gastrico. Essa dovrebbe comunque limitarsi alla diagnosi di specie, per la quale è di uso comune l'immunoprecipitazione in agar, anche se si possono immaginare situazioni in cui l'identificazione precisa dell'animale o della pianta è necessaria.

BIBLIOGRAFIA

- Bargagna, M., Domenici, R., 1977. I marcatori genetici delle immunoglobuline umane in *Medicina Legale E.T.S.* Pisa.
- Brettell, T.A., Butler, J.M., Almirall, J.R., 2007. *Forensic science. Anal Chem.* Jun 15; 79 (12) , 4365-4384. Epub 2007 May 17. Review.
- Brettell, T.A., Butler, J.M., Saferstein, R., 2005. *Forensic science. Anal Chem.* Jun 15; 77 (12), , 3839-3860. Review. PubMed PMID 15952759.
- Buel, E., Schwartz, M.B., LaFountain, M.J., 1998. Capillary electrophoresis STR analysis: comparison to gel-based systems. *J Forensic Sci. Jan;* 43 (1), 164-170.
- Butler, J.M., 2007. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques.* Oct; 43 (4), vol 2. Review.
- Cass. pen Sez VI n. 10688, 15/10/1996.
- Cass. pen Sez. IV n. 54, 06/12/1996.
- D'Ambrosio, L., Vigna, P.L., 1998. *La pratica di Polizia Giudiziaria.* Cedam Editore, Padova.
- Dawid, A.P., Mortera, J., Pascali, V.L., 2001. Non-fatherhood or mutation? A probabilistic approach to parental exclusion in paternity testing. *Forensic Sci Int.* Dec 15; 124 (1), 55-61.
- De Finetti, B., 1974. *Theory of probability, vol 1.* John Wiley and Sons, New York.
- Gill, P., 2001. An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int J Legal Med* 114 (4-5), 204-210.
- Giust. pen Sez. I, n. 9033, 12/09/1997.
- Inns, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T., 1990. *PCR protocols, a guide to methods and applications.* Academic press Inc., San Diego.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature.* Mar 7-13; 314 (6006), 67-73.
- Jobling, M.A., Gill, P., 2004. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 2004 Oct 5 (10), 739-751, Review. Erratum in: *Nat Rev Genet.* 2005 Mar; 6 (3), 246.
- Laux, D.L., 1991. Effects of luminol on the subsequent analysis of bloodstains. *J Forensic Sci.* Sep 36 (5), 1512-1520, Erratum in: *J. Forensic Sci* 1992 Mar; 37 (2), 372.
- Lolov, S.R., Yomtova, V.M., Tsankov, Y., et al., 1992. An Express Immunological method for detection of Human Seminal Plasma. *Forensic Science International.* 54, 39-50.
- Lytle, L.T., Hedgecock, D.G., 1978. Chemiluminescence in the visualization of forensic bloodstains. *J Forensic Sci.* Jul; 23 (3), 550-562.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Old, J.B., Schweers, B.A., Boonlayangoor, P.W., Reich, K.A., 2009. Developmental validation of RSID-saliva: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of saliva. *J Forensic Sci.* Jul 54; (4), 866-873, Epub 2009 Apr 17.
- Regolamento per l'esecuzione del Codice di procedura penale, artt. 10 e 11 D. M. n. 33430/09/1989.
- Ricci U., 2000. *DNA e Crimine.* Laurus Robuffo Editore, Roma.
- Sobrinho, B., Carracedo, A., 2005. SNP typing in forensic genetics: a review. *Methods Mol Biol* 297, 107-126, Review. PubMed PMID, 15570103.
- Suzuki, O., Kido, A., Oya, M., 1983. Zinc Test as a New Tool For Identification of Human Seminal Stains. *Forensic Science International.* 22, 231-235.
- Szibor, R., 2007. X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci Int Genet.* Jun; 1 (2), 93-99, Epub 2007 Apr 27. Review. PubMed PMID, 19083736.
- Tagliabracci, A., Domenici, R., Pascali, V., Pesaresi, M., 2007. *Linee guida metodologico-accertative criteriologico-valutative. Indagini generico-forensi di paternità e identificazione personale.* Editore Piccin, Padova.

- Turrina, S., Atzei, R., Filippini, G., De Leo, D., 2007. Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. *Forensic Sci Int Genet.* Jun; 1 (2), 201–204., Epub 2007, Feb 26.
- Umami Ronchi, G., Vecchiotti, C., 1994. *Il laboratorio di Medicina legale.* Editrice Lombardo editore, Roma.

SCHEDA SINOTTICA

Generalità

- I progressi della biologia molecolare nello studio del genoma umano hanno permesso grandi passi avanti, non solo nelle scienze mediche e in quelle biologiche, ma anche in quelle sociali.
- Le conoscenze scientifiche nel campo della biologia molecolare, dell'immunologia e della genetica e il perfezionamento delle tecniche di analisi hanno permesso, negli ultimi decenni, un rapido sviluppo della genetica forense.
- Lo studio del DNA rappresenta una rilevante sorgente di variabilità in grado di differenziare ciascun individuo rispetto agli altri in modo efficace.
- Questa metodologia ha rivelato una tale potenzialità e versatilità da conquistare in poco tempo credito e favore non solo nella comunità scientifica internazionale, ma anche tra legislatori e giudici. Si delinea, quindi, un concetto nuovo di identità individuale, strettamente legato alle leggi della biologia, della genetica e dell'ereditarietà, del calcolo delle probabilità, che si può indicare come identificazione genetica.

Sopralluogo giudiziario nelle indagini forensi

- Nella ricerca di una prova del delitto, la prima fase dell'analisi del DNA riguarda la ricerca delle tracce biologiche che, nel caso di un delitto, ha luogo già nel corso delle indagini di sopralluogo o in occasione degli accertamenti tecnici:
 - repertazione;
 - esame delle impronte;
 - esame delle macchie.

Diagnosi di genere e di specie

- Test del luminol.
- Metodi immunologici.

Diagnosi di liquido seminale

- Metodi fisici.
- Metodi chimici.
- Metodi immunologici.

Formazioni pilifere

- Indice midollare (nella specie umana deve essere inferiore a 0,3).

DNA fingerprinting (impronta genetica)

- La rivoluzione delle tecniche di identificazione umana si ebbe con la scoperta dei polimorfismi del DNA. I polimorfismi del DNA di interesse forense sono delle variazioni della sequenza del DNA che differiscono tra gli individui di una data popolazione. L'intero processo analitico si sviluppa, sostanzialmente, in tre fasi: estrazione del DNA nucleare; amplificazione genica – PCR; tipizzazione genica.

Test della paternità

- Con l'analisi del genotipo (DNA), l'accertamento della paternità ha consentito straordinari e incessanti progressi e ha raggiunto: la certezza nell'esclusione della paternità nei casi in cui si verifichi la presenza di almeno tre o più incompatibilità geniche; la quasi certezza nell'attribuzione attraverso un'analisi biostatistica e con un indice di paternità $\geq 99,999\%$.

