



5/12/2016

Criteri minimi di qualità delle analisi di Genetica Forense ad uso identificativo

Gruppo di Lavoro SIGU – Genetica Forense

Coordinatore: Prof. Emiliano Giardina

Sara Amitrano, Chiara Barone, Sebastiano Bianca, Francesco Binni, Mirella Bruttini, Irene Caliendo, Piera Carta, Alessandro Civolani, Anna D'Ambrosio, Francesca Del Vecchio Blanco, Manuela Di Natale, Cristina Di Stefano, Francesca Forzano, Alessio Fronduti, Emiliano Giardina, Paola Grammatico, Sara Iozzi, Ilaria Longo, Laura Manzo, Francesca Mari, Alvaro Mesoraca, Mafalda Mucciolo, Giuseppe Novelli, Anna Lucia Nutini, Giulio Piluso, Ilenia Pietrangeli, Nunzia Piumelli, Michele Ragazzo, Barbara Raso, Nicoletta Resta, Luca Salvaderi, Carlo Sepe, Katerina Steindl, Isabella Torrente, Francesca Torricelli, Sara Zanchetti, Stefania Zampatti

Con la collaborazione di: Angela Maiello e Marina Migliosi.

L'entrata in vigore del DPR n. 87 del 7 aprile 2016 relativo alla Banca Dati del DNA richiede un adeguamento della modalità di esecuzione delle analisi di Genetica Forense garantendo la qualità del risultato attraverso il controllo dei processi pre analitici ed analitici. Il decreto rappresenta un'opportunità, per delineare elementi operativi guida, condivisi dai Laboratori italiani del settore, per l'armonizzazione delle attività in un'ottica di miglioramento finalizzato a garantire la qualità del dato e produrre profili genetici utili ed è in quest'ottica che è richiesto che i laboratori che contribuiscono alla Banca Dati del DNA debbano essere accreditati secondo la norma ISO/IEC 17025. Poiché pochi centri sono attualmente accreditati è auspicabile favorire il percorso di accreditamento dei laboratori di Genetica Forense: è in questa prospettiva che il gruppo di lavoro di Genetica Forense della SIGU ritiene utile individuare, in un documento tecnico di indirizzo, gli aspetti analitici ed organizzativi che influenzano la qualità e l'attendibilità delle analisi fornendo elementi applicativi utili ai laboratori per il loro percorso di accreditamento ed essere di supporto nell'ambito delle consulenze tecniche e nelle perizie nei procedimenti penali .

ACCETTAZIONE E GESTIONE DEI CAMPIONI/REPerti

Criterio 1: E' necessario documentare tutte le procedure pre-analitiche (modalità di raccolta dei campioni, modalità di ispezione dei reperti e loro conservazione, ecc.), analitiche (metodi di estrazione, quantificazione, tipizzazione ecc.), post-analitiche (interpretazione dei dati).

Criterio 2: Tutti i file generati, i fogli di lavoro, i dati grezzi, le fotografie, relativi ad un unico procedimento, dovranno essere conservati secondo le modalità stabilite o condivise con l'autorità giudiziaria. Gli estratti di DNA dovranno essere messi nella disponibilità dell'autorità giudiziaria, che ne dovrà autorizzare la distruzione, la conservazione o la restituzione.

Criterio 3. È necessario redigere un verbale di accettazione che dichiari la provenienza dei campioni/reperti e l'identità della persona che li consegna in laboratorio. È compito del laboratorio mantenere integra la catena di custodia dei reperti [1]

Criterio 4. È necessario valutare l'idoneità dei campioni/reperti e delle modalità di trasporto e conservazione, secondo criteri di idoneità e di trasporto preventivamente stabiliti [1]

STRUTTURA E PERSONALE DI LABORATORIO

Criterio 5. Solo alle persone autorizzate deve essere permesso l'accesso ai locali in cui vengono eseguite le analisi e dove sono conservati i campioni biologici.

Criterio 6. È necessario dotarsi di un database interno di esclusione contenente i profili genetici delle persone che hanno accesso al laboratorio, tale database deve essere in accordo con quanto previsto in materia di tutela della privacy.

Criterio 7. Il laboratorio deve dare evidenza documentata della competenza del personale (formazione ed esperienza) in relazione alle responsabilità ed inserire nel manuale della qualità i requisiti minimi del personale.

FASE ANALITICA

Criterio 8. È necessario che i risultati delle analisi volte a determinare la natura del reperto biologico (diagnosi generiche) vengano conservati mediante foto acquisizione. [2,3]

Criterio 9. È preferibile che la diagnosi generica preveda l'inserimento di controlli negativi e positivi.

Criterio 10. È preferibile dotarsi di un lettore automatico in grado di stampare un report esaustivo con i dati densitometrici e cronologici dell'analisi. [4]

Critério 11. È necessario effettuare dei controlli negativi di estrazione (bianchi) per monitorare il processo e per assicurare l'assenza di contaminazione. [5]

Critério 12. È preferibile dotarsi di sistemi automatici di estrazione. [2]

Critério 13. È preferibile eseguire la quantificazione degli acidi nucleici derivanti dai reperti mediante tecnologia Real-Time [2]. Per i campioni biologici è preferibile determinare la quantificazione del DNA [2] a meno che non vengano utilizzati metodi diretti.

Critério 14. È necessario eseguire la quantificazione dei bianchi di estrazione. [5]

Critério 15. È necessario utilizzare kit di amplificazione commerciali e validati per uso forense. [2]

Critério 16. È necessario eseguire almeno un controllo negativo di amplificazione ed almeno un controllo positivo. [6]

Critério 17. È necessario eseguire l'amplificazione del bianco di estrazione. [5]

Critério 18. È necessario che la corsa elettroforetica dei campioni avvenga contestualmente alla corsa del ladder allelico. [6]

Critério 19. È necessario analizzare i campioni biologici di riferimento in sedute analitiche differenti rispetto ai reperti.

FASE INTERPRETATIVA

Critério 20. È necessario che il laboratorio definisca preventivamente i criteri di accettabilità per i controlli negativi, positivi, bianchi di estrazione e per il ladder allelico . [6]

Critério 21. È necessario che il laboratorio determini sperimentalmente la soglia analitica (AT). [6,7]

Critério 22. È necessario utilizzare un metodo biostatistico di tipo probabilistico. [8,9,10]

Critério 23. È necessario che il laboratorio determini sperimentalmente la soglia stocastica (ST) necessaria per l'interpretazione dei profili singoli.

Critério 24. È necessario determinare il valore soglia LOQ (RFU) sperimentalmente qualora il metodo biostatistico d'interpretazione ne preveda l'utilizzo.

Critério 25. È necessario comparare i profili genetici attraverso calcolo biostatistico finalizzato all'ottenimento del valore di LR (profili singoli e misti).

Critério 26. Nel caso dei profili misti che prevedano l'inclusione di più di un individuo noto, è necessario fornire il massimo valore

di LR. In questi casi è necessario calcolare il valore di LR per ogni singolo contribuente.

Criterio 27. È preferibile che i laboratori definiscano le caratteristiche analitiche dei profili che richiedono la conferma mediante replica di amplificazione.

Criterio 28. È necessario partecipare ad almeno un proficiency test (PT) annuale

RELAZIONE TECNICA

Criterio 29. È preferibile allegare gli elettroferogrammi di tutti i campioni analizzati compresi i controlli.

Criterio 30. È preferibile, se disponibili, allegare i report del reader o le fotografie per l'interpretazione dei risultati della diagnosi generica.

Criterio 31. È necessario fornire i risultati della quantificazione ed è preferibile allegare i report dello strumento.

Criterio 32. È necessario riportare i risultati dei calcoli biostatistici ed è preferibile allegarne i report generati dai software biostatistici.

Criterio 33. E' necessario che la relazione tecnica riporti la partecipazione a sistemi di gestione di qualità ed a controlli di qualità esterni

Bibliografia

- [1] Lee H.C. and Ladd C. (2001). “Preservation and collection of biological evidence”. *Croatian Medical Journal*, 42,225 –228.
- [2] Butler J. M. (2011) “Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology”. Elsevier Academic Press.
- [3] *Crime Scene and Evidence Collection Handbook*. (1999). Washington, D.C.: Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms.
- [4] Sinelnikov A., Kalinina A., Old J.B., Boonlayangoor P.W. and Reich K.A. (2013) “Evaluation of Rapid Stain IDentification (RSID™) Reader System for Analysis and Documentation of RSID™ Tests”. *Appl. Sci.*, 3, 624-635.
- [5] ENFSI. “Contamination prevention guidelines” (2010).
- [6] SWGDAM. “Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories” (2010).
- [7] Bregu J., Conklin D., Coronado E., Terrill M., Cotton R.W., Grgicak C.M. (2012) “Analytical Threshold and sensitivity: Establishing RFU threshold for Forensic DNA Analysis”. *J. Forensic Sci.*, 58 (1), 120-9.
- [8] Gill P., Gusmão L., Haned H., Mayr WR., Morling N., Parson W., Prieto L., Prinz M., Schneider H., Schneider P.M., Weir B.S. (2012) “DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods”. *Forensic Science International: Genetics* 6(6), 679-688.
- [9] Haned H., Slooten K., and Gill P. (2012) “Exploratory data analysis for the interpretation of low template DNA mixtures”. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6(0). 762-774.

- [10] Haned H., Egeland T., Pontier D., Pène L. and Gill P. (2011) “Estimating drop-out probabilities in forensic DNA samples: a simulation approach to evaluate different models”. *Forensic Sci Int Genet.* 5, 525-531.
- [11] Gill P, Puch-Solis R., Curran J. (2009). “The low-template-DNA (stochastic) threshold--its determination relative to risk analysis for national DNA databases”. *Forensic Sci Int Genet.* 2009 Mar;3(2):104-11.
- [12] Armbruster D.A., Pry T. (2008) “Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation”. *Clin. Biochem Rev., Vol 29 Suppl (i).*
- [13] Bleka Ø., Storvik G., Gill P. (2016) “EuroForMix: An open source software based on a continuous model to evaluate STR DNA profiles from a mixture of contributors with artefacts”. *Forensic Science International: Genetics* 21, 35–44.
- [14] Kelly H., Bright J., Buckleton J.S., Curran J.M. (2014) “A comparison of statistical models for the analysis of complex forensic DNA profiles”. *Science and Justice* 54, 66–70
- [15] Gill P., Brenner CH., Buckleton J.S., Carracedo A., Krawczak M., Mayr W.R., Morling N., Prinz M., Schneider P.M., and Weir B.S. (2006). “DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures”. *Forensic Sci Int.* , 160, 90-101.
- [16] FBI. “Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories” (2000).
- [17] Benschop CC1, van der Beek CP, Meiland HC, van Gorp AG, Westen AA, Sijen T. (2011) “Low template STR typing: effect of replicate number and consensus method on genotyping and DNA database search results”. *For.Sci.Int Genetics*, 5, 316-328.

[18] Norma 17025 (UNI CEI NE ISO/IEC 17025:2005+ERRATA CORRIGE DEL 2007 ILAC-G19:08 - Modules in a Forensic Science Process.

[19] ENFSI. “Guideline for Evaluative Reporting in Forensic Science” (2015).

[20] EURACHEM. “The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics” (2014).

Glossario

Necessario: criterio indispensabile per garantire l’idoneità di un processo o di un’analisi

Preferibile: criterio consigliato per garantire la migliore qualità di un processo o di un’analisi

Proficiency test: controllo di qualità in forma di esercizio interlaboratorio al fine di verificare le competenze del laboratorio che ne aderisce. Prevede una serie di prove proposte da un ente esterno che provvede alla valutazione della qualità del risultato

Campioni biologici: campioni da sottoporre ad analisi e del quale si conosce la natura biologica (es. tampone buccale, prelievo di sangue periferico)

Reperti: materiali di qualsiasi natura, presumibilmente correlati ad un evento criminoso e da sottoporre ad analisi di genetica forense

LR: rapporto tra due ipotesi mutualmente esclusive ed esaustive. Al numeratore (Hp) viene posta l’ipotesi da dimostrare (ad es. il soggetto analizzato è colui che ha contribuito alla traccia) mentre

al denominatore (Hd) l'ipotesi contraria (ad es. un soggetto sconosciuto ha contribuito alla traccia). L'ipotesi al numeratore risulta più probabile qualora il valore di LR è >1 , mentre l'ipotesi al denominatore risulta più probabile qualora il valore di LR è <1 ; se, invece, il valore di LR risulta $=1$ l'analisi è da considerarsi inconclusiva [15]

Metodo probabilistico: è il metodo che prende in considerazione la probabilità del verificarsi di effetti stocastici (drop-in e drop-out allelico). Tale approccio prevede all'ipotesi Hp, in caso di non identità tra i genotipi non un valore necessariamente uguale a 0, come previsto dal metodo binario, ma un valore compreso tra 0 e 1 [8]

Soglia analitica: valore soglia espresso in Unità di Fluorescenza Relativa (RFU), al di sotto del quale i segnali evidenziati sono considerati "rumore di fondo", al di sopra del quale sono considerati nell'interpretazione

Soglia Stocastica: valore soglia espresso in Unità di Fluorescenza Relativa (RFU) al di sopra del quale è possibile escludere il fenomeno stocastico di "drop-out" associato ad un allele omozigote

LOQ: il valore soglia misurato in termini di Unità di Fluorescenza Relativa (RFU) al di sopra del quale è possibile garantire correlazione diretta tra quantità di DNA introdotta in PCR e intensità dei segnali elettroforetici in termini di RFU

Unità di fluorescenza relativa (RFU): misura relativa di un allele in un elettroferogramma; è direttamente proporzionale alla

quantità di amplificato presente nel campione. La scala degli RFU è mostrata sull'asse delle ordinate di un elettroferogramma

Diagnosi generica: analisi utile per valutare la natura biologica della traccia

Dato grezzo: è il dato derivante da corsa elettroforetica contenente tutti i parametri di corsa utilizzati nell'analisi elettroforetica

Controllo negativo: campione privo di materiale biologico, ma contenente i reagenti impiegati nelle diverse fasi di prova; viene utilizzato per il monitoraggio di eventuali contaminazioni

Controllo positivo: campione biologico di cui si conosce il corretto risultato analitico; viene utilizzato per la conferma del corretto funzionamento dei reagenti di analisi

Ladder allelico: campione contenente gli alleli più comuni di tutti gli STR presenti nella popolazione. È utilizzato per correlare la dimensione (espressa in paia di basi) del prodotto di amplificazione con un sistema di riferimento univoco identico per tutti i laboratori