

MEDICINA LEGALE

CRIMINOLOGIA
E DEONTOLOGIA MEDICA

Collana diretta da GIACOMO CANEPA - ANGELO FIORI
TULLIO BANDINI - ANTONIO FARNETI

LO STATO DELL'ARTE IN GENETICA FORENSE

a cura di

D. De Leo, S. Turrina, M. Orrico

Questo volume raccoglie i contributi scientifici dei relatori e dei partecipanti al XIX Convegno Nazionale del Ge.F.I. (Genetisti Forensi Italiani), tenutosi a Ospedaletto di Pescantina (Verona), dal 14 al 16 novembre 2002.

I recenti eventi criminosi, che dalle indagini criminalistiche ed in particolare genetiche per l'identificazione del profilo DNA hanno avuto utili riscontri per l'individuazione del responsabile, e la risonanza che tali indagini hanno avuto sui mass media suscitando interesse e curiosità anche nei non addetti ai lavori, impongono un costante aggiornamento delle potenzialità diagnostiche ed un loro adeguamento alle esigenze processuali.

L'incontro veronese ha assunto un particolare rilievo, quale momento necessario di incontro fra i vari studiosi per la validazione di nuovi protocolli operativi, l'analisi dei casi complessi e dubbi, l'interazione con gli utenti di queste analisi, in primis l'Autorità Giudiziaria, che riducano al minimo l'eventuale margine di errore, le cui conseguenze sul piano della responsabilità penale (e civile nel caso di accertamento della paternità) sarebbero a dir poco tragiche.

Va inoltre sottolineato come all'incontro abbiano partecipato, in veste di relatori, alcuni fra i maggiori esperti europei della disciplina che non hanno mancato di dimettere i loro contributi scritti, dei quali siamo onorati.

Gli argomenti trattati, al di là degli aspetti più squisitamente medico-biologici, hanno anche giustificato la presenza di numerosi operatori del Diritto (Magistrati, Avvocati, Forze di Polizia) nella veste di Relatori ed in quella di partecipanti, i cui interventi rappresentano doverosamente la parte introduttiva dell'opera.

Siamo convinti che lo sforzo di dare riscontro, per la prima volta nella storia del Ge.F.I., al Volume degli Atti, che inevitabilmente assume una veste altamente specialistica, abbia colmato un vuoto editoriale che la frequenza della odierna casistica giudiziaria non consentiva oltre di accettare.

L'auspicio è che in queste pagine gli operatori del

- CIRO MOLISSO - CORRADO PIETRANTUONO - MARIO TURSI, *Infermità cardiovascolari e capacità di lavoro*. Linee guida di valutazione medico-legale, 8°, p. XVIII-386.
- LUIGI PALMIERI, *L'urgenza medico-legale*. La competenza specialistica nell'attività del medico di base, 8°, p. X-326.
- Infanzia e abuso sessuale*, a cura di TULLIO BANDINI e BARBARA GUALCO, 8°, p. XVIII-424.
- DANIELA MARCHETTI - ANTONIO DI TILIO, *La violenza sessuale*. Aspetti giuridici e medico-legali, 8°, p. VIII-256.
- ALDO MORELLO, *Aspetti medico-legali di alcune patologie neurochirurgiche*, 8°, p. VIII-204.
- ANGELO DEMORI - DAVIDE RONCALI - MARIO TAVANI, *Compatibilità carceraria, HIV/AIDS e "malattia particolarmente grave"*. Profili giuridici, riflessi sociologici, aspetti medico-legali e criminologici, prefazione di ANTONIO FORNARI, 8°, p. XII-138.
- COLOMBA CALCAGNI - ENRICO MEI, *Medicina legale canonistica*. Corredata da una rassegna di sentenze rotali, 8°, p. XVI-566.
- GIANCARLO UMANI RONCHI - GIORGIO BOLINO - FRANCESCO TRADITI, *La diagnosi di epoca della morte*. Moderni orientamenti e limiti razionali, 8°, p. XVI-392.
- LUIGI PALMIERI - GIANCARLO CARUSO, *Lesività specifica da fuochi d'artificio*, 8°, p. XIV-238.
- La valutazione del paziente neoplastico in ambito medico legale*. Atti del Congresso, S. Margherita Ligure, 6-8 aprile 2000, a cura di MARCELLO CANALE, 8°, p. X-234.
- Carcere e territorio*, a cura di UMBERTO GATTI, BARBARA GUALCO, 8°, p. XII-460.
- Verso una professionalizzazione del bioeticista*. Analisi teorica e ricadute pratiche, a cura di MARIO PICOZZI, MARIO TAVANI e PAOLO CATTORINI, 8°, p. XII-350.
- Lo stato dell'arte in genetica forense*. Atti del XIX Congresso Nazionale Ge.F.I. - Genetisti Forensi Italiani, Ospedaletto di Pescantina - Verona, 14-16 novembre 2002, a cura di DOMENICO DE LEO, STEFANIA TURRINA, MARCO ORRICO, 8°, p. XII-342.

Per Informazioni e Acquisti

Dott. A. Giuffrè Editore S.p.A. - Via Busto Arsizio, 40 - 20151 Milano
Tel. 02/380.892.90 - Fax 02/380.095.82
<http://www.giuffre.it>

Centri di documentazione e di distribuzione Giuffrè

MEDICINA LEGALE

CRIMINOLOGIA
E DEONTOLOGIA MEDICA

Collana diretta da GIACOMO CANEPA - ANGELO FIORI
TULLIO BANDINI - ANTONIO FARNETI

LO STATO DELL'ARTE IN GENETICA FORENSE

ATTI DEL XIX CONGRESSO NAZIONALE
Ge.F.I. - GENETISTI FORENSI ITALIANI

Ospedaletto di Pescantina - Verona, 14-16 novembre 2002

a cura di

D. De Leo, S. Turrina, M. Orrico

GIUFFRÈ EDITORE

MEDICINA LEGALE

CRIMINOLOGIA E DEONTOLOGIA MEDICA

Collana diretta da GIACOMO CANEPA - ANGELO FIORI
TULLIO BANDINI - ANTONIO FARNETI

- FERNANDO SANTOSUOSSO, *La fecondazione artificiale umana*, 8°, p. VIII-150.
- GIUSEPPE DELL'OSSO, *Capacità a delinquere e pericolosità sociale*, 8°, p. XII-158.
- FERDINANDO ANTONIOTTI - OSVALDO DE TULLIO - NATALE MARIO DI LUCA, *La causa di servizio l'equo indennizzo e l'azione di risarcimento dei pubblici dipendenti*, terza edizione, 8°, p. XVI-560.
- Fenomenologia dell'omicidio*, a cura di GIACOMO CANEPA, 8°, p. IV-428.
- Le piccole invalidità permanenti in responsabilità civile: valutazione medico-legale e costo economico*, Seconda edizione integrata, a cura di FRANCESCO INTRONA e DANIELE RODRIGUEZ, 8°, p. LIV-480.
- GIACOMO CANEPA - FRANCESCO FILAURO - ROBERTO GIARETTI - ANDREA LOMI, *La valutazione tabellare dell'invalidità in responsabilità civile, il «Barème fonctionnel» del 1982*, 8°, p. X-192.
- CESARE GERIN, *La valutazione medico-legale del danno alla persona in responsabilità civile*, 8°, p. IV-272.
- Criminologia e psichiatria forense*, Momenti di riflessione dottrinale ed applicativa, a cura di GIOVANNI BATTISTA TRAVERSO, 8°, p. XVI-552.
- ORONZO GRECO - ROBERTO CATANESI, *Malattia mentale e giustizia penale*, 8°, p. VIII-168.
- FRANCESCO FILAURO - FRANCESCA CANALE - ARTURO MONTOLIVO, *Appunti di semeiotica per l'accertamento medico legale dei postumi permanenti*, seconda edizione, 8°, p. XXII-202.
- La responsabilità medica in ambito civile. Attualità e prospettive*, a cura di VITTORIO FINESCHI, 8°, p. XII-704.
- Diagnosi psichiatrica e DSM-III-R*, a cura di L. DELL'OSSO e A. LOMI, 8°, p. XII-216.
- DALILA RANALLETTA, *La prova della paternità mediante il calcolo biostatistico*, 8°, p. XVI-252.
- La medicina legale ed il nuovo codice di procedura penale*, a cura di F. DE FAZIO e G. BEDUSCHI, 8°, p. XVI-724.
- La valutazione del danno alla persona da invalidità permanente*, a cura di M. CANALE e A. GIANELLI CASTIGLIONE, 8°, p. IV-608.
- ANNA COLUCCIA, *Norma giuridica e tossicodipendenza in Francia*, 8°, p. XII-212.
- GIUSTO GIUSTI - MAURO BACCI, *Patologia del detenuto e compatibilità carceraria*, 8°, p. VIII-140.
- MAURO BARNI, *Il rapporto di causalità materiale in medicina legale*, seconda edizione, 8°, p. XII-146.

- CARLO LEGA, *Manuale di bioetica e deontologia medica*, 8°, p. XII-596.
- MICHELE LEONI - MARCO MARCHETTI - GIUSEPPE FATIGANTE, *L'imputabilità del tossicodipendente*, 8°, p. XVIII-404.
- FRANCESCO CARRIERI - ORONZO GRECO - ROBERTO CATANESI, *La vecchiaia. Aspetti criminologici e psichiatrico forensi*, 8°, p. XVI-468.
- ANDREA MARZI, *Deontologia e psichiatria*, 8°, p. XII-248.
- NATALE MARIO DI LUCA, *L'infortunio nell'assicurazione privata. Profili medico-legali*, 8°, p. VIII-250.
- NICOLÒ DE TRIZIO - LUISA TORNOTTI, *Guida alla valutazione medico-legale delle malattie vascolari*. Metodologia diagnostica e stima del danno, 8°, p. XII-212.
- ALESSANDRO DELL'ERBA - VITTORIO FINESCHI, *La tutela della salute. Compatibilità economiche e garanzie sociali*, 8°, p. XIV-150.
- La tutela giuridica del sofferente psichico*. Stato attuale e prospettive di riforma, a cura di TULLIO BANDINI, MARCO LAGAZZI e ALFREDO VERDE, 8°, p. XIV-540.
- La criminalità organizzata*. Moderne metodologie di ricerca e nuove ipotesi esplicative, a cura di TULLIO BANDINI, MARCO LAGAZZI e MARIA IDA MARUGO, 8°, p. XII-190.
- MARCO LAGAZZI, *La consulenza tecnica in tema di affidamento del minore*. Il contributo del clinico alla tutela del minore nella vicenda giudiziaria della separazione e del divorzio, 8°, p. XIV-304.
- ANTONIO PERNA, *Neurochirurgia, neuro-traumatologia e medicina legale*. Profili di responsabilità professionale e stima del danno, 8°, p. XIV-160.
- Nuovi orizzonti della ricerca in medicina legale*, a cura di GIACOMO CANEPA, 8°, p. XII-364.
- ISABELLA MERZAGORA - RICCARDO ZOJA - FAUSTO GIGLI, *Vittime di omicidio*. Fattori di predisposizione alla vittimizzazione, caratteristiche delle vittime, scenari di omicidio a Milano, 8°, p. X-188.
- CARLO COLESANTI - LORENA LUNARDI, *Il maltrattamento del minore*. Aspetti medico-legali, giuridici e sociali, 8°, p. XVIII-404.
- BRUNO MAGLIONA, *Un percorso comune*. Sacralità e qualità della vita umana nella riflessione bioetica, 8°, p. XXIV-330.
- FRANCESCO INTRONA - ANNA COLAFIGLI - MARIO TANTALO, *Il codice di deontologia medica 1995*. Commentato con leggi e documenti, 8°, p. XVIII-500.
- Aspetti medico-legali e normativi dei prodotti dell'ingegneria dei tessuti*, a cura di LUIGI DONATI, ANTONIO FARNETI e MARIACHIARA TALLACCHINI, 8°, p. XII-280.
- MICHELE M. CORRERA - PIERPAOLO MARTUCCI - CARLO PUTIGNANO, *Valori, disvalori e crimine nell'Italia alle soglie del duemila*. La percezione sociale del concetto di reato: i risultati di una ricerca, 8°, p. XIV-224.

ISBN 88-14-10460-3

TUTTE LE COPIE DEVONO RECARE IL CONTRASSEGNO DELLA S.I.A.E.

© Copyright Dott. A. Giuffrè Editore, S.p.A. Milano - 2003

La traduzione, l'adattamento totale o parziale, la riproduzione con qualsiasi mezzo (compresi i microfilm, i film, le fotocopie), nonché la memorizzazione elettronica, sono riservati per tutti i Paesi.

Tipografia «MORI & C. S.p.A.» - 21100 VARESE - Via F. Guicciardini 66

PRESENTAZIONE

Questo volume raccoglie i contributi scientifici dei relatori e dei partecipanti al XIX Convegno Nazionale del Ge.F.I. (Genetisti Forensi Italiani), tenutosi a Ospedaletto di Pescantina (Verona), dal 14 al 16 Novembre 2002.

I recenti eventi criminosi, che dalle indagini criminalistiche ed in particolare genetiche per l'identificazione del profilo DNA hanno avuto utili riscontri per l'individuazione del responsabile, e la risonanza che tali indagini hanno avuto sui mass media suscitando interesse e curiosità anche nei non addetti ai lavori, impongono un costante aggiornamento delle potenzialità diagnostiche ed un loro adeguamento alle esigenze processuali.

L'incontro veronese ha assunto un particolare rilievo, quale momento necessario di incontro fra i vari studiosi per la validazione di nuovi protocolli operativi, l'analisi dei casi complessi e dubbi, l'interazione con gli utenti di queste analisi, in primis l'Autorità Giudiziaria, che riducano al minimo l'eventuale margine di errore, le cui conseguenze sul piano della responsabilità penale (e civile nel caso di accertamento della paternità) sarebbero a dir poco tragiche.

Va inoltre sottolineato come all'incontro abbiano partecipato, in veste di relatori, alcuni fra i maggiori esperti europei della disciplina che non hanno mancato di dimettere i loro contributi scritti, dei quali siamo onorati.

Gli argomenti trattati, al di là degli aspetti più squisitamente medico-biologici, hanno anche giustificato la presenza di numerosi operatori del Diritto (Magistrati, Avvocati, Forze di Polizia) nella veste di Relatori ed in quella di partecipanti, i cui interventi rappresentano doverosamente la parte introduttiva dell'opera.

Siamo convinti che lo sforzo di dare riscontro, per la prima volta nella storia del Ge.F.I., al Volume degli Atti, che inevitabilmente assume una veste altamente specialistica, abbia colmato un vuoto editoriale che la frequenza della odierna casistica giudiziaria non consentiva oltre di accettare.

L'auspicio è che in queste pagine gli operatori del Diritto possano trovare la risposta almeno ad alcuni dei loro dubbi e gli studiosi della Disciplina spunti per nuove e sempre più significative ricerche sempre pensate, come è nella natura della Medicina Legale e delle Scienze Forensi, nella prospettiva della reale applicazione giudiziaria.

Un doveroso pensiero va alla memoria del Prof. Amleto Loro, medico legale veronese per molti anni cattedratico di Medicina Legale nelle Università di Padova e di Trieste, il cui lascito, destinato a favorire e supportare l'attività di ricerca dei giovani cultori della materia, ha consentito, in questa occasione congressuale, l'istituzione di premi al merito ed ha significativamente contribuito alla stessa pubblicazione di questo Volume.

DOMENICO DE LEO

INDICE

	<i>pag.</i>
Presentazione di DOMENICO DE LEO.	VII
DOMENICO DE LEO, <i>Lo stato dell'arte in genetica forense: considerazioni introduttive</i>	1
Sessione Plenaria	
RELAZIONI	
ANGEL CARRACEDO, <i>DNA in Forensic Research: progress in standards, statistical evaluation and interpretation</i>	15
DRAGAN PRIMORAC, IVANA ERCEG, DAVORKA SUTLOVIĆ, ANTE IVKOŠIĆ, FRANE PAIĆ, VEDRANA ŠKARO, DAMIR PRIMORAC, BOJA REŽIĆ e ŠIMUN ANDELINOVIĆ, <i>DNA identification of skeletal remains discovered from mass graves</i>	23
STEPHEN LUPTON, <i>Complete forensic solutions from Promega Corporation</i>	33
ROSELLA PETRAROLI, <i>Ottimizzazioni e modifiche di protocolli validati per uso forense</i>	39
ADRIANO TAGLIABRACCI, FEDERICA ALESSANDRINI, MAURO PESARESI e ALESSIA ARSENI, <i>Low copy number (LCN) DNA profiling: interpretazione dei risultati ottenuti da microtracce</i>	45
LOREDANA BUSCEMI, SILVANO PRESCHIUTTINI e ADRIANO TAGLIABRACCI, <i>Esercizio collaborativo DNA mitocondriale del gruppo Ge.F.I. (Genetisti Forensi Italiani)</i>	59
PASQUALE D'ASCOLA, <i>Aggiornamento giurisprudenziale in tema di accertamento della paternità biologica</i>	75
LORENZO PICOTTI, <i>Trattamento dei dati genetici, violazioni della privacy e tutela dei diritti fondamentali nel processo penale</i>	93

Seconda Sessione

COMUNICAZIONI DI GIOVANI RICERCATORI PER L'ATTRIBUZIONE DEI DUE PREMI "DONAZIONE MIRIA CHERUBINI E AMLETO LORO"		pag.
C. COLALONGO, G. FERRI e S. PELOTTI, <i>Identificazione di tracce di sangue mestruale mediante reverse transcriptase-polymerase chain reaction del recettore α degli estrogeni (ER α)</i>		147
C. TURCHI, M. PESARESI e C. SASSAROLI, <i>Sviluppo di PCR multiple di SNPs autosomici in genetica forense</i>		153
F. ALESSANDRINI, V. ONOFRI e A. TAGLIABRACCI, <i>Sviluppo ed applicazioni forensi di nuove multiplex di polimorfismi diallelici del cromosoma Y</i>		163
L. BALDASSARRI, E. CARNEVALI, M. LANCIA e M. BACCI, <i>Su un caso di complessa interpretazione di numerose tracce miste</i>		175
A. BARBARO, P. CORMACI, A. BARBARO, E. INSIRELLO, A.M. ROCCAZZELLO e G. TRINGALI, <i>Validazione di kit forensi in casi particolari: analisi di DNA non umano</i>		181
C. BINI, S. CECCARDI e S. PELOTTI, <i>Tracce DNA: cosmetici come sorgente di profilo genetico</i>		191
G. FERRI, C. BINI e S. PELOTTI, <i>Amplificazione Y specifica al locus dell'amelogenina per la determinazione del sesso in campioni difficili</i>		199
T. FRACASSO, S. VERDIANI, L. CASARINO, M. DE ROBERTIS, C. BUCCELLI, M. CANALE e F. DE STEFANO, <i>Analisi del DNA nucleico e mitocondriale: identificazione individuale da resti scheletrici dopo prolungata sommersione</i>		207
D. PODINI, A. NUCCITELLI, N. VITALE, L. BARBETTA, S. MOSCATELLI e F. FIORENTINO, <i>Studio preliminare di 15 loci STR su di un campione di soggetti somali inserito in un programma internazionale di ricongiungimento familiare</i>		219
C. ROBINO, S. GINO, S. VERDIANI, F. DE STEFANO e C. TORRE, <i>Analisi di polimorfismi genetici STR in tracce biologiche rinvenute su substrati adesivi: applicazione pratica in un caso di identificazione criminale</i>		227
N. CERRI, S. MANZONI, e A. VERZELETTI, <i>Extracomunitari a Brescia: da differenze razziali a diversità geniche. Risultati della tipizzazione mediante Profiler Plus di un campione di soggetti residenti</i>		235

Terza Sessione

COMUNICAZIONI		pag.
E. CARRA e L. PELLEGRINO, <i>Biologia forense: non soltanto DNA! descrizione di un caso su reperti archeologici per identificarne il periodo di recupero dal fondale marino</i>		263
M. DOBOSZ, I. BOSCHI, A. CAGLIÀ, F. SCARNICCI, B. ARREDI e V.L. PASCALI, <i>Sistemi esperti probabilistici e loro applicazione a complessi casi di identificazione</i>		283
A. PICCININI, F. BETTI, M. CAPRA, C. CATTANEO e A. COMINO, <i>L'identificazione delle vittime del disastro aereo di Linate dell'8 ottobre 2001</i>		289
E. PONZANO, L. CAENAZZO e P. BENCIOLINI, <i>Una singolare problematica di segreto nell'ambito di due indagini sul rapporto di filiazione</i>		303
S. PROCACCANTI, L. MILONE, S. VERDIANI, A. MICELI e P. PROCACCANTI, <i>Esame dei polimorfismi del DNA su tessuto osseo: un caso di esclusione di paternità da cadavere esumato dopo 11 anni</i>		307
U. RICCI, G. DA VELA e M.G. BERTINO, <i>Osservazioni su un metodo analitico del laboratorio di chimica clinica per l'individuazione di attività amilase in tracce biologiche</i>		313
U. RICCI, I. SANI, N. CERRI, S. MASCADRI, F. DE FERRARI e M.L. GIOVANNUCCI UZIELLI, <i>Comparazione di un sistema di analisi automatico all'infrarosso con un sistema automatico all'ultravioletto per lo studio del legame di filiazione</i>		321
S. TURRINA, Z. DE BATTISTI, M. ORRICO, D. DE LEO, <i>La diagnosi generica di sangue umano su microtraccia: un retaggio del passato od una esigenza probatoria ancora attuale?</i>		333

DNA IDENTIFICATION OF SKELETAL REMAINS DISCOVERED FROM MASS GRAVES

di DRAGAN PRIMORAC (*), IVANA ERCEG, DAVORKA SUTLOVIĆ, ANTE IVKOŠIĆ,
FRANE PAIĆ, VEDRANA ŠKARO, DAMIR PRIMORAC, BOJA REŽIĆ e ŠIMUN
ANDELINOVIĆ

Introduction.

Since 1991, when war against Croatia started, an enormous efforts of all involved have been done to identify human remains found in more than hundreds mass graves. This brief report describes our work on the identification of the postmortem remains by DNA technology [1-4].

Teeth and bones have been shown to be a valuable source of DNA evidence. Dental enamel, the hardest substance in the human body, protects the DNA rich pulp and dentin and therefore ensures a good quality of isolated DNA. The problems that we usually faced while working with DNA extracted from different samples were either DNA degradation or DNA contamination. High temperatures, salt, water or soil conditions can damage genomic DNA and therefore make the identification process extremely difficult. A variety of methods have been used in our laboratory in an effort to improve identification methods. Ampf/STR Profiler™ Kit, Ampf/STR Profiler Plus™ Kit, Ampf/STR COfiler™ Kit, PowerPlex™ 16 system, AmpFLSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit and Y-PLEX™5 Kit have shown to be sensitive multiplex STR am-

(*). Dragan Primorac, M.D., Ph.D., Laboratory for Clinical and Forensic Genetics, Split University Hospital, Spinciceva 1, 21 000 Split, Croatia, e-mail: dragan.primorac@st.tel.hr

plification systems, which can be successfully used to obtain a multilocus STR profile from old teeth and bone samples with minimal amounts (pg) of human DNA or even with no detectable human DNA. However, in a certain number of cases where genomic DNA was extremely degraded analysis of mitochondrial DNA (mt DNA) was performed. During the last two years we have analyzed more than 300 skeletal remain samples with successful amplification rate of over 86%.

Materials and methods.

Extraction of DNA

Phenol chloroform extraction [5]. — Bones have to be cleaned from soft tissue residues and eventual soil traces. Surface of the bone is brushed with warm water and mild detergent. Samples of the bone are rinsed with distilled water and left to air-dry. The external surface is removed by linear 2-3 mm deep sawing. Sawing time has to be limited up to 3 seconds because longer contact with the bone can cause heating resulting in rapid DNA damage. Inner surface of the bone has to be clean and free of spongy bone. Each bone fragment approximately weights 2-3 grams. Fragments are washed with 5% commercial bleach for 10 s, 3 times in distilled water for 50-60 s, 2 times in the 80% ethanol and allowed to air dry in the laminar hood. Bone is pulverized into fine powder with mill. Extraction buffer (3ml) and Proteinase K (100µl, 20 mg/ml) are added to bone powder and incubated overnight at 56°C. Sample is thoroughly mixed and extracted with 3ml of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) at least twice. Completely clear upper aqueous layer is extracted with 3ml of n-butanol. Lower aqueous layer is transferred to the corresponding Centricon-100 concentrators and washed twice with TE buffer.

Sometimes isolated DNA fails to amplify and then we can try to do NaOH repurification procedure [6]. The mechanism

is not completely clear yet but probably denaturing conditions can release intercalated inhibitors and denaturing washes can allow their removal. It may be that alkaline conditions alone can inactivate inhibitors. Treatment with NaOH results in considerable loss of DNA so it's not suggested when quantity of DNA is limited. We can also use some standard inhibitor trouble-shooting strategies like heat soak, hot start, BSA, extra Taq, extensive solution and so on.

Modified IQ DNA extraction system [7]. — Extraction buffer (3-5ml) and Proteinase K (150µl, 20mg/ml) are added to pulverized bone (2-3g) and incubated 15 minutes at 56°C. After centrifugation lysis buffer with 15µl of Resin is added to clear supernatant and incubated 10 minutes at room temperature. Resin will separate from liquid phase after placing tube on magnetic stand. Resin has to be washed 3 times with wash buffer. After last washing step it has to air-dry on magnetic stand for 10-15 minutes. TE buffer or DNA free water is added to resin and after vortexing incubated at 65° C for 5 minutes. Afterwards it has to be placed on magnetic stand and we get clean DNA in water separated from resin that stays on the side of the tube.

Accomplishment of DNA identification done by genomic DNA analysis is approximately 80-85%.

DNA extraction from reference bloodstains. — Approximately 1 × 1 cm of bloodstain material was extracted using standard Chelex 100[®] protocols. The final volume of each extract was ~200 µL. 2 µL of each extract was used for duplex PCR amplification.

DNA quantitation

AluQuant Human DNA Quantitation System. — Aluquant is new human-specific DNA quantitation system. It allows measurement of DNA through the use of probes with

highly repeated sequences specific for human chromosomal DNA without amplification of the target DNA. It doesn't use gel electrophoresis or blotting steps. Quantitation is provided by series of reactions. After DNA has been denatured, samples go through coupled enzymatic reactions (polymerase and kinase with human-specific probe) that produce ATP relative to the amount of human DNA present. ATP in the second incubation is used by luciferase to produce a proportional and measurable amount of light. The quantity of DNA is then calculated through comparison of the light signal to standards of known DNA quantity.

Genomic DNA amplification and typing

There are several STR systems in our laboratory today: AmpFLSTR[®]Profiler[™] PCR Amplification Kit, AmpFLSTR[®]Profiler Plus[™] PCR Amplification Kit, AmpFLSTR[®]COfiler[™] PCR Amplification Kit, PowerPlex[™]16 System, AmpFLSTR[®]Identifiler[™] PCR Amplification Kit and Y-PLEX[™]5 Kit. Typing of PCR products is performed on ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

HVI/HVII duplex PCR amplification [8, 9]

PCR reactions were performed in 60 µL volumes using 1X AmpliTaq DNA Polymerase Buffer (12 mM Tris-HCl, pH 8.3, 60 mM KCl) with 2.4 mM MgCl₂ final concentration (PE Biosystems, Foster City, CA), 200 µM each dNTP, 0.2 µM each primer and 0.25 units/µL AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase (PE Biosystems). A group of 18 bone sample extracts plus negative and positive controls were prepared and amplified. A separate set of 4 potential maternal reference samples was prepared in a different PCR setup hood and after the bone sample setup to avoid cross-con-

tamination. All reactions were performed in a PE Biosystems 9600 model thermal-cycler using a 12-minute activation step at 92°C. Samples were subjected to 38 cycles at 92°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by a final 72°C extension step for 10 minutes. Sequences for the biotinylated HVI and HVII primers are as follows: HVI: F15975 5'-XCTCCACCATTAGCACCCAA-3' and R16418 5'-XATTTACGGAGGATGGTG-3'; HVII F15 5'-XCACCCTATTAACCACTCACG-3' and R429 5'-XCTGTAAAAGTGCATACCGCCA-3' (where X denotes biotinylation). PCR products were analyzed on 1.5% agarose gels in 1X TBE stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide. Products were used directly for SSO typing and then purified with Millipore Ultrafree-MC[®] centrifugal filter devices (Bedford, MA) to eliminate excess primer prior to sequence analysis. For filtration, 25 — 40 µL of PCR product was added to 350 µL of TE, pH 8.0, and centrifuged for 4 minutes at 12,000 rpm. 20 µL of TE was added to the membrane and the recovery was transferred to a clean microcentrifuge tube for cycle sequencing.

Immobilized SSO probe strip typing

PCR product yield was compared to a low DNA mass ladder (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and roughly 20-150 ng was used for immobilized SSO probe typing. The typing protocol follows similar conditions as the AmpliType[®] PM/PM+DQA1 protocol (PE Biosystems) with these modifications (20):

- 1) PCR product is prepared for hybridization by mixing 1:1 with AmpliCor[™] denaturant solution (1.6% NaOH) (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ) and incubated at room temperature for 5 minutes.

- 2) The assay is performed at 55°C ± 1°C.

- 3) Wash solution consists of 2X SSPE, 0.5% SDS.

4) 8 μ L of enzyme conjugate (HRP-SA) (*PE Biosystems*) is added per strip.

5) 4 μ L of 3% hydrogen peroxide per strip is added to the color development solution.

6) The volume of all typing solutions is 3 mL.

Results.

The results of our study indicate the following:

1. The success of amplification of DNA extracted from skeletal remains depends on:

a) DNA extraction methods (modified PK extraction procedure is highly recommended as well as modified DNA IQ procedure);

b) DNA degradation level (length of time since death, location of mass graves, sample storage procedures, high temperatures, salt, water or soil conditions (heavy metals, acids, bacteria);

c) The type of skeletal remain analyzed (teeth, long bones, ribs, skull) and the sample storage procedures;

d) The percentage of enzyme inhibitors per reaction (adding more Taq, reducing the amount of input DNA (effectively diluting the inhibitor) or adding the chemically inert protein BSA, and/or NaOH treatment);

2) When we compared our previous work when we used DQA1 + PM amplification kit as well as AmpFLP D1S80 PCR Amplification Kit (by that method only 25 % of mass graves victims that failed to be identify by standard forensic methods were identified) with STR analysis it became obvious that STR analysis is the method of the choice.

3) After modification of the standard DNA extraction procedure, after attempts to do re-purification of extracted DNA (with NaOH) and after introducing a new STR Systems such as AmpFLSTR[®] Identifier[™] PCR Amplification

Kit and Ampf/STR Profiler Plus[™] Kit the percentage of identification increased to 85%.

4) Amplification products showed stronger amplification with the smaller size STR products.

5) Most of the bone samples amplified at concentration of approx. 0.6-5 ng

6) Teeth samples gave us 20-30% enhanced results when compared with results obtained from the long bones. However, DNA extracted from the teeth amplified better if extracted from the lower half of tooth (including the root of the tooth) rather than from the crown compartment.

7) Analysis of mtDNA was necessary in approx. 10 % of all cases.

Discussion.

Identification process usually includes several techniques like detection of the remains by the living person who knew the deceased, matching the fingerprints, dentition and DNA analysis. In numerous cases due to the state of the remains (mass graves after war, long time period between death and DNA testing, body decomposition), high temperatures, salt, water or soil and other environmental conditions, genomic DNA can be damaged and make identification process extremely difficult. In those cases teeth and bones are valuable source of DNA evidence. Quality of the DNA extracted from teeth is generally higher than quality of DNA extracted from bones because of dental enamel, which is hardest substance in the body, and it protects the DNA rich pulp. Furthermore quality of DNA obtained from long bones is higher than DNA from skulls or ribs. Different methods have been used in our laboratory to overwhelm problems of DNA degradation or DNA contamination that we handle when we work with DNA samples from skeletal remains. Common protocols for DNA isolation that we use are phe-

nol-chloroform extraction and lately new method of IQ DNA extraction system based on use of silica magnetic particles.

Almost important as DNA quality is accurate DNA quantity. For PCR optimization is necessary to have exact amount of DNA. We started to use new AluQuant Human DNA Quantitation System, which is human-specific DNA quantitation system. It allows measurement of DNA through the use of probes with highly repeated sequences specific for human chromosomal DNA without amplification of the target DNA. Frequently, old teeth and bone samples have minimal amounts (pg) of human DNA or no detectable at all. The three main types of DNA testing employed by our DNA testing facilities involve STR analysis from common forensic loci of the CODIS 13 and ENFSI to match a person to his/her parents or children. Y chromosome analysis is often used to provide additional discrimination and to link a father to his son. Mitochondrial DNA is employed for use linking individuals amongst the maternal lineage and also provides additional discrimination to supplement STR and Y chromosome analysis. MtDNA analysis is particularly useful when is genomic DNA very degraded. A several Croatian population databases have been created to be used for forensic analysis to estimate the frequency of a multiple locus DNA profile [10-12].

For identification purposes, we made database with more than 3000 profiles and genotype from each skeletal remain is compared to all genotypes in the database to obtain a positive identity of missing person [13, 14].

Literature.

- [1] GUNBY P., *Medical Team Seeks to Identify Human remains From Mass Graves of War in Former Yugoslavia*, JAMA 1994; 272:1804-1806.
- [2] MARSHALL E., *Tracing Croatia's disappeared*, Science 1995; 269:1812.

- [3] ANDELINOVIC S., GOJANOVIC D.M., DRMIC I., GALIC M., IVANOVIC J., REZIC B., TONKOVIC M., PRIMORAC D., *DNA Technology in Identification of War Victims in Croatia*, Croatian Med. J. 1994; 35:123.
- [4] PRIMORAC D., ANDELINOVIC S., DEFINIS-GOJANOVIC M., DRMIC I., REZIC B., BADEN M.M., KENNEDY M.A., SKAKEL S.B., LEE H.C., *Identification of war victims from mass graves in Croatia and Bosnia and Herzegovina through the use of DNA Typing and standards forensic methods*, in J Forensic Sci 1996; 41:891-894.
- [5] ALONSO A., ANDELINOVIC S., MARTIN P., SUTLOVIC D., ERCEG I., HUF-FINE E., DE SIMON L.F., ALBARRAN C., DEFINIS-GOJANOVIC M., FERNANDEZ-RODRIGEZ A., GARCIA P., DRMIC I., REZIC B., KURET S., SANCHO M., PRIMORAC D., *DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples*, in Croat Med J., 2001; 42::260-6.
- [6] BOURKE M.T., SCHERCZINGER C.A., LADD C., LEE H.C., *NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase*, in Journal of Forensic Sciences, 1999; 44(5):1046-1050.
- [7] Genetic Identity: Bone extraction protocol to be used with DNA IQTM System. <http://www.promega.com/techserv/apps/hmnd/referenceinformation/BoneProtocol.htm>
- [8] GABRIEL N.M., CALLOWAY D.C., REBECCA L.R., PRIMORAC D., *Identification of human remains by immobilized sequence-specific oligonucleotide probe analysis of mtDNA hypervariable regions I and II*, in Croatian Medical Journal (In press).
- [9] GABRIEL M.N., CALLOWAY C.D., REYNOLDS R.L., ANDELINOVIC S., PRIMORAC D., *Population variation of human mitochondrial DNA hypervariable regions I and II in 105 Croatian individuals demonstrated by immobilized sequence-specific oligonucleotide probe analysis*, in Croat Med J., 2001; 42:328-35.
- [10] KEYS K.M., BUDOWLE B., ANDELINOVIC S., DEFINIS-GOJANOVIC M., DRMIC I., MARCIKIC M. and PRIMORAC D., *Northern and Southern Croatian Population Data on Seven PCR-Based Loci*, in Forensic Sci International 1996; 81:191-199.
- [11] DRMIC I., SCHANFIELD S.M., ANDELINOVIC S., GALAVOTTI R., PRIMORAC D. and PIGNATTI, P.F., *Allele and Genotype Frequencies of six DNA Polymorphisms in the Croatian Population*, Human Biology 1998; 70:949-957.
- [12] SCHANFIELD M., ANDELINOVIC S., GABRIEL M., REYNOLDS R., LADD C., LEE H., PRIMORAC D., *Croatian Population Data on 13 PCR-Based Loci (CODIS database)*, in Journal of Forensic Sciences 2002; 47(3):669-70.
- [13] PRIMORAC D., SCHANFIELD S.M., PRIMORAC D., *Application of Forensic DNA in the legal system*, in Croatian Medical Journal 2000; 41:33-47.
- [14] GORNIK I., MARCIKIC M., KUBAT M., PRIMORAC D., LAUC G., *Nine STR loci might not always be enough for reliable identification by reverse paternity determination*, in Int J Leg Med..

Acknowledgments.

We would like to thank Croatian Government, ICMP, Promega Corporation, Applied-Biosystems, and Roche Molecular Systems for supporting our work.

D. DE LEO (Verona, 1953), Professore Associato confermato in Medicina Legale presso l'Università degli Studi di Verona. Attualmente incaricato dell'insegnamento di Medicina Legale e Deontologia Professionale nel Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria nonché dell'insegnamento di Medicina Legale e delle Assicurazioni nel Corso di Laurea in Giurisprudenza.

Incaricato di numerosi insegnamenti della materia nelle Scuole di specializzazione e nei corsi di laurea delle professioni sanitarie.

È autore di 90 pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali concernenti i settori della Genetica Forense, della Responsabilità Professionale Medica e della Medicina Legale Generale.

Ha curato 9 capitoli di Volumi monografici.

È autore inoltre di una monografia sul tema della Odontologia Forense e curatore, nonché coautore, di una monografia sul tema della Responsabilità Professionale in Odontoiatria. Ha inoltre curato la traduzione di due capitoli del Trattato di Medicina Forense del Tedeschi-Eckert.

A questo vanno aggiunte 20 lectures e comunicazioni a Congressi nazionali ed internazionali di cui è disponibile l'abstract o il testo per esteso.

S. TURRINA (Valeggio sul Mincio, Verona, 1963), Dottore in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in Scienze Tossicologiche Forensi.

Attualmente collabora alla conduzione del Laboratorio di Genetica Forense dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università degli Studi di Verona, impegnata sia nell'attività peritale ordinaria che nella pianificazione dell'attività di ricerca nell'ambito di un contratto di Collaborazione Coordinata e Continuata stipulato con il Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Verona. È autore di 28 pubblicazioni in genetica ed in tossicologia forense su riviste nazionali ed internazionali di grande prestigio.

MEDICINA LEGALE CRIMINOLOGIA E DEONTOLOGIA MEDICA

Collana diretta da GIACOMO CANEPA - ANGELO FIORI
TULLIO BANDINI - ANTONIO FARNETI

La Medicina Legale studia la personalità umana, nelle sue varie espressioni e manifestazioni, in rapporto con il diritto e con l'ordinamento giuridico-sociale. È questo l'*oggetto* dell'attività medico-legale, che si realizza per mezzo di *metodologie* che sono proprie della ricerca clinica, anatomo-patologica, laboratoristica, statistica e sociologica.

Tale attività si svolge sia nel campo peritale, al fine di rispondere alle esigenze poste dal funzionamento del vigente sistema di giustizia (penale, civile, previdenziale), sia nel campo della ricerca — fondamentale ed applicata — al fine di modificare le norme giuridiche ed il sistema operativo per adeguarli al progresso scientifico.

È dunque perseguita una duplice *finalità*: medico-forense, per contribuire all'applicazione della normativa in vigore; medico-giuridica, allo scopo di trasformare tale normativa e renderla più aderente alle esigenze della realtà umana e sociale.

L'attività del medico legale, che ha per principali interlocutori il legislatore e gli operatori del diritto, si sviluppa principalmente nel campo della ricerca applicativa, ma anche in quello della elaborazione dottrinale dei dati che da tale ricerca emergono, secondo le prospettive di una sintesi interdisciplinare che è propria della scienza medico-legale fin dalle sue origini.

Il titolo della collana abbraccia anche due discipline affini, la *criminologia* e la *deontologia medica*, autonome ma strettamente collegate ai problemi medico-legali, volendo in tal modo offrire ai lettori il più ampio panorama della materia mediante contributi aggiornati, basati su dati di osservazione e su criteri di valutazione critica.

GIACOMO CANEPA (Genova, 1922), professore emerito di Medicina Legale dell'Università degli Studi di Genova. Dirige il Centro Internazionale di Criminologia Clinica dalla fondazione. È Presidente onorario della Società Italiana di Criminologia. Dottore "honoris causa" alla 1^a Università di Lione (1990).

ANGELO FIORI (Valdagno, 1927), già professore ordinario di Medicina Legale nell'Università Cattolica del S. C. è attualmente docente della stessa materia presso la Facoltà Campus Biomedico e la Facoltà di Giurisprudenza dell'Università LUMSA di Roma, e v. presidente del Comitato Nazionale per Bioetica.

TULLIO BANDINI (Genova, 1938), criminologo e medico legale, è professore ordinario di Psicopatologia forense, dirige la Scuola di Specializzazione in Psicologia clinica e il Corso di Perfezionamento in Psicologia forense presso l'Università degli Studi di Genova. Coordina un Dottorato di ricerca Internazionale in Criminologia Clinica. È direttore della Rassegna Italiana di Criminologia. Da anni è componente esperto del Tribunale di

D. DE LEO (Verona, 1953), Professore Associato confermato in Medicina Legale presso l'Università degli Studi di Verona. Attualmente incaricato dell'insegnamento di Medicina Legale e Deontologia Professionale nel Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria nonché dell'insegnamento di Medicina Legale e delle Assicurazioni nel Corso di Laurea in Giurisprudenza.

Incaricato di numerosi insegnamenti della materia nelle Scuole di specializzazione e nei corsi di laurea delle professioni sanitarie.

È autore di 90 pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali concernenti i settori della Genetica Forense, della Responsabilità Professionale Medica e della Medicina Legale Generale.

Ha curato 9 capitoli di Volumi monografici.

È autore inoltre di una monografia sul tema della Odontologia Forense e curatore, nonché coautore, di una monografia sul tema della Responsabilità Professionale in Odontoiatria. Ha inoltre curato la traduzione di due capitoli del Trattato di Medicina Forense del Tedeschi-Eckert.

A questo vanno aggiunte 20 lecturas e comunicazioni a Congressi nazionali ed internazionali di cui è disponibile l'abstract o il testo per esteso.

S. TURRINA (Valeggio sul Mincio, Verona, 1963), Dottore in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in Scienze Tossicologiche Forensi.

Attualmente collabora alla conduzione del Laboratorio di Genetica Forense dell'Istituto di Medicina Legale dell'Università degli Studi di Verona, impegnata sia nell'attività peritale ordinaria che nella pianificazione dell'attività di ricerca nell'ambito di un contratto di Collaborazione Coordinata e Continuata stipulato con il Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Verona. È autore di 28 pubblicazioni in genetica ed in tossicologia forense su riviste nazionali ed internazionali di grande prestigio.

M. ORRICO (Verona, 1975), Dottore in Medicina e Chirurgia, Specializzando in Medicina Legale e delle Assicurazioni. Socio della Società Italiana di Medicina Legale.

MEDICINA LEGALE CRIMINOLOGIA E DEONTOLOGIA MEDICA

Collana diretta da GIACOMO CANEPA - ANGELO FIORI
TULLIO BANDINI - ANTONIO FARNETI

La Medicina Legale studia la personalità umana, nelle sue varie espressioni e manifestazioni, in rapporto con il diritto e con l'ordinamento giuridico-sociale. È questo l'oggetto dell'attività medico-legale, che si realizza per mezzo di metodologie che sono proprie della ricerca clinica, anatomo-patologica, laboratoristica, statistica e sociologica.

Tale attività si svolge sia nel campo peritale, al fine di rispondere alle esigenze poste dal funzionamento del vigente sistema di giustizia (penale, civile, previdenziale), sia nel campo della ricerca — fondamentale ed applicata — al fine di modificare le norme giuridiche ed il sistema operativo per adeguarli al progresso scientifico.

È dunque perseguita una duplice finalità: medico-forense, per contribuire all'applicazione della normativa in vigore; medico-giuridica, allo scopo di trasformare tale normativa e renderla più aderente alle esigenze della realtà umana e sociale.

L'attività del medico legale, che ha per principali interlocutori il legislatore e gli operatori del diritto, si sviluppa principalmente nel campo della ricerca applicativa, ma anche in quello della elaborazione dottrinale dei dati che da tale ricerca emergono, secondo le prospettive di una sintesi interdisciplinare che è propria della scienza medico-legale fin dalle sue origini.

Il titolo della collana abbraccia anche due discipline affini, la *criminologia* e la *deontologia medica*, autonome ma strettamente collegate ai problemi medico-legali, volendo in tal modo offrire ai lettori il più ampio panorama della materia mediante contributi aggiornati, basati su dati di osservazione e su criteri di valutazione critica.

GIACOMO CANEPA (Genova, 1922), professore emerito di Medicina Legale dell'Università degli Studi di Genova. Dirige il Centro Internazionale di Criminologia Clinica dalla fondazione. È Presidente onorario della Società Italiana di Criminologia. Dottore "honoris causa" alla l'Università di Lione (1990).

ANGELO FIORI (Valdagno, 1927), già professore ordinario di Medicina Legale nell'Università Cattolica del S. C. è attualmente docente della stessa materia presso la Facoltà Campus Biomedico e la Facoltà di Giurisprudenza dell'Università LUMSA di Roma, e v. presidente del Comitato Nazionale per Bioetica.

TULLIO BANDINI (Genova, 1938), criminologo e medico legale, è professore ordinario di Psicopatologia forense, dirige la Scuola di Specializzazione in Psicologia clinica e il Corso di Perfezionamento in Psicologia forense presso l'Università degli Studi di Genova. Coordina un Dottorato di ricerca Internazionale in Criminologia Clinica. È direttore della Rassegna Italiana di Criminologia. Da anni è componente esperto del Tribunale di Sorveglianza di Genova.

ANTONIO FARNETI (Bologna, 1936), professore ordinario di Medicina Legale nell'Università degli Studi di Milano, incaricato della stessa materia presso la Facoltà di Medicina Università Vita e Salute Ospedale San Raffaele Milano, Presidente della Società Lombarda di Medicina Legale e delle Assicurazioni.

€ 25,00
L. 48.407 I.V.A. inclusa
1508-70

ISBN 88-14-10460-3



9 788814 104602