Accertamenti di paternità mediante esame del DNA

Data 30 luglio 2002
Categoria medicina_legale

A causa della notevole pubblicità che è stata data recentemente ai problemi di filiazione e di fecondazione, un nuovo impulso è nato circa l'accertamento dei rapporti parentali, gravidi di importanti conseguenze dal punto di vista legale, finanziario, ereditario.
I progressi scientifici hanno fatto sì che i test di accertamento di paternità siano rmai alla portata di quasi tutti i laboratori di analisi, i quali offrono questo servizio come una comune analisi ematologica. In realtà l'esame di accertamento di paternità è particolarmente complesso e necessita di competenze particolari.

In cosa consiste l'esame?

Si tratta, fondamentalmente, di un esame del sangue che tende ad accertare, mediante il confronto di marcatori geneticamente trasmessi, di un rapporto parentale (generalmente padre-figlio) tra due soggetti. Inizialmente (si parla degli anni '20) gli unici marcatori conosciuti erano quelli del sitema ABO. A questo si aggiunse il sistema MNSs e, negli anni '40 il sistema RH. Questi marcatori, esprimendo solo una manifestazione fenotipica avevano però una capacità discriminatoria piuttosto modesta e offrivano risultati sovente ambigui e di difficile interpretazione.
Venne introdotto poi il sistema HLA, legato agli antigeni leucocitari, dotato di elevato potere discriminatorio e, alla fine degli anni '90, l'esame diretto del DNA.
Tale esame non consiste, come credono i profani, nell'analizzare un frammento qualsiasi di DNA: la parte più complicata è consistita invece proprio nell'individuazione di quelle parti del cromosoma che, essendo variabili da individuo a individuo, fornissero un assetto tipico per ciarcuna persona, analogo a quanto si rileva nell'esame delle impronte digitali (DNA fingerprint).
La prima applicazione pratica in un test di paternità giudiziario risale al 1985 in Inghilterra; da allora molti passi sono stati compiuti, con la scoperta di loci genetici sempre più discriminativi ("minisatelliti" e "microsatelliti") e con la scoperta di nuove tecniche analitiche. È stata fondamentale la scoperta di Kary B. Mullis della reazione di DNA-Polimerasi (PCR) che consente di ottenere una elevata quantità di materiale genetico da quantità scarse di DNA.
Le tecniche attuali, basate su confronto delle bande elettroforetiche del materiale ottenuto con tale tecnica, si è definitivamente affermata anche perchè evita alcuni problemi propri delle tecniche precedenti, come l'impiego di sostanze radioattive, i lunghi tempi di attesa e le possibili difficoltà interpretative. Mentre i primi esami di paternità si basavano su un esame di 4-5 marcatori al massimo, adesso è normale effettuarne 10-12 o 15. L'elevato numero di marcatori e la loro distribuzione su diversi loci cromosomici garantiscono l'affidabilità del risultato evitando errori che possono essere conseguenti a mutazioni o a delezioni cromosomiche. Attualmente sono in commercio dei kit che consentono l'analisi di gruppi precostituiti di marcatori.

Quali sono le sue indicazioni principali?

Le indicazioni principali dell'esame del DNA sono due: l'identificazione personale da residui bilogici e l'identificazione del rapportoparentale.

Identificazionepersonale

Assume rilievo soprattutto in ambito penale. Consente l'identificazione dell'autore di un delitto da residui organici anche minimi. L'esame può essere effettuato su qualsiasi materiale che abbia una componente cellulare da cui estrarre il DNA: sangue, sperma, bulbi piliferi, saliva, sudore. Il DNA conteunto in tali materiali può degradarsi con diversa velocità, a seconda delle condizioni ambientali (grado di umidità, temperatura, inquinamento batterico ecc.) in un tempo che può essere di poche ore o di pochi giorni nei casi più sfavorevoli, può rimanere analizzabile anche per molti anni se conservato in ambiente adatto. È intuibile perciò come in certe evenienze (ad esempio nei casi di stupro) sia essenziale un tempestivo prelievo di tale materiale.
Il materiale biologico surgelato può essere conservato dal laboratoro per un numero indefinito di anni; a temperatura ambiente il materiale asciutto (per esempio una goccia di sangue raccolta su una carta asciugante) si conserva per periodi molto più lunghi che se mantenuto in forma liquida. In caso di analisi su cadavere si può ottenere materiale utile dall'esame del midollo osseo, più "riparato", anche dopo anni.

Accertamento parentale

È l'evenienza più comune, con la tendenza a diventare routinario in seguito alle attuali leggi che conferiscono ai figli naturali gli stessi diritti ereditari e di mantenimento dei figli legittimi. L'iter giudiziario prevede, attualmente, che l'esame emetologico costituisca tappa pressochè obbligata, e divisa in due parti: prima il "disconoscimento" (l'accertamento che il padre "ufficiale" non è quello biologico), poi il "riconoscimento" (l'identificazione del vero padre.
Oltre che per via giudiziaria le indagini di paternità possono essere chieste da privati per propria informazione e per valutazione preliminare anteriore alla causa in Tribunale. L'effettuazione dell' esame prevede il consenso di tutte le parti

interessate, che potrebbero però rifiutarsi. Non è infrequente, infatti, che la madre si rifiuti di fornire il proprio sangue e l'accertamento venga effettuato su due soli individui.
L'esame viene compiuto generalmente su materiale ematico raccolto in quantità di pochi cc. in provette con anticoagulante. Nel caso di bambini piccoli è possibile effettuare un prelievo di poche gocce di sangue su una carta asciugante, oppure un prelievo di saliva dalla mucosa buccale mediante tamponi sterili.

La valutazione dei risultati

Le possibilità di errore

Le analisi basate sulla tipizzazione del DNA sono attualmente altamente attndibili, tuttavia non possono essere considerate esenti da errori. Oltre a banali errori umani (scambio di campioni, cattiva conservazione dei reperti) esiste una serie di fattori interferenti di cui occorre sempre tener conto:

È possibile che alcuni alleli non vengano evidenziati durante indagini effettuate tramite PCR (cosiddetti "alleli silenti"). Questo fenomeno si verifica soprattutto nell'analisi di alcuni sistemi aventi una differenza sostanziale del peso molecolare tra i due alleli. Può allora verificarsi la mancata amplificazione dell'allele pesante con possibilità che ne conseguano erronee esclusioni di paternità. Sono però ben noti i sistemi che possono produrre tale fenomeno, per cui l'operatore esperto ne può tener conto, verificando con altri metodi.
Possono verificarsi mutazioni genetiche: È stato riscontrato che le mutazioni ricorrono nei microsatelliti con una frequenza media abbastanza elevata, di una mutazione ogni 1000-10000 meiosi. Può quindi essere lecito il dubbio, in caso che un solo marcatore risulti incompatibile, di un errore dovuto appunto ad una mutazione. Eccezionalmente anche le incompatibilità di due marcatori possono offrire il fianco a questa critica. In questi casi è posibile effettuare il controllo con altri marcatori, in numero adeguato, in modo da poter confermare la paternità biologica. In caso si riscontri un'unica incompatibilità, quindi, questa viene ad essere considerata come un fattore di diminuzione di probabilità piuttosto che come perentoria esclusione.
1) Incompatibilità genetica: non è padre biologico
Ogni figlio presenta, per ogni locus genetico esaminato, due alleli, dei quali uno sarà di provenienza materna e uno di provenienza paterna. Dato che sulla madre esistono raramente discussioni, vengono dapprima scorporati gli alleli di provenienza materna e viene poi verificata la compatibilità degli alleli rimasti con quelli di origine paterna. La presenza nel figlio di polimorfismi genetici incompatibili (secondo la legge di Mendel) con quelli del presunto padre può far escludere con certezza un rapporto di paternità.
È stato superato il problema dei vecchi marcatori basati sui polimorfismi enzimatici, allorchè le esclusioni non erano quasi mai perentorie ma andavano valutate anch'esse con criterio probabilistico. L'esame diretto del DNA invece permette una esclusione netta e sicura con poche probabilità di errore dovute agli inconvenienti sopradescritti, che però sono ben conosciuti dagli operatori del settore.

2) Compatibilità genetica. Valutazione delle probabilità
Qualora venga evidenziata la compatibilità di tutti i marcatori, o si sia verificata una "falsa" incompatibilità dovuta ai fattori sopradetti, occorre dare un peso statistico a questo risultato.
Sono stati studiati e raccolti in banche-dati gli indici statistici che indicano, in sostanza, la diffusione dei polimorfismi genetici nella popolazione generale. Questi dati servono per la base di calcoli successivi, abbastanza complessi.
Viene utilizzato di solito, nella pratica, il cosiddetto "indice di paternità" oppure il termine di "probabilità di paternità". Questa probabilità viene espressa generalmente, nella pratica corrente, in forma percentuale. Più alto è il numero di marcatori compatibili, più alta sarà tale probabilità.
La tecnica di calcolo, di tipo statistico esprimente un'approssimazione all'infinito, non permette mai di poter esprimere una probabilità del 100%, e questo residuo margine di incertezza può costituire fonte di frustrazione per gli interessati. Occorre tener presente che l'indice di probabilità, al di sopra di certi valori, viene ad essere praticamente equivalente ad una certezza, con un criterio analogo a quello usato nel caso delle impronte digitali, in quanto la probabilità contraria (se si eccettuano casi particolarissimi di popolazioni estremamente ristrette e con pool genetico molto condiviso) vengono essere così basse da non potersi ipotizzare una coincidenza.
Non esiste in Italia una norma precisa che stabilisca la soglia oltre la quale una probabilità di paternità sia da considerare equivalente a una "pratica certezza": si fa riferimento in genere alle legislazioni di altri paesi europei come la Germania (che ha stabilito un limite del 99,72%), o ai Paesi Bassi, i più severi, che hanno stabilito un limite del 99,90%.
Non è infrequente, con le tecniche odierne e con l'alta capacità discriminatoria degli alleli presi in esame, raggiungere probabilità anche più elevate del 99,99%.

Casiparticolari

È possibile esaminare un rapporto parentale anche in assenza della madre, con un confronto diretto tra padre e figlio. Questo impone ovviamente l'esame di un numero molto elevato di marcatori, ma consente spesso risultati molto soddisfacenti sia in termini di riconoscimento che di disconoscimento.

Qualora il genotipo di un componente della famiglia (la madre, ad esempio) non possa essere esaminato direttamente, esso può essere ricostruito, in alcuni casi, esaminando la cerchia parentale consanguinea e ricostruendo da questa il suo patrimonio genetico

Modalitàpratiche

Data la diffusione dei kit di analisi (che non richiedono più l'uso di strumentazione molto complessa) molti laboratori hanno introdotto tali indagini nella loro offerta al pubblico. È utile però che ci si rivolga a Centri che abbiano reale competenza in materia, in modo da poter valutare la possibilità di mutazioni, di alleli silenti o altre cause di errore. Generalmente tali centri sono ubicati presso Università, grandi ospedali, laboratori privati di alto livello. Solo pochi centri possono servirsi (per il costo elevato) di particolari apparecchi (come il sequenziatore) che facilitano le indagini minimizzando il rischio di errore interpretativo.
Il referto non deve contenere solo il giudizio "sintetico" di paternità o non-paternità ma deve riportare la costellazione di marcatori esaminati e la percentuale di probabilità calcolata.
L'analisi del DNA è molto costosa ed è effettuabile soltanto in regime privato: i prezzi apparivano, fino a pochi anni fa quasi proibitivi (parecchi milioni in lire attuali). Attualmente sono molto diminuiti ma la necessità di personale altamente specializzato e di apparecchi sofisticati li mantengono abbastanza elevati (due-tre milioni di lire).

Daniele Zamperini ("Occhio Clinico", n. 2, febbraio 2002)