

Un caso complesso di attribuzione di paternità'

Aldo Di Nunzio¹, Ciro Di Nunzio¹, Giovanna Maione¹, Fernanda Iafusco^{1,2}, Nadia Tinto^{1,2}

¹Laboratorio di Genetica Forense, Ceinge Biotechnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli

²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotechnologie Mediche, Università di Napoli Federico II

Questo contributo è stato in parte presentato al 54° Congresso nazionale SIBioC di Genova, 4-7 ottobre 2022, nella Sessione Casi Clinici

ABSTRACT

A complex case of paternity testing

The report describes a complex case of paternity identification managed at Forensic Genetic laboratory of CEINGE Advanced Biotechnology in Naples (Italy). A woman requested a paternity testing to know whether a man was the father of her child. Buccal swabs were used to obtain DNA specimens. The child's autosomal profile presented a mixed profile. After exclusion of possible sources of contamination, this scenario was compatible with a mother/son mixture. Actually, the child, affected by acute lymphoblastic leukemia, underwent to an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with his mother as donor a few years before. The PowerQuant® System highlighted a concentration autosomal/Y ratio of almost 2. In the absence of the recipient's autosomal profile prior the transplant, the known maternal profile and the mixed child profile were compared locus by locus. The pairs of mother-son alleles for each locus were identified applying the deconvolution rules of the two contributors in the mixture, where one of them is known. Hence, we chose the most probable pair, considering the profile mixture ratio woman/man of 1.8. According to the International Society for Forensic Genetics guidelines, the biostatistical interpretation was based on a likelihood ratio (LR) approach. Furthermore, LRmix and Familias 3 software were used to interpret the mixture and the kinship. This case highlights that we should bear in mind the possible occurrence of chimerism in reference material derived from buccal swabs, if a subject had an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In similar case, other specimens, like hair roots, should be used, provided that they are available.

Parole chiave: test di paternità, short tandem repeats, deconvoluzione

CASO CLINICO

Questo caso clinico descrive un'analisi di paternità complessa richiesta al Laboratorio di Genetica Forense del CEINGE Biotechnologie Avanzate "Franco Salvatore" di Napoli.

Una donna (M) ha richiesto un test di paternità per sapere se un uomo (F) fosse il padre di suo figlio (S). Il figlio, qualche anno prima, in quanto affetto da leucemia linfoblastica acuta, era stato sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (Allogeneic hematopoietic cell transplantation, allo-HCT) e il donatore era stata sua madre. Questo ha impedito l'estrapolazione del profilo genetico del figlio dal DNA estratto dalle cellule del sangue periferico, a causa della presenza in circolo di cellule di origine materna e quindi con un profilo genetico

diverso da quello originario del ricevente. Per tale motivo, sono state prelevate al figlio, le cellule della mucosa orale mediante un tampone buccale, da cui è stato estratto il DNA per l'analisi dei loci Short Tandem Repeats (STR) da utilizzare per il test di paternità.

Nonostante questa precauzione, i risultati ottenuti sul DNA estratto dalle cellule buccali del figlio (CS), hanno evidenziato la presenza di pattern tri-allelici in 13 loci STR autosomici. Escludendo possibili fonti di contaminazione, questo scenario era compatibile con una miscela di DNA madre/figlio anche nelle cellule della mucosa buccale.

Il kit QIAmp® DNA Investigator (Qiagen, Hilden, Germany) è stato utilizzato per isolare il DNA genomico, mentre la quantificazione è stata eseguita sia con fluorimetro Qubit 4 (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Stati Uniti) sia con sistema PCR real-time

Corrispondenza a: Aldo Di Nunzio, Laboratorio di Genetica Forense, Ceinge Biotechnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli, Email: 90aldo@gmail.com

Ricevuto: 31.03.2023

Revisionato: 29.05.2023

Accettato: 08.06.2023

Publicato on-line: 07.07.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.046

7500 (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Stati Uniti) utilizzando il kit PowerQuant® (Promega Corporation, Madison, WI, USA). I profili STR autosomici e del cromosoma Y sono stati ottenuti utilizzando i kit GlobalFLSTR™ e AmpFLSTR™Yfiler™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), mentre l'analisi dei frammenti è stata eseguita sull'analizzatore genetico 3500 (Applied Biosystems™). I profili genetici di padre, madre e figlio sono stati ottenuti con il software GenMapper v1.6, utilizzando i parametri ricavati da studi di validazione eseguiti nel nostro centro, di seguito riportati: Soglia Analitica 50 RFU (Relative Fluorescence Units), Soglia Stocastica 100 RFU, -1 Stutter Percentage Factor <15%, Heterozygous Peak Height Ratio >60%. L'analisi biostatistica della parentela (1) e l'analisi della miscela sono state effettuate, secondo le linee guida dell'International Society of Forensic Genetics (ISFG), attraverso un approccio Likelihood Ratio (LR), utilizzando rispettivamente i software Familias v3.2.8 e LRmix v 2.1.5 (2).

DISCUSSIONE

I marcatori STR-autosomici sono tra i sistemi più potenti per risolvere i casi di attribuzione di parentela e rappresentano anche uno dei metodi per il monitoraggio post-trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche. Il monitoraggio del cosiddetto chimerismo emopoietico, mediante analisi del profilo STR in cellule ottenute da sangue periferico o midollare del ricevente, può consentire di valutare l'attecchimento delle cellule trapiantate e di evidenziare una eventuale recidiva della malattia, facilitando l'intervento terapeutico. Tuttavia, è richiesto un alto livello di efficienza e di competenza da parte dei laboratori, che devono seguire linee guida e raccomandazioni internazionali per poter

valutare in maniera corretta il chimerismo (3-5).

Per la valutazione del chimerismo post-trapianto è indispensabile che il laboratorio analizzi preliminarmente i profili STR del donatore e del ricevente pre-trapianto. Tuttavia, a volte, può succedere che il profilo STR pre-trapianto del ricevente, non sia disponibile. In questi casi, l'unico modo per ottenerlo è affidarsi ad un'altra matrice biologica, come un tampone buccale.

Diversi studi riportano, però, la possibilità di trovare, in seguito al allo-HCT cellule epiteliali contenenti genoma derivato dal donatore. Esistono diversi meccanismi suggeriti che tentano di spiegare eventi chimerici epiteliali dopo l'allo-HCT, come la trans-differenziazione delle cellule ematopoietiche in cellule epiteliali, la generazione di cellule epiteliali da precursori epiteliali sconosciuti e/o cellule staminali universali nel trapianto e la fusione di cellule ematopoietiche del donatore con cellule epiteliali del ricevente. La produzione di cellule del donatore dal midollo osseo innestato è un processo continuo nel ricevente allo-trapiantato (6,7). Waterhouse et al. hanno proposto un meccanismo alternativo di chimerismo epiteliale dopo il trapianto allogenico di cellule ematopoietiche: il trasferimento orizzontale del DNA dal donatore alle cellule dell'ospite (8). Il loro modello suggerisce che, dopo l'allo-HCT, avviene un trasferimento e un'integrazione continui del materiale genomico apoptotico del donatore nell'epitelio dell'ospite, che si traduce nello sviluppo di cellule epiteliali che contengono il genoma derivato dal donatore.

Nel caso in esame, l'analisi del tampone buccale del figlio (CS), ha evidenziato un profilo genetico misto (Figura 1). Inoltre, la costellazione allelica e lo sbilanciamento del rapporto dell'altezza dei picchi hanno confermato l'ipotesi della miscela figlio/madre dovuta ai contributi del donatore e del ricevente. L'analisi di quantificazione in real-time e il rapporto di altezza dei

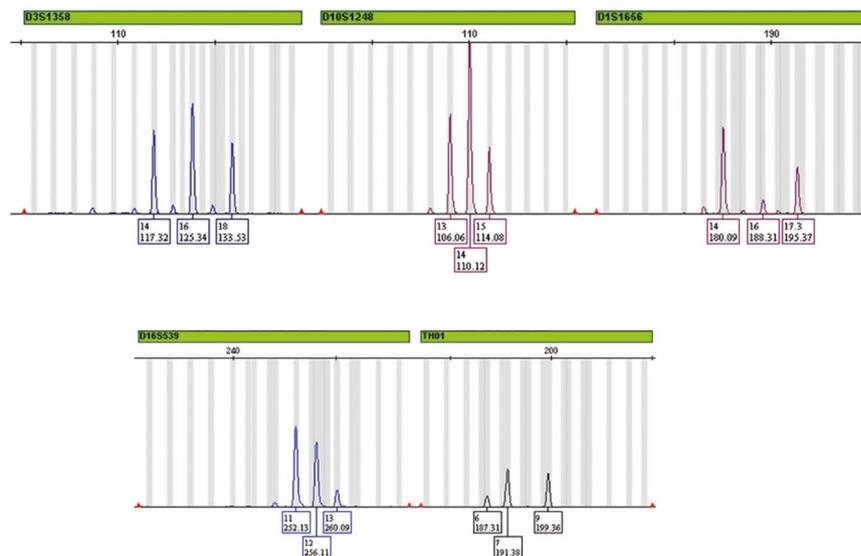


Figura 1
Analisi del tampone buccale del figlio (CS), che evidenzia un profilo genetico misto.

picchi del *locus* Amelogenina sui cromosomi X e Y dell'elettroferogramma, hanno consentito di stimare nella miscela un rapporto uomo/donna e quindi figlio/madre, pari a 1,8. Poiché il profilo autosomico STR pre-trapianto del ricevente (S) non era disponibile, è stato effettuato un confronto - *locus per locus* - tra il profilo materno (M) e quello misto originato dal figlio (CS) e, successivamente, sono state identificate le coppie di alleli madre-figlio, per ciascun *locus*, applicando le regole di deconvoluzione di due contributori dove uno dei due è noto (9). La deconvoluzione serve proprio per risolvere un profilo misto nelle sue componenti, consentendo così una chiara comprensione dei profili dei soggetti che lo compongono. Nel caso in esame, tale approccio si è reso necessario per poter confrontare, in maniera univoca e senza condizionamenti, il profilo STR del figlio con quello del presunto padre ai fini dell'indagine di paternità. In particolare, sulla base degli alleli osservati, abbiamo proceduto considerando tutte le possibili doppie coppie di alleli che potevano generarsi. Quindi, abbiamo eliminato le doppie coppie di alleli in cui il profilo materno non era rappresentato e valutato solo quelli con la presenza del profilo materno. Le doppie coppie di alleli che non hanno rispettato le direttive stocastiche in ciascuna coppia sono state cancellate. Infine, abbiamo identificato gli alleli del figlio, scegliendo, per ciascun *locus*, le coppie più probabili di alleli in base al rapporto di miscelazione uomo/donna di 1,8 stimato precedentemente (Tabella 1). L'interpretazione del profilo misto del figlio è stata successivamente valutata statisticamente dal software LRmix.

Una volta ottenuto il profilo STR originario del figlio (S) è stato possibile effettuare il confronto con quello del presunto padre (F) e analizzare statisticamente i risultati con il software Familias 3 che ha dimostrato che (F) era il padre di (S) con un LR di $4,89E+11$ e una probabilità di paternità del 99,9999999997953%.

Inoltre, come ulteriore prova, l'analisi dell'aplotipo STR sul cromosoma Y ha dimostrato l'appartenenza di (F) e (S) alla stessa linea parentale maschile, rafforzando la relazione di parentela tra i due soggetti. La frequenza dell'aplotipo Y sul sito web YHRD.org era $3.52E-5$.

Tabella 1

Profili genetici del presunto padre (F), della madre (M), del figlio chimerico (CS) e del figlio dopo analisi di deconvoluzione (S), in 5 dei 21 loci STR autosomici analizzati.

LOCUS	FIGLIO Chimerico (CS)	MADRE (M)	FIGLIO Deconvoluzione (S)	PRESUNTO PADRE (F)
D3S1358	14-16-18	14-18	16-18	16-16
D10S1248	13-14-15	13-14	14-15	15-16
D1S1656	14-16-17.3	16-17.3	14-17.3	14-15
D16S539	11-12-13	11-13	11-12	12-12
TH01	6-7-9	6-7	7-9	7-9

STR, *short tandem repeats*

Il caso descritto evidenzia che, sebbene i tamponi buccali rappresentino lo strumento più utilizzato per raccogliere il DNA nelle indagini forensi, dovremmo tenere presente la possibile presenza di chimerismo nel materiale di riferimento derivato da questi campioni, nel caso in cui un soggetto abbia subito un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. Pertanto, in casi simili, potrebbero essere utilizzati altri campioni, come le radici dei capelli, se disponibili.

Concludendo, i nostri risultati hanno mostrato l'importanza dell'analisi di deconvoluzione nella risoluzione di complessi studi di attribuzione di parentela paterna con profili madre/figlio chimerici. Tuttavia, hanno suggerito che è indispensabile aggiornare le conoscenze sull'interpretazione statistica di una miscela chimerica in cui il donatore è un parente, diverso dal genitore del ricevente, o un soggetto non imparentato. Tali studi mostrano, inoltre, la necessità di valutare scenari chimerici in cui i contributori sono in rapporti molto sbilanciati (maggiore di 3:1), poiché i profili genetici misti, allo stesso modo dei profili a singolo contributore, possono risentire di fenomeni degradativi e di fenomeni stocastici che possono influenzare, in maniera diversa, i diversi contributi genetici nel profilo misto (10).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

- Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, et al. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Forensic Sci Int* 1997;87:179-84.
- Gill P, Curran J, Neumann C, Kirkham A, Clayton T, Whitaker J, et al. Interpretation of complex DNA profiles using empirical models and a method to measure their robustness. *Forensic Sci Int Genet* 2008;2:91-103.
- Lion T, Watzinger F, Preuner S, Kreyenberg H, Tilanus M, de Weger R, et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2012; 26:1821-8.
- Clark JR, Scott SD, Jack AL, Lee H, Mason J, Carter GI, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *British Journal of Haematology* 2015;168:26-37.
- Elia L, Mazzi B, Margiotta M, Andreani M, Cervelli C, Papola F. Indicazioni Tecniche per lo studio del chimerismo post-trapianto di CSE (Cellule Staminali Ematopoietiche). Gruppo di Lavoro per il Chimerismo AIBT ver.1.1 https://aibt.it/media/uploads/files/Indicazioni_tecniche_per_lo_studio_del_chimerismo_post-trapianto_di_CSE._vers_1.1_-_2016_EFmfDOL.pdf (ultimo accesso: maggio 2023).
- Tran SD, Pillemer SR, Dutra A, Barrett AJ, Brownstein MJ, Key S, et al. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet* 2003;361:1084-8.

7. Berger B, Parson R, Clausen J, Berger C, Nachbaur D, Parson W. Chimerism in DNA of buccal swabs from recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantations: implications for forensic DNA testing. *Int J Legal Med* 2013;127:49-54.
8. Waterhouse M, Themeli M, Bertz H, Zoumbos N, Finke J, Spyridonidis A. Horizontal DNA Transfer from Donor to Host Cells as an Alternative Mechanism of Epithelial Chimerism after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:319-29.
9. Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int* 2006;160:90-101.
10. Genetisti Forensi Italiani GeFI, Raccomandazioni Ge.F.i. nelle indagini di identificazione personale, 2018, <https://www.gefi-isfg.org/index.php?idpagina=18>. (ultimo accesso: maggio 2023)