

CENNI SULLE TECNICHE DI SOPRALLUOGO E DI REPERTAZIONE

“Techniques of Crime Scene Investigation” di Barry Fischer (2003):



COSA FARE

- ✓ Limitare la scena del crimine (primaria e secondaria);
- ✓ Annotare ogni modificazione della scena dovuta ad interventi propri o di terzi;
- ✓ Evitare di introdurre contaminazione (diretta o indiretta) all'interno della scena;
- ✓ Registrare accuratamente la posizione degli oggetti prima di rimuoverli (attenzione: non tentare di rimettere gli oggetti nella posizione originaria);
- ✓ Fare attenzione a sé stessi come fonte di inquinamento delle prove.

COSA NON FARE

- ✓ Permettere o effettuare un accesso indiscriminato soprattutto senza verbalizzare;
- ✓ Modificare lo stato dei luoghi;
- ✓ Muoversi senza precauzioni (DPI e procedure di spostamento);
- ✓ Non documentare gli accessi;
- ✓ Confidare che altri annoteranno le condizioni originarie.

Si sottolinea l'importanza della figura del Coordinatore (*Crime Scene Manager*) con il compito di assicurare il corretto svolgimento delle operazioni di rilievo e di documentazione da parte dei vari componenti la squadra ed in grado di gestire la situazione emergenziale attraverso un corretto flusso di procedure prestabilite (*Crime Scene Management: scene specific methods*, R. Sutton Wile, ed. 2009).

- Determinante quindi delimitare un'area più esterna, intesa come perimetro di contenimento, cui si succedono, all'interno, un'area di contenimento secondario e poi primario, sino al luogo della scena del crimine (*Crime Scene*) (***Increasing Crime Scene Integrity by Creating Multiple Security Levels***, Greg Dagnan, *Criminal Justice Missouri Southern State, 2006*);
- Estremamente dirimenti risultano le Linee Guida dell' U.S. *Department of Justice – Office of Justice Programs, Crime Scene Investigation – A guide for Law Enforcement, January 2000*;
- L'aggiornamento delle suddette *Linee Guida dell' U.S. Department of Justice, Crime Scene Investigation: a Reference for Law Enforcement Training, June 2004*, evidenzia protocolli/procedure ancor più restrittive;
- Il manuale ***Handbook of Forensic Services*** per il *Laboratory Division del Federal Bureau of Investigation (2007)* riporta numerose indicazioni relativamente ai protocolli di repertazione, chiusura e conservazione delle tracce di DNA;

- Secondo quanto riportato in *Protecting the Crime Scene*, G. Schiro – Louisiana State Police Crime Laboratory: “Particolare attenzione dovrebbe essere posta al pavimento in quanto questo è il più comune luogo ove si raccolgono le prove ed al tempo stesso è anche il più grande potenziale di contaminazione”;
- In *Physical Evidence Handbook*, Dipartimento di Giustizia dello Stato del Wisconsin, Laboratori Criminali di Stato (7th Edition): “... bisogna assicurarsi che la traccia non sia alterata o contaminata tra il tempo della repertazione e il tempo dell’esame... tracce per l’esame del DNA devono sempre essere chiuse in carta o in un cartone, anche se appaiono asciutte...”;
- L’adozione dei protocolli e delle procedure fin qui esposte sono universalmente applicate, così come riportato nell’*Interpol Handbook on DNA data Exchange and Practice – Recommendations from the Interpol DNA Monitoring Expert Group - second edition, 2009*;
- **Guidance on the Production of Best Practice Manuals within ENFSI**, ref cod. QCC-BPM-008, 01/05/2008;

Sempre dall'*ENFSI*, nel documento *European Crime Scene Management Good Practice Manual*, alla redazione del quale hanno partecipato il Servizio Polizia Scientifica di Roma ed i Carabinieri di Roma, si evidenziano precise indicazioni operative, ed in particolare:

- “...è essenziale che tutti gli agenti siano consci dell'importanza della preservazione della scena;
- evitare la tentazione di esaminare. Considerare e registrare tutti i rischi di contaminazione. Prendere nota dei nomi di tutte le persone sulla scena;
- proteggere la scena: identificare l'estensione della scena e delimitarla. Prevenire l'accesso di altre persone;
- Crime Scene Manager*: Assicurarsi che tutte le persone che entrano nella scena indossino abiti protettivi, sovrascarpe, maschere e guanti; fornire consigli e assicurazioni sulla qualità riguardo tutte le questioni scientifiche inclusa la conservazione e la repertazione delle prove e l'abbandono della scena;
- contaminazione: È essenziale che vengano seguiti tutti gli step per assicurare che non ci sia contaminazione delle prove raccolte. Nel caso venga riscontrata contaminazione, i risultati di qualunque analisi scientifica potrebbero essere invalidati. La protezione dalla contaminazione dovrebbe sempre iniziare sulla scena del crimine e continuare fino a che il campione non venga depositato presso il Laboratorio di Scienze Forensi;
- è essenziale che ciascuna azione eseguita per la raccolta delle prove sia documentata...”

CENNI SULLE INDAGINI DI LABORATORIO A FINI FORENSI

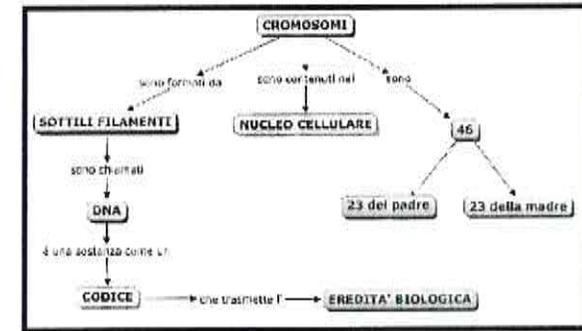
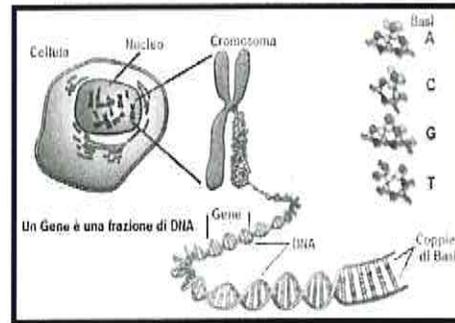
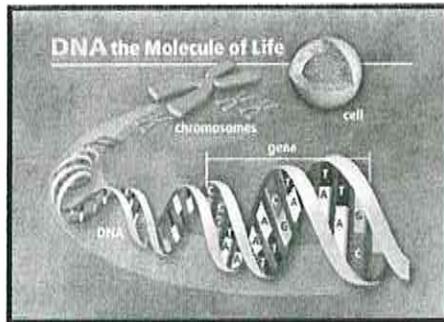
Al fine di stabilire la presunta natura biologica delle tracce vengono eseguiti test orientativi, che consentono di formulare una **diagnosi generica** del presunto materiale biologico (ad es. sangue, liquido seminale, saliva, ecc.); questi test devono poi essere confermati da altre metodiche, dette di certezza, atte a stabilire la natura del materiale in esame.

Le reazioni di orientamento per la **diagnosi generica di sangue** si basano sulle proprietà che hanno alcune sostanze incolori allo stato ridotto (leucobasi) di assumere un determinato colore, per ossidazione, in presenza di un perossido (ad es. H₂O₂) e di una perossidasi (ad es. emoglobina).

Al fine di giungere ad una diagnosi di certezza che il materiale in esame sia sangue umano (**diagnosi di specie**) vengono impiegati test specifici basati su reazioni immunocromatografiche che utilizzano anticorpi monoclonali anti-emoglobina umana coniugata con una sostanza cromogena.

Una volta avuta la certezza che il materiale repertato sia sostanza biologica di specie umana le indagini di laboratorio proseguono allo scopo di giungere ad una **diagnosi individuale: analisi del DNA**.

DNA (*deoxyribonucleic acid*): materiale genetico della cellula localizzato all'interno del nucleo; il DNA nucleare contiene tutte le informazioni necessarie per costruire, far funzionare e mantenere un organismo, oltre che a trasmettere la vita da una generazione all'altra. Esso è rappresentato da una macromolecola costituita da sub unità dette nucleotidi (uno zucchero a 5 atomi di carbonio, il desossiribosio, cui sono legati una base azotata (adenina, guanina, timina, citosina) ed un gruppo fosfato.



Geni: tratti di DNA che determinano le caratteristiche di un individuo trasmesse da una generazione all'altra;

Locus: posizione sul cromosoma di un particolare gene;

Alleli: forme alternative dei geni che possono dare luogo all'espressione di caratteristiche diverse (per ogni specifico locus viene ereditato un allele di provenienza paterna ed uno di provenienza materna);

Omozigote: organismo che ha ereditato due alleli identici dai genitori;

Eterozigote: organismo che possiede due alleli diversi l'uno dall'altro;

Studi di espressione dei diversi sistemi eucarioti hanno consentito di accertare che il DNA codificante costituisce il 10% della massa di DNA presente nel nucleo mentre il 90% è costituito da DNA non codificante che si ipotizza svolga una funzione regolatrice sull'espressione dei geni.

Il DNA non codificante nell'uomo è soggetto a **fenomeni mutazionali** aventi una frequenza pari a 8×10^{-3} /gamete/generazione. Tali mutazioni, in quanto poste in regioni introniche, **non causano alterazioni funzionali** di rilievo (tanto che non vengono eliminate in base al principio della selezione naturale), per contro **determinano** quella **variabilità individuale** che è alla base dei polimorfismi genetici (intendendo con il termine di polimorfismo una variabilità genetica connessa all'esistenza di due o più alleli allo stesso locus).

Parte del DNA è costituito da sequenze sparse ripetute in tandem, rappresentate da satelliti, minisatelliti e microsatelliti, che rappresentano la regioni più utilizzate nell'identificazione personale.

Da alcuni anni sono utilizzati microsatelliti, meglio conosciuti come **Short Tandem Repeats** (STRs), aventi ripetizioni tetrameriche (unità di ripetizione di quattro basi) che sono state combinate in multiplex così da consentire l'amplificazione contestuale di 16 loci. Queste rappresentano *le regioni del genoma più utilizzate nell'identificazione personale*.

Vantaggi nell'impiego degli STRs

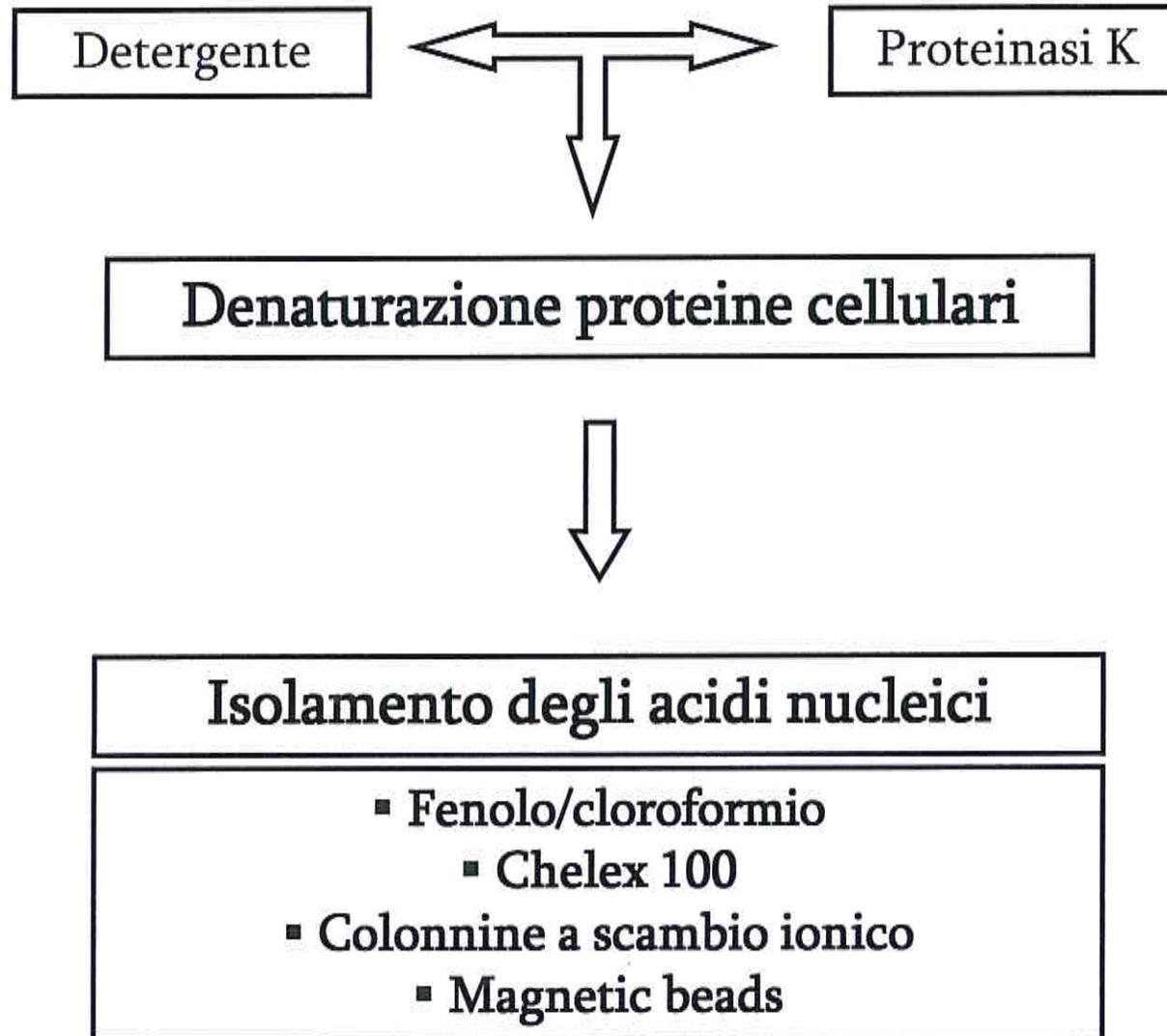
- le **piccole dimensioni** dei frammenti (100-300 bp) ne consentono l'amplificazione anche in condizioni di elevata degradazione del DNA
- considerato il **breve intervallo di lunghezza** intercorrente tra l'allele a minor peso molecolare e quello a più elevato peso molecolare è possibile ottenere amplificazioni omogenee di ciascun allele evitando il fenomeno dell'amplificazione preferenziale che darebbe luogo ad amplificati falsamente omozigoti
- è possibile l'**amplificazione di più alleli** contemporaneamente la tipizzazione dei quali è resa agevole dall'impiego di ladder allelici specifici per ogni marcatore
- il **tasso di mutazione** degli STRs è noto cosicché si può evitare di incorrere in false esclusioni dovute all'allele mutato
- i **risultati** sono facilmente **riproducibili**
- sono disponibili **banche dati** relative alle frequenze alleliche nella popolazione, frequenze che possono essere proficuamente impiegate per il calcolo biostatistico

Nel 1997, il laboratorio del Federal Bureau of Investigation (FBI) ha proposto di stabilire un gruppo di loci STR da usare nell'ambito di un database del DNA a livello nazionale noto come *CODIS* (Combined DNA Index System): CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11. Un profilo del DNA ottenuto con l'analisi dei tredici loci STR fornisce una *random match probability* media pari a circa uno su un trilione nell'ambito di individui scelti a caso nella popolazione (Butler, 2005). Questi loci sono riconosciuti a livello statunitense come lo standard ai fini dell'identificazione umana.

Per quanto riguarda l'Europa invece, nell'*Official Journal of the European Union* del 5.12.2009 viene stabilito che gli Stati Membri dell'Unione Europea sono invitati ad utilizzare almeno i markers che costituiscono l'*European Standard Set (ESS)*, al fine di facilitare lo scambio di informazioni tra i laboratori degli Stati Membri: D3S1358, VWA, D8S1179, D21S11, D18S51, HUMTH01, FGA, D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045.

1. Estrazione del DNA;
2. Quantificazione del DNA (PCR quantitativa (qPCR) o Real-Time PCR; Fluorimetro Qubit[®] 2.0);
3. Amplificazione del DNA;
4. Elettroforesi capillare;
5. Interpretazione dei risultati

ESTRAZIONE DEL DNA



QUANTIFICAZIONE DEL DNA

✓ Spettrofotometria a raggi UV

• Sensibilità

✓ Slot blot

• Possibilità di discriminare DNA umano e non umano

• Lunghi tempi di esecuzione

✓ Real time PCR

• Sensibilità

• Costo

• Inibitori della PCR

✓ Amplificazione di singolo locus STR
e valutazione semiquantitativa su gel di agarosio

• Sensibilità

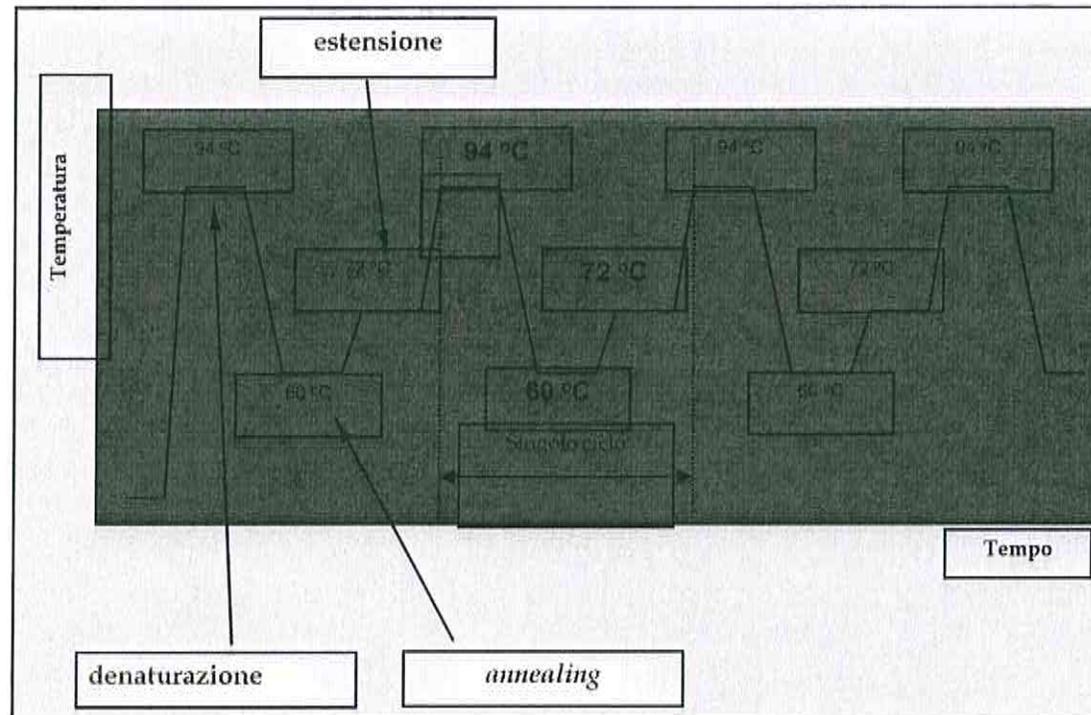
• Inibitori della PCR

- La *tecnica PCR* si basa sull'azione di una DNA polimerasi per duplicare uno specifico frammento di DNA a doppia elica delimitato alle sue estremità da due primers oligonucleotidici che ibridizzano in orientazione opposta alle eliche complementari a quelle delle regioni fiancheggianti la sequenza bersaglio.

In particolare si procede:

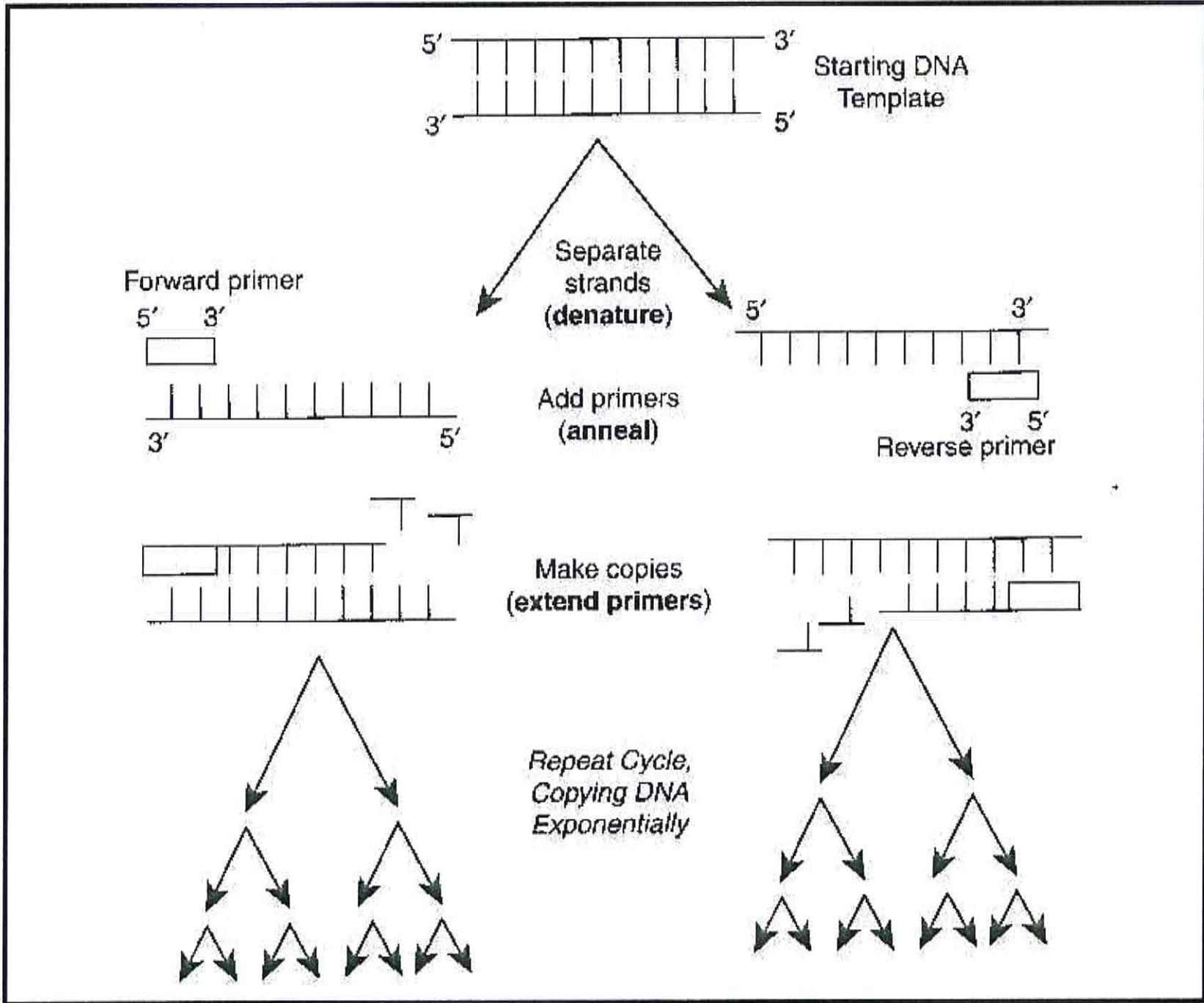
- alla *denaturazione* (94-95 °C) del campione al fine di ottenere la separazione dei due filamenti del DNA che serviranno come stampo per la replica delle sequenze complementari;
- all'*appaiamento* dei primers oligonucleotidici con le sequenze complementari presenti nelle regioni fiancheggianti la zona ipervariabile di interesse, tale legame si ottiene mediante raffreddamento della temperatura (55°C circa);
- all'*estensione*, mediante innalzamento della temperatura (70-75°C) , in modo da consentire ai primers di essere estesi per la progressiva aggiunta di nucleotidi catalizzata dalla TAQ Polimerasi. Le nuove molecole di DNA vengono sottoposte a cicli termici ripetuti così da ottenere l'accumulo esponenziale del frammento d'interesse.

AMPLIFICAZIONE - PCR



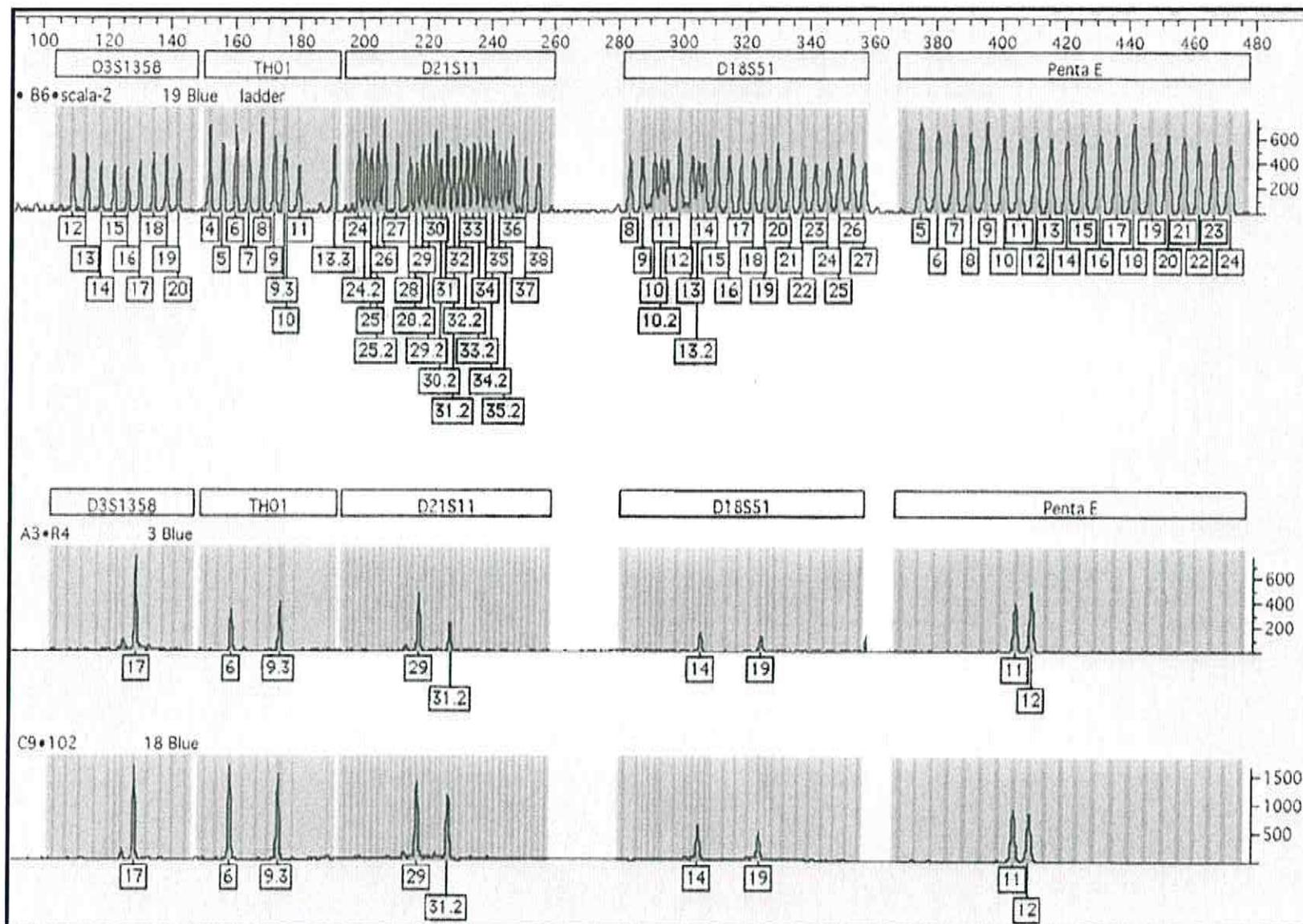
...inibitori della PCR:

- Coloranti (es: jeans nero o blu scuro)
- Anticoagulanti (EDTA, eparina)
- Colorazioni istologiche (Baecchi, Papanicolau)
- Sali biliari o polisaccaridi complessi presenti nelle feci
- ...



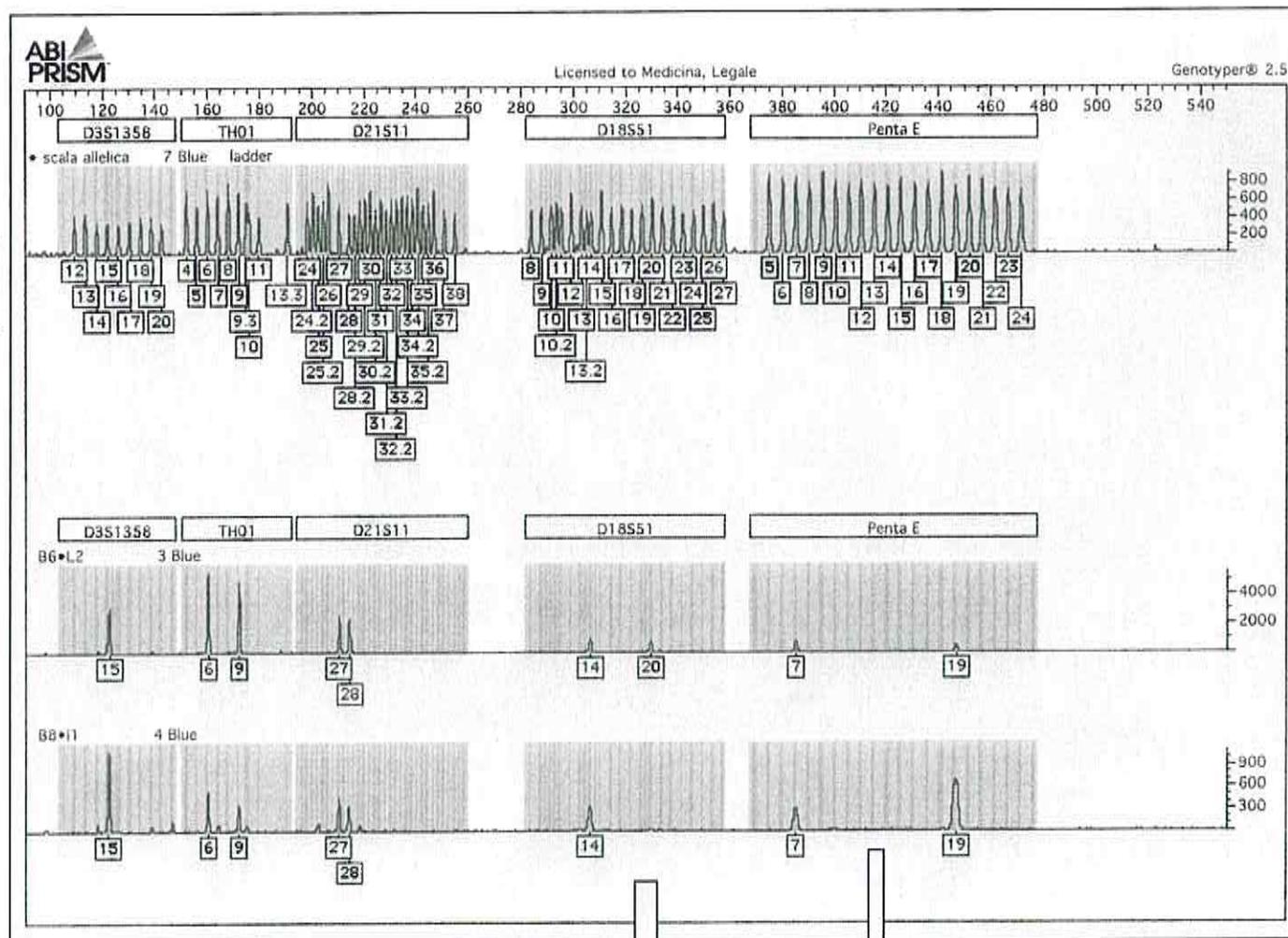
La **tipizzazione** dei prodotti di amplificazione così ottenuti potrà avvenire mediante separazione elettroforetica su gel di agaroso o di acrilammide ed idonea colorazione, ovvero mediante elettroforesi capillare avvalendosi dell'ausilio di un **sequenziatore automatico**. In quest'ultimo caso la tipizzazione verrà effettuata previa aggiunta, in posizione '5 di uno dei due primer, di molecole dotate di fluorescenza che eccitate dal raggio laser, durante la corsa elettroforetica in apposito capillare, verranno identificate e registrate dal software annesso al sequenziatore.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

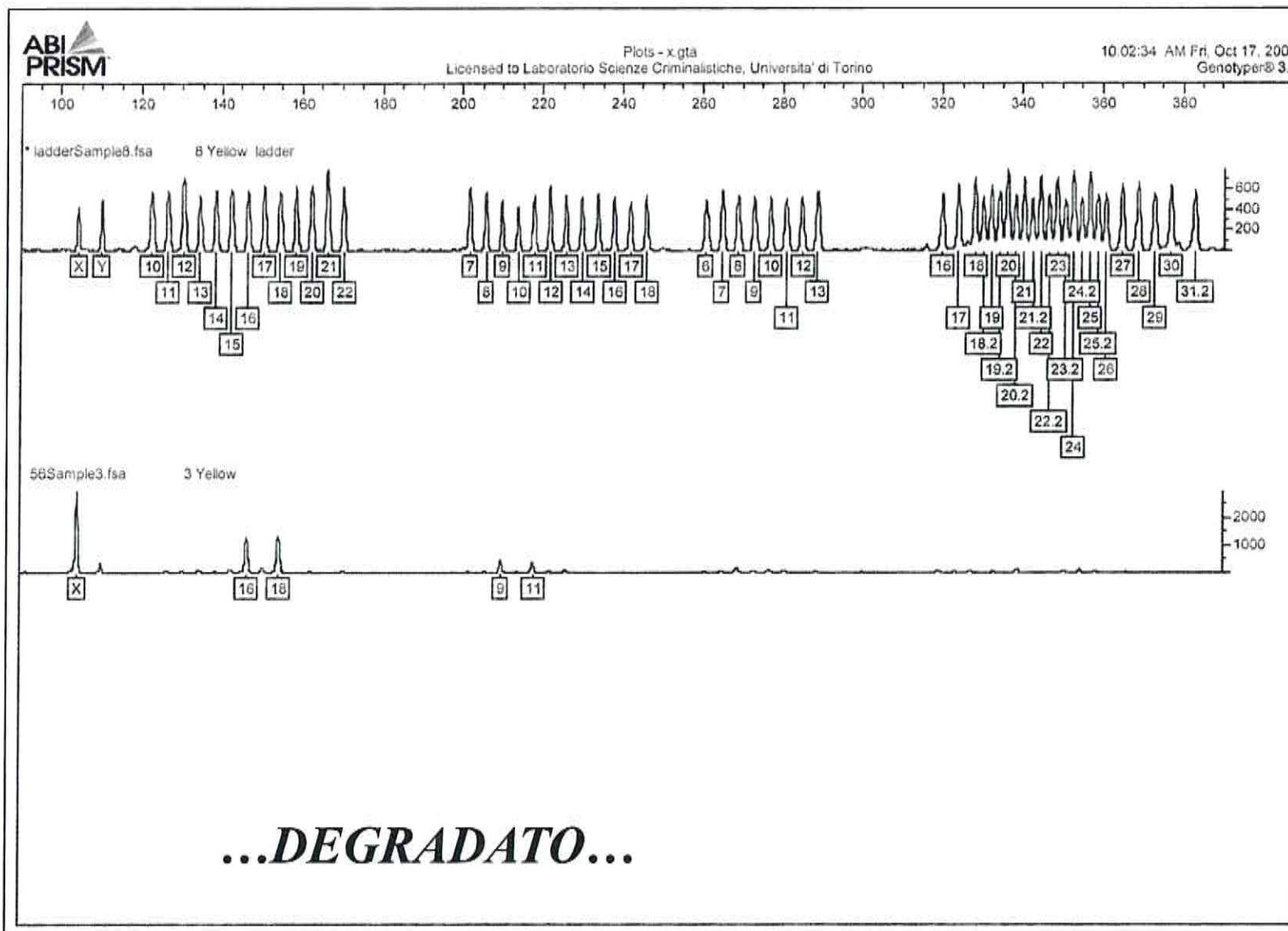
POCO



**Perdita di
un allele**

**Sbilanciamento
allelico**

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



ANALISI DI LABORATORIO RIPORTATE NELLA RTIGF RELATIVE AL REP.36 (COLTELLO)

Il Rep.36 è così descritto a pag. 5, della Relazione Tecnica “**Grosso coltello lungo complessivamente 31 cm, con lama lunga 17 cm, e manico di colore nero**”.

CAMPIONATURE SUL REP.36 (COLTELLO)

Non è indicato esplicitamente nella consulenza se l'ambiente ove sono state effettuate le campionature (in particolare le superfici del bancone di lavoro nonché tutte le apparecchiature presenti) fosse stato preventivamente decontaminato mediante l'uso di sostanze idonee (ad es. ipoclorito di sodio o sostanze similari), se sia stata utilizzata strumentazione sterilizzata e le modalità di sterilizzazione della stessa. In merito alle campionature sul reperto non è specificato se le stesse siano state eseguite mediante tamponi sterili, con cambio di guanti per ogni singolo prelievo, con utilizzo di camici e di mascherina da parte degli operatori.

A pag. 77 della Relazione Tecnica Indagini di Genetica Forense (RTIGF), sono riportate n° quattro foto del reperto recanti sull'impugnatura e sulla lama lettere dalla A alla G, indicative dei punti ove sono stati eseguiti i prelievi di presunto materiale biologico.

In particolare si evince che sono stati eseguiti n.3 prelievi sull'**impugnatura** del coltello (lettere **A-D-F**) e n.4 prelievi sulla **lama** (lettere **B-C-E-G**) per un totale di n.7 prelievi.

Dalle schede dello **Stato Avanzamento Lavori (SAL)** si evince che ad ogni singola traccia è stato attribuito un codice identificativo (*Codice Sample ID*) di seguito riportato:

Traccia A (“presunte cellule di sfaldamento lett. A”) = **47329**

Traccia B (“presunta sostanza ematica lett. B”) = **47330**

Traccia C (“presunta sostanza ematica lett. C”) = **47331**

Traccia D (“presunte cellule di sfaldamento lett. D”) = **48649**

Traccia E (“presunta sostanza ematica lett. E”) = **48651**

Traccia F (“presunte cellule di sfaldamento lett. F”) = **48654**

Traccia G (“presunta sostanza ematica lett. G”) = **48655**

Si evince dal SAL che sui prelievi indicati con le lettere **B-C-E-G** (lama del coltello) è stata eseguita la **diagnosi generica di sangue** mediante il test che utilizza l'impiego della tetrametilbenzidina (TMB).

Si riportano di seguito le tabelle riassuntive delle indagini eseguite sulle campionature ed i risultati ottenuti così come riportato a pag. 77-78 della **RTIGF**.

Analisi eseguite traccia B presunta sostanza ematica	diagnosi generica	diagnosi specie- specifica	Analisi eseguite traccia C presunta sostanza ematica	diagnosi generica	diagnosi specie- specifica
Tetrametilbenzidina (TMB)	⊗	//	Tetrametilbenzidina (TMB)	⊗	//
Anticorpo anti-uomo	//	⊗	Anticorpo anti-uomo	//	⊗

⊗= negativa

Analisi eseguite traccia E presunta sostanza ematica	diagnosi generica	diagnosi specie- specifica	Analisi eseguite traccia G presunta sostanza ematica	diagnosi generica	diagnosi specie- specifica
Tetrametilbenzidina (TMB)	⊗	//	Tetrametilbenzidina (TMB)	⊗	//
Anticorpo anti-uomo	//	⊗	Anticorpo anti-uomo	//	⊗

Dalle tabelle allegate si evince che la ricerca di sangue effettuata sui prelievi indicati con le lettere **B-C-E-G** (lama del coltello) è risultata **negativa per la presenza di sangue**.

Sulle predette tracce è stata eseguita la **diagnosi "specie-specifica"** anch'essa risultata **negativa per la specie umana**.

Per contro non è stato eseguito il test della tetrametilbenzidina sui prelievi indicati con le lettere **A-D-F** (impugnatura del coltello).

Non è stata eseguita alcuna indagine di laboratorio idonea ad evidenziare la presenza di materiale biologico di natura non ematica su alcuna delle tracce in esame.

Nonostante la negatività del test per la diagnosi di sangue e le omesse indagini per la ricerca di cellule la CT ha ipotizzato la presenza di *“presunte cellule di sfaldamento”* sul materiale prelevato dall'impugnatura del coltello (tracce A-D-F) e di *“presunto materiale biologico”* di altra natura (verosimilmente sangue considerate le indagini mirate alla ricerca della perossidasi ematica) **sul materiale prelevato dalla lama (tracce B-C-E-G).**

ESTRAZIONE DEL DNA

L'**estrazione del DNA** (pag.77-78) è stata eseguita da tutte le campionature (tracce A-B-C-D-E-F-G) utilizzando l'estrattore automatico *BioRobot "EZI"* (*Qiagen*) come riportato a pag. 78 della RTIGF.

Dalla Scheda Avanzamento Lavori (SAL) si evince che:

- ✓ l'estrazione del DNA dalle tracce A-B-C è stata eseguita in data 13.11.2007;
- ✓ l'estrazione del DNA dalle tracce D-E-F-G è stata eseguita in data 17.12.2007;
- ✓ La "*Quantità di estratto*" era pari a 50µl per ogni campione (cfr. SAL).

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

A pag.78 della RTIGF sono riportate le seguenti tabelle:

Estrazione DNA BioRobot "EZ1" (QIAGEN)	traccia A presunte cellule di sfaldamento eseguita	traccia B presunta sostanza biologica eseguita	traccia C presunta sostanza biologica eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della Applied Biosystems	☑	☑	⊗

☑= positiva

Estrazione DNA BioRobot "EZ1" (QIAGEN)	traccia D presunte cellule di sfaldamento eseguita	traccia E presunta sostanza biologica eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della Applied Biosystems	⊗	⊗

Estrazione DNA BioRobot "EZ1" (QIAGEN)	traccia F presunte cellule di sfaldamento eseguita	traccia G presunta sostanza biologica eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della Applied Biosystems	⊗	⊗

Si evince che la quantificazione del DNA è stata effettuata per tutte le campionature mediante Real Time PCR (7700 Sequence Detector ABI PRISM™, Applied Biosystems). Non è riportata, invece, alcuna indicazione circa il kit utilizzato.

In merito al risultato di detta quantificazione per le campionature indicate con le **lettere A e B** è riportata la dizione "**positiva**", ma non è indicato alcun valore in termini numerici del DNA riscontrato, per contro per le tracce indicate con le **lettere C-D-E-F-G** la quantificazione è risultata "**negativa**".

Dalla disamina dei rapporti di Real Time PCR esibiti risulta che la quantificazione mediante detta metodica è stata eseguita, in data 18 dicembre 2007, soltanto sugli estratti di DNA:

48649 = traccia D

48651 = traccia E

48654 = traccia F

48655 = traccia G

Le tracce predette sono risultate tutte negative per la presenza di DNA (cfr. Report Real Time DNA= 0.00) .

E', altresì, allegato un rapporto, datato 13 novembre 2007, relativo alle quantificazioni degli estratti dalle campionature:

A (codice campione ID 47329)

B (codice campione ID 47330)

C (codice campione ID 47331)

eseguite mediante il Fluorimetro Qubit™ (Invitrogen) con il *Kit dsDNA HS*: test selettivo per il DNA a doppio filamento, ma non specifico per il DNA umano che consente la quantificazione di campioni con concentrazione di DNA con range compreso fra 0.2-100 ng.

Fluorimetro Qubit™

Se possibile accertarsi che la temperatura del laboratorio sia 20-22 °C
Lasciare circa 15' fuori dal frigorifero il kit di analisi.

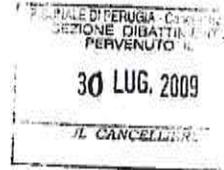
Kit: dsDNA HS "INUITROGEN"

Preparare una soluzione madre:
per ciascun campione: 199 µl di Buffer e 1 µl di reagent

per ciascun standard (1 e 2)
190 µl di soluzione madre e 10 µl di standard

per ciascun campione
199 µl di soluzione madre e 1 µl di campione

Vortexare 1-2 " i campioni da analizzare e incubare 2' a temperatura ambiente



CAMPIONE	VALORE $\mu\text{g}/\text{mL}$ <i>1 µl</i>	CONCENTRAZIONE CAMPIONE $\text{ng}/\mu\text{l}$
Standard 1	ovc	
Standard 2	ovc	
1%47326	too low	
2%47327	too low	
3%47328	0.57	0.57
4%47329	0.08	0.08
5%47330	too low	
6%47331	too low	

13 novembre 2007

QUANTIFICAZIONE MEDIANTE FLUORIMETRO QUBIT™



Sono stati ottenuti i seguenti
valori di concentrazione
delle campionature:

- Traccia A (codice campione ID 47329): 0.08 $\text{ng}/\mu\text{l}$
- Traccia B (codice campione ID 47330): too low
- Traccia C (codice campione ID 47331): too low

Per quanto riguarda la **quantificazione della traccia A** (impugnatura del coltello) emerge dai risultati ottenuti mediante Fluorimetro Qubit™ che la concentrazione di DNA in tale campione era pari a 0,08 ng/μl: tenuto conto che la “quantità di estratto” era 50 μl (cfr. SAL), moltiplicando 0.08 ng/μl x 50 μl, il DNA totale era pari a 4 ng, quantitativo certamente rilevante, che consentiva di ritenere **positiva alla quantificazione** la traccia A.

Non è, per contro, comprensibile quale criterio sia stato adottato nella valutazione della positività alla quantificazione della traccia B e della negatività della traccia C dal momento che per ambedue le tracce è stato ottenuto lo stesso risultato **“TOO LOW”**, non solo al di sotto della soglia di sensibilità del Fluorimetro indicata dal manuale (0.2 ng/μl), ma al di sotto del valore di 0.08 ng/μl che il Fluorimetro ha rilevato per la traccia A.

Né è comprensibile, considerata la negatività dei risultati sulla traccia B, quanto riferito dalla Dr.ssa Stefanoni in sede di interrogatorio GUP (pag 178) laddove afferma che **il DNA nella traccia B, quantificato mediante Real Time PCR** (si ricorda che la quantificazione così come confermato in sede di udienza non è mai stata eseguita o, quantomeno, non ci è stata fornita alcuna documentazione a supporto di tale affermazione), **era “nell’ordine di qualche centinaio di picogrammi”**, valore, questo, che non emerge da alcuno degli atti consegnatici (SAL, report del Fluorimetro, report della Real Time, RTIGF).

AMPLIFICAZIONE

“L’amplificazione degli STRs autosomici è stata effettuata secondo le modalità già riportate a pag.31; le tracce risultate positive alla quantificazione (tracce A e B), sono state sottoposte ad amplificazione e successiva elettroforesi capillare. Le tracce risultate negative alla quantificazione (tracce C, D, E, F, G) sono state analizzate previa concentrazione mediante impiego di strumentazione Speed-Vac SC110 marca “Savant” (pag.78-79 della CT).

A pag 31 della CT sono riportate le modalità di “*amplificazione mediante PCR*”: “...utilizzando il kit commerciale “*AmpFlSTRIdentifiler*” (Applied Biosystem (Foster City, CA) secondo gli “*User Manual*”.

Per quanto riguarda il kit *AmpFlSTR Identifiler*, le indicazioni fornite dalla ditta produttrice sono le seguenti:

- *N. campioni x 10.5 µl di AmpFlSTR PCR Reaction Mix*
- *N. campioni x 0.5 µl di AmpliTaq Gold DNA Polymerase*
- *N. campioni x 5.5 µl di AmpFlSTR Identifiler Primer Set*
- *10 µl di DNA con concentrazione ± 0.125 ng/µl*

Volume finale della reazione 25 µl;

range di concentrazione del DNA consigliato: 0.5-1.25 ng/µl.

Parallelamente ai campioni in esame **devono essere allestiti controlli** (un “controllo negativo” ed un “controllo positivo”) al fine di monitorizzare l’efficacia delle condizioni di amplificazione prescelte e la presenza di contaminazione.

Nella documentazione in atti:

- non sono mai indicati i **volumi della Mix**;
 - non è mai indicato il **quantitativo di DNA** utilizzato per ogni reazione PCR.
- ✓ si rileva, a pag. 79 della RTIGF, che le tracce indicate con le lettere C-D-E-F-G (risultate negative alla quantificazione del DNA) sono state concentrate mediante *Speed-Vac SC110*, ma non risulta che sia stata ripetuta la quantificazione degli estratti concentrati. Si dà atto, nella RTIGF, che dalle tracce predette non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione;
- ✓ in assenza di qualunque annotazione circa modifiche apportate ai protocolli di amplificazione si deve ritenere che per le **tracce A e B** sia stato seguito il protocollo allegato al kit, ovvero sia che siano stati impiegati volumi totali di 25 µl costituiti rispettivamente da:
- 15 µl di Mix di amplificazione + 10 µl di DNA estratto dalla traccia A*
15 µl di Mix di amplificazione + 10 µl di DNA estratto dalla traccia B

In relazione all'estratto della **traccia A**, qualora fossero stati utilizzati i volumi indicati nel kit *Identifiler*, il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione PCR sarebbe stato pari a 0.8 ng ($0.08 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 0.8 \text{ ng}$), quindi nel range suggerito dal kit (0.5-1.25 ng/ μl di DNA templato): il relativo tracciato elettroforetico sarebbe in accordo con il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione.

Notevoli perplessità, invece, sorgono sul quantitativo di DNA estratto dalla **traccia B** che sarebbe stato aggiunto alla mix di reazione: l'estratto della traccia B è stato quantificato mediante *Fluorimetro Qubit™* e pur avendo dato un risultato non interpretabile (“*too low*”) è stato considerato “positivo”, contrariamente alla **traccia C** che pur essendo “*too low*” è stata considerata negativa.

Si apprende dalla trascrizione degli interrogatori GUP che la Dr.ssa Stefanoni ha concentrato il volume dell'estratto della traccia B in più riprese (da un volume iniziale di 50 microlitri, “*intorno ai 20, 22, 23 microlitri*” – GUP, pag.178) e di aver effettuato successivamente la quantificazione mediante Real Time del DNA totale e non del DNA di provenienza maschile.

Poiché dalla quantificazione in Real Time (non documentata) ha ottenuto una concentrazione di “*qualche centinaio di picogrammi di DNA*” (GUP, pag.178) ha provveduto a concentrare ulteriormente l'estratto fino ad ottenere un **volume finale di 10 μl** che avrebbe usato per la reazione PCR.

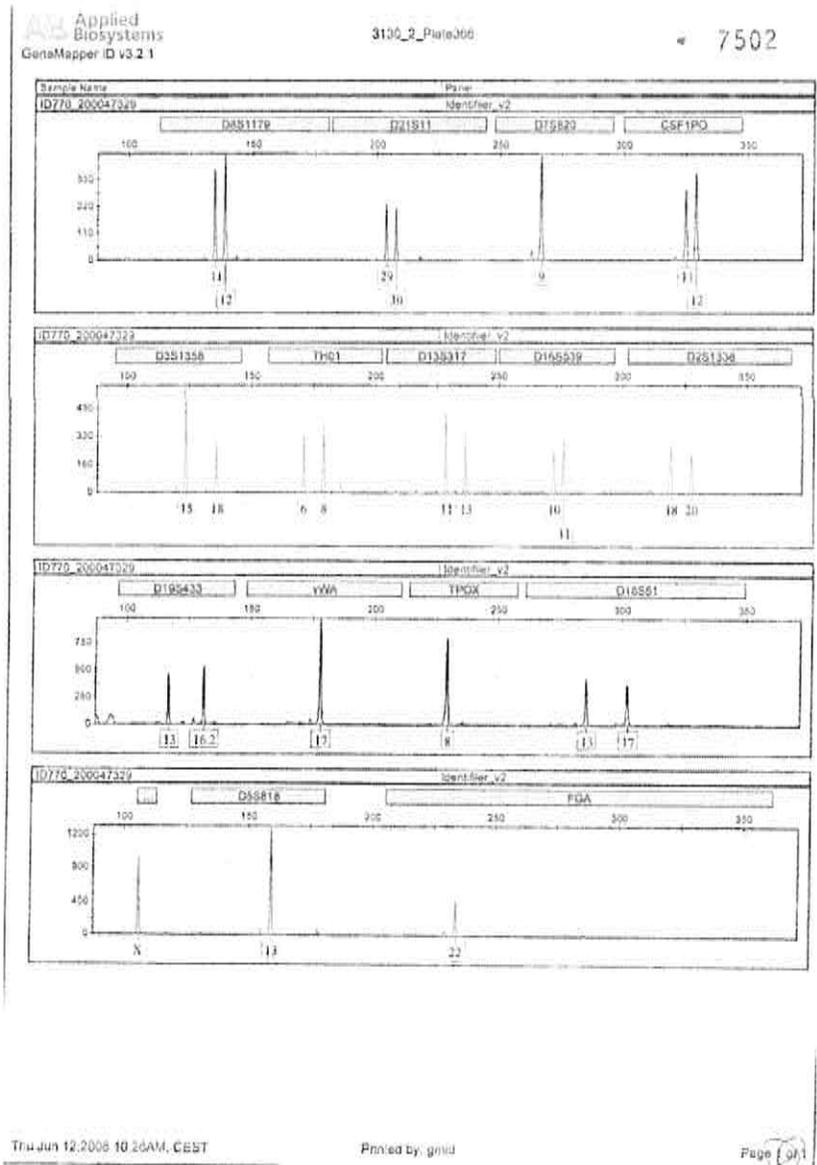
Riteniamo che anche sul volume finale non sia stata eseguita alcuna quantificazione: non vi è alcun riscontro né nella documentazione in atti (SAL, report della Real Time, RTIGF) né tale circostanza è mai stata riferita dalla Dr.ssa Stefanoni nel corso dei suoi interrogatori.

ELETTROFORESI CAPILLARE

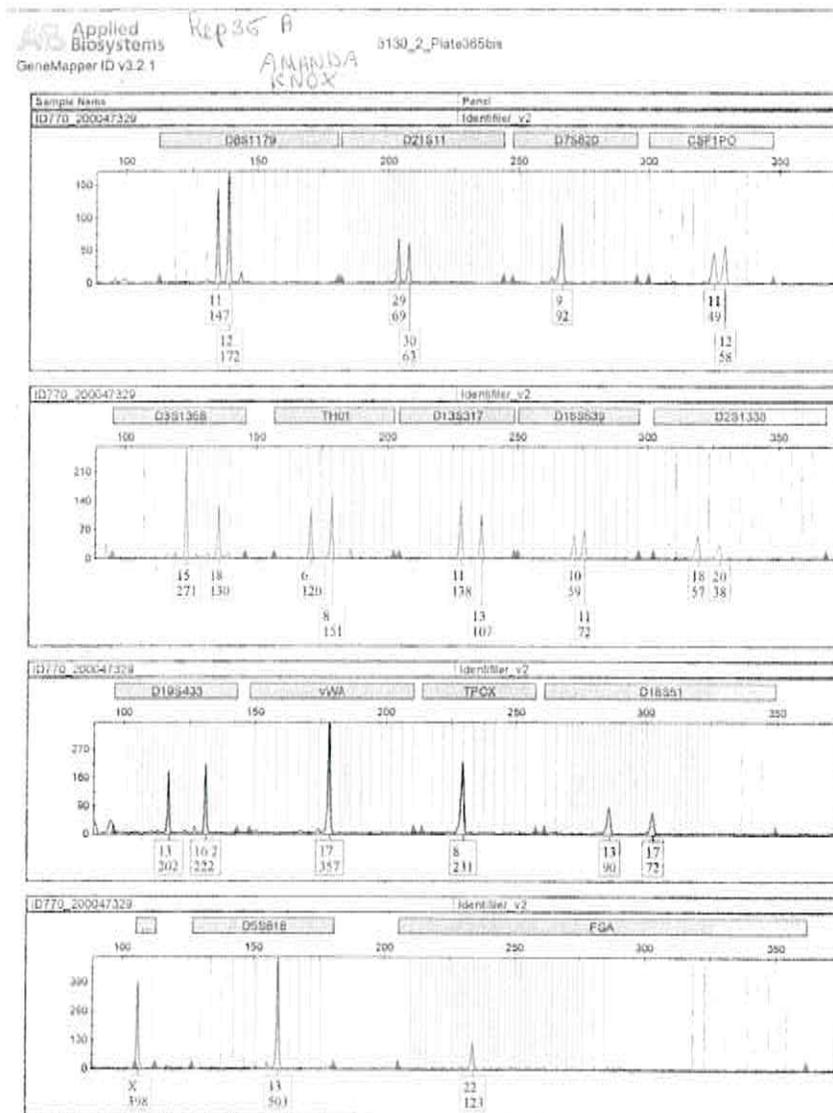
I prodotti di amplificazione ottenuti dalle tracce A e B sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare mediante strumentazione *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* utilizzando il software di analisi "*Gene Mapper*".

Poiché non risulta dagli atti che sia stata apportata alcuna modifica al protocollo di elettroforesi si desume che le condizioni di corsa siano state quelle standard indicate dal kit.

Si riporta di seguito l'elettroferogramma relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla **traccia A** (impugnatura del coltello), allegato alla RTIGF:



In data 29 aprile 2011 ci è stato inviato, su CD-rom, l'elettroferogramma relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla traccia A ove sono indicate le altezze dei picchi allelici:

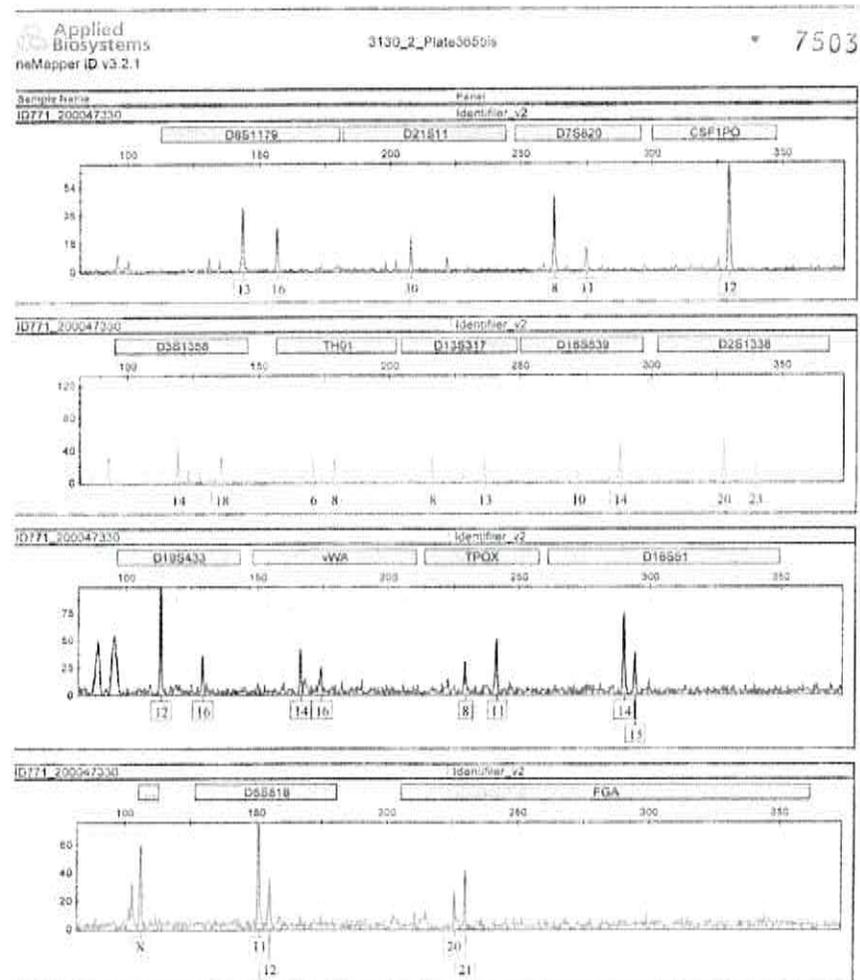


In merito alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla **campionatura A**: a) *sono presenti picchi che superano la soglia di 50 RFU* (soglia raccomandata dal manuale del kit); b) *gli alleli sono bilanciati* in quanto il rapporto tra i picchi è >0.60 (Gill. P et al., 2006).

Nella tabella seguente sono riportati gli alleli con le relative altezze dei picchi ed il calcolo del bilanciamento degli eterozigoti:

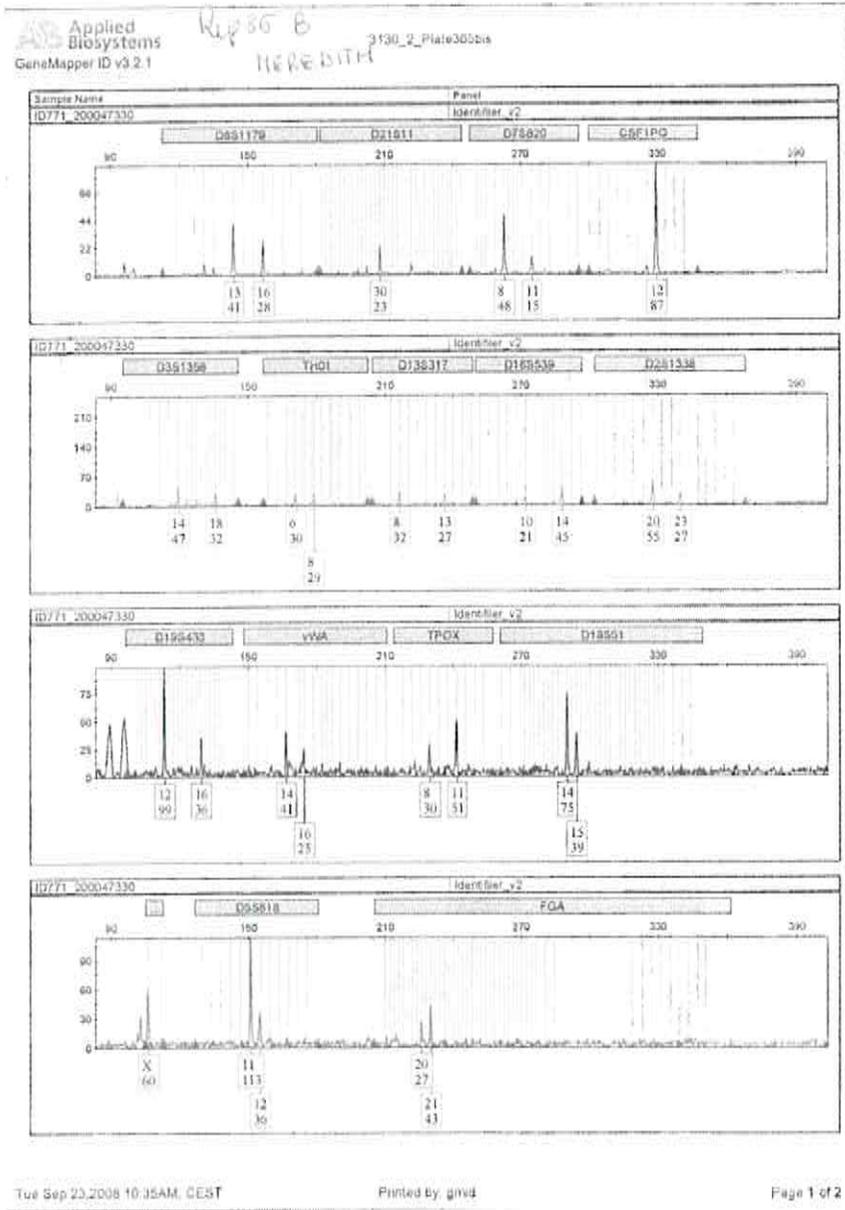
<i>Locus</i>	<i>Campionatura A</i>	
	<i>Altezza picchi</i>	<i>Bilanciamento degli eterozigoti $Hb=q/p_b$</i>
D8S1179	allele 11 ↑ 147 allele 12 ↑ 172	0.85
D21S11	allele 29 ↑ 69 allele 30 ↑ 63	0.91
D7S820	allele 9 ↑ 92	-
CSF1PO	allele 11 ↑ 49 allele 12 ↑ 58	0.84
D3S1358	allele 15 ↑ 271 allele 18 ↑ 130	0.47
TH01	allele 6 ↑ 120 allele 8 ↑ 151	0.79
D13S317	allele 11 ↑ 138 allele 13 ↑ 107	0.77
D16S539	allele 10 ↑ 59 allele 11 ↑ 72	0.81
D2S1338	allele 18 ↑ 57 allele 20 ↑ 38	0.66
D19S433	allele 13 ↑ 202 allele 16.2 ↑ 222	0.90
VWA	allele 17 ↑ 357	-
TPOX	allele 8 ↑ 231	-
D18S51	allele 13 ↑ 90 allele 17 ↑ 72	0.80
D5S818	allele 13 ↑ 503	-
FGA	allele 22 ↑ 123	-

In merito alla **campionatura B** (lama del coltello) si riporta di seguito l'elettroferogramma relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla predetta traccia, allegato alla RTIGF:

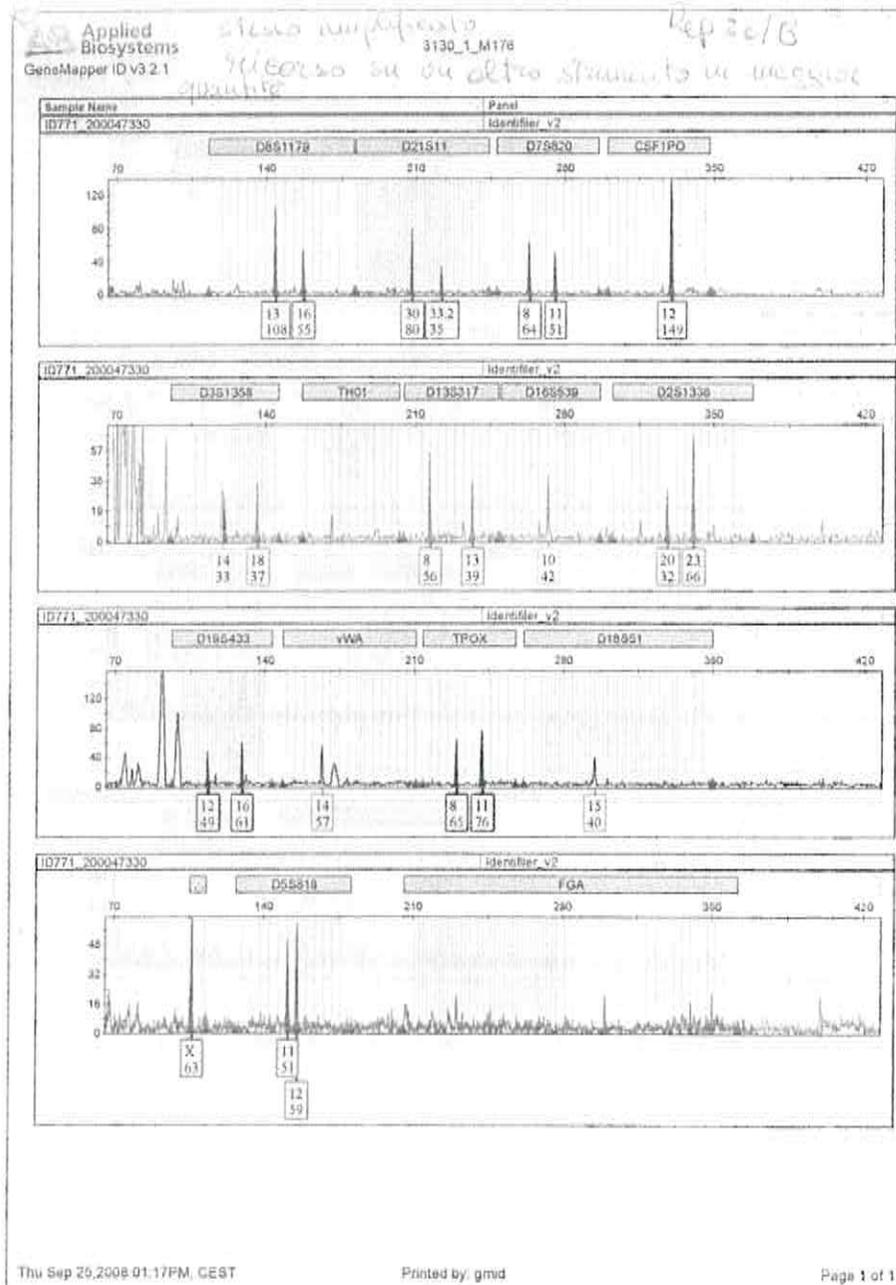


In data 29 aprile 2011 ci sono stati inviati, su CD-rom, gli elettroferogrammi relativi alle 2 corse elettroforetiche del DNA amplificato dalla traccia B, ove sono indicate le altezze dei picchi allelici (*I corsa: Sep 23,2008 10:35 AM; II corsa: Sep 25,2008 01:17 PM*)

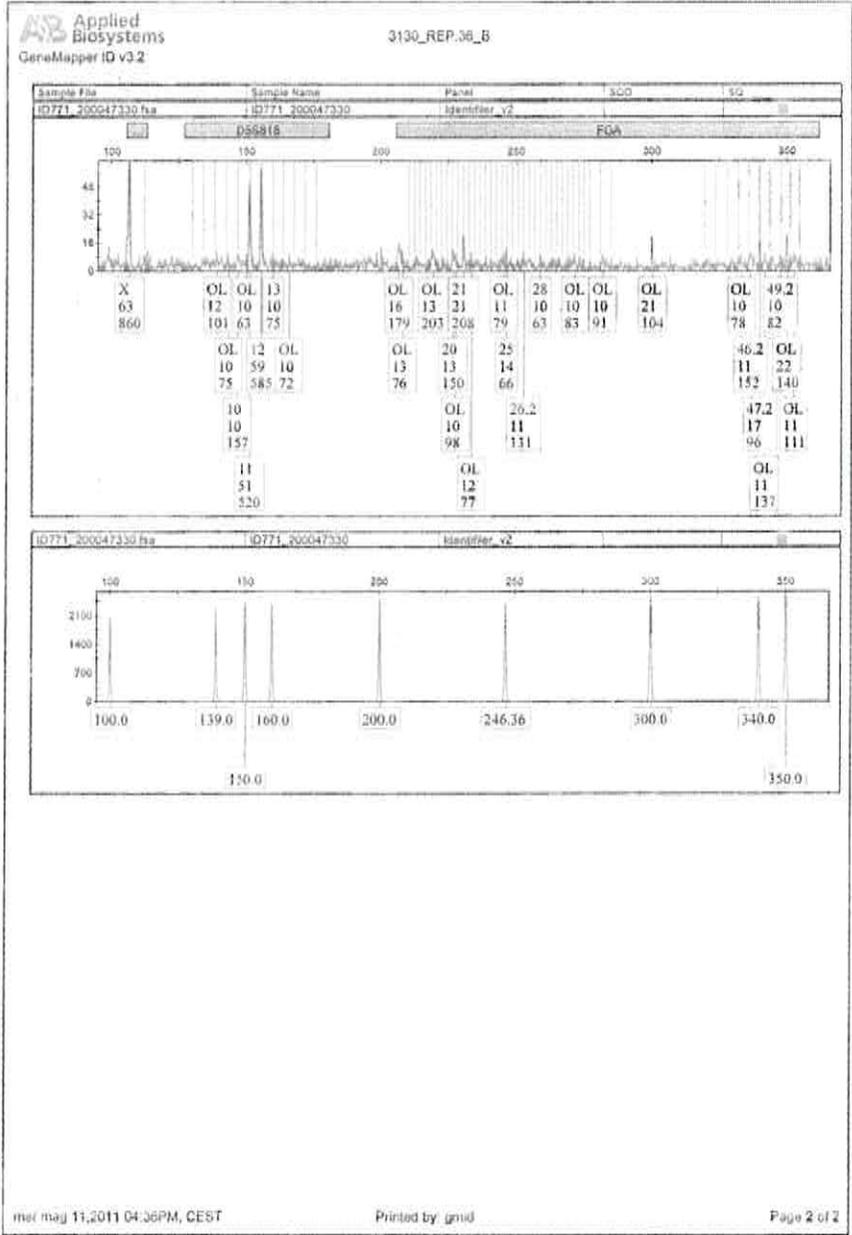
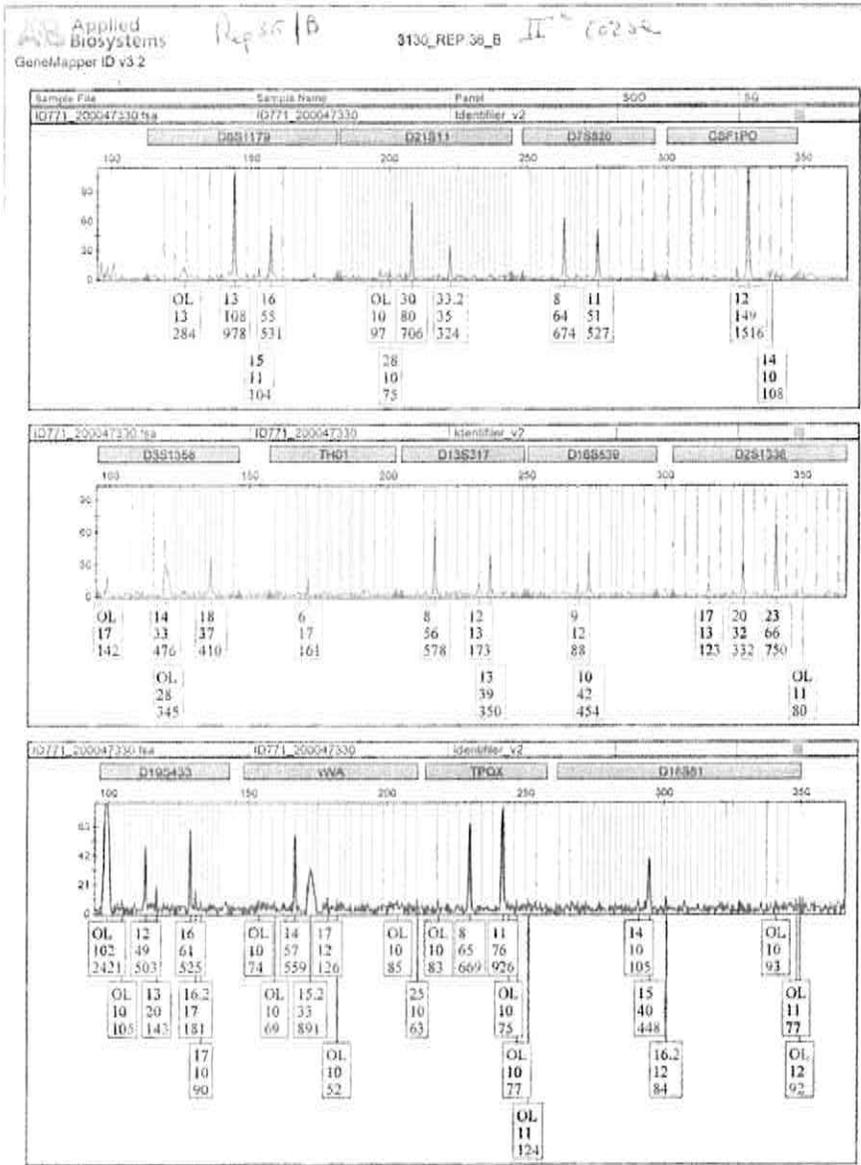
I CORSA ELETTROFORETICA
(Sep 23,2008 10:35 AM)



II CORSA ELETTROFORETICA
(Sep 25, 2008 01:17 PM)



II CORSA ELETTROFORETICA (mag 11,2011 04:36 PM)



Poiché i tracciati elettroforetici non differiscono in maniera significativa tra loro (cfr. altezza dei picchi), si riportano le considerazioni relative alle corse elettroforetiche datate *Sep 23,2008 10:35 AM* e *Sep 25,2008 01:17 PM*, ma che si intendono estese anche agli elettroferogrammi datati *mag 11,2011 04:48 PM* e *mag 11,2011 04:36 PM*.

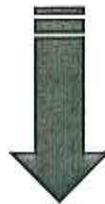
I corsa elettroforetica, datata *Sep 23,2008 10:35 AM*:

- **picchi nettamente al di sotto della soglia di 50 RFU** (soglia raccomandata dal manuale del kit);
- **alleli sbilanciati** in quanto il rapporto tra molti di essi è <0.60 (*Gill.P et al., 2006*).

LOCUS	CAMPIONATURA B - I CORSA ELETTROFORETICA	
	ALTEZZA PICCHI	BILANCIAMENTO DEGLI ETEROZIGOTI $HB = \Phi_A / \Phi_B$
D8S1179	allele 13 ↑ 41 allele 16 ↑ 28	0.68
D21S11	allele 30 ↑ 23	-
D7S820	allele 8 ↑ 48 allele 11 ↑ 15	0.31
CSF1PO	allele 12 ↑ 87	-
D3S1358	allele 14 ↑ 47 allele 18 ↑ 32	0.68
TH01	allele 6 ↑ 30 allele 8 ↑ 29	0.96
D13S317	allele 8 ↑ 32 allele 13 ↑ 27	0.84
D16S539	allele 10 ↑ 21 allele 14 ↑ 45	0.46
D2S1338	allele 20 ↑ 55 allele 23 ↑ 27	0.49
D19S433	allele 12 ↑ 99 allele 16 ↑ 36	0.36
VWA	allele 14 ↑ 41 allele 16 ↑ 25	0.60
TPOX	allele 8 ↑ 30 allele 11 ↑ 51	0.58
D18S51	allele 14 ↑ 75 allele 15 ↑ 39	0.52
D5S818	allele 11 ↑ 113 allele 12 ↑ 36	0.31
FGA	allele 20 ↑ 27 allele 21 ↑ 43	0.62

Dall'esame della II corsa elettroforetica datata *Sep 25, 2008 01:17 PM* si rileva per alcuni marcatori la perdita di alleli (TH01, D16S539, vWA, D18S51, FGA), per un marcatore la presenza di un picco non presente nella I corsa (D21S11: presenza dell'allele 33.2), per altri marcatori è presente un'inversione dell'altezza dei picchi (D3S1358, D2S1338, D19S433, D5S818).

**LA CT NON HA RIPETUTO L'AMPLIFICAZIONE
DELL'ESTRATTO MA HA ESEGUITO DUE CORSE
ELETTROFORETICHE DELLO STESSO AMPLIFICATO**



sbilanciamento dei picchi con inversione degli stessi, perdita di alleli ("*drop-out*") o presenza di un picco aggiuntivo ("*drop-in*", cfr. tracciati elettroforetici I-II corsa, *Sep 2008*)

Negli elettroferogrammi prodotti **non sono presenti né il controllo negativo** che avrebbe potuto indicare la presenza di una eventuale contaminazione, **né il controllo positivo** che avrebbe consentito di monitorizzare l'efficacia delle condizioni sperimentali prescelte.

Dall'analisi degli elettroferogrammi relativi alla campionatura B si deduce che il quantitativo di DNA estratto ed amplificato dovesse essere molto scarso e rientrasse nella definizione di **Low Copy Number (LCN)** o **Low-Template DNA (LT-DNA)**

LOW COPY NUMBER (LCN) O LOW TEMPLATE DNA (LT-DNA)

La tecnica conosciuta come LCN viene riferita all'analisi di campioni contenenti valori inferiori a 200 pg di DNA, valore associabile alle quantità di DNA descritte da diversi Autori quale soglia stocastica per la tipizzazione convenzionale degli STR.

Per fenomeno stocastico si intende un processo il cui esito non può essere determinato con certezza a priori perché soggetto alle leggi della probabilità.

L'entità delle fluttuazioni statistiche diviene rilevante rispetto alla quantità del materiale che si ha a disposizione.

Queste quantità soglia di DNA sono basate su una quantità di DNA templatato con la quale si evidenziano in maniera esagerata sbilanciamento dell'altezza dei picchi, drop-out ed incremento di contaminazione da laboratorio (*Gill P. et al., 2006*).

1. Metodiche di tipizzazione LCN

Esistono numerose alternative per procedere alla tipizzazione LCN aumentando la sensibilità dell'analisi. Queste comprendono: aumento del numero di cicli di PCR ; Nested PCR; riduzione del volume di PCR; Whole Genome Amplification pre-PCR; potenziamento del segnale proveniente dal marcatore fluorescente; uso di formammide di maggiore purezza nella preparazione del campione per l'elettroforesi capillare; lavaggio post-PCR al fine di rimuovere gli ioni che competono con il DNA durante l'iniezione elettrocinetica; aumento del tempo di iniezione.

A causa delle importanti limitazioni della tipizzazione di campioni contenenti basse concentrazioni di DNA, molti scienziati richiedono cautela nella pratica e nell'interpretazione di LCN (*Gill P. et al., 2000; Gill P., 2001; Kloosterman A.D. et al., 2003; Budowle B. et al., 2009*).

Budowle B. et al. (2009) *richiamano alla prudenza e suggeriscono l'uso del LCN esclusivamente nei casi di identificazione di persone scomparse (incluso le vittime di disastri di massa) e a fini di ricerca. I predetti Autori sconsigliano, invece, l'uso delle attuali metodiche LCN in procedimenti penali, poiché le metodiche, le tecnologie e le raccomandazioni attuali non consentono ancora il superamento delle problematiche che caratterizzano la tipizzazione LCN.*

2. Procedure di laboratorio

Vengono riconosciute come importanti ed efficaci tutte le pratiche finalizzate alla *minimizzazione della contaminazione indotta dal laboratorio* stesso, come ad esempio l'uso di attrezzature pressurizzate, appropriato vestiario da laboratorio, l'analisi di un campione alla volta, l'utilizzo di strumenti e materiali privi di DNA, nonché le pratiche di decontaminazione (esposizione ai raggi UV e/o ossido di etilene) (*Shaw K. et al., 2008*). Purtroppo tali misure di sicurezza non sono state ancora ufficialmente introdotte nei protocolli per la raccolta e manipolazione dei reperti (*Caddy B. et al., 2009: The Queen v Sean Hoey. Neutral Citation Number [2007] NICC 49*); a tale proposito viene, infatti, segnalata la necessità urgente di un training specifico riguardo le procedure di campionamento da parte dei primi soccorritori e investigatori sulla scena del crimine.

3. Problemi associati a basse quantità di templatato

Punti fondamentali del problema relativo alla bassa quantità di templatato:

- **EFFETTI STOCASTICI,**
- **SOGLIA DI RILEVAZIONE,**
- **INTERPRETAZIONE DEL PROFILO,**
- **DROP-OUT ALLELICO E SBILANCIAMENTO DEI PICCHI ETEROZIGOTI,**
- **STUTTER,**
- **CONTAMINAZIONE,**
- **ANALISI DEI REPLICATI,**
- **CONTROLLI APPROPRIATI,**
- **LIMITAZIONI DI APPLICAZIONE**

- Effetti stocastici

(Processo il cui esito non può essere determinato con certezza a priori perché soggetto alle leggi della probabilità.

L'entità delle fluttuazioni statistiche diviene rilevante rispetto alla quantità del materiale che si ha a disposizione)

A causa della cinetica del processo di PCR, una bassa quantità di template iniziale sarà soggetta ad effetti stocastici; infatti l'attacco del primer può non avvenire allo stesso modo per ogni allele ad un dato locus durante i primi cicli e pertanto si potrà notare un notevole sbilanciamento tra prodotti allelici o, in alcuni casi, la perdita totale di uno od entrambi gli alleli. In altre parole, un DNA template con le caratteristiche di LCN in una PCR potrà manifestare fenomeni stocastici di amplificazione visibili sia come sostanziale sbilanciamento di due alleli ad un dato locus eterozigote che come drop-out allelico o aumento delle stutter.

- Soglia di rilevazione

- Solitamente, per la PCR è raccomandato l'utilizzo di DNA in quantità tali da ridurre gli effetti stocastici a livelli gestibili;
- Un'altezza (o area) minima dei picchi, stabilita da studi di validazione interni al singolo laboratorio, serve pertanto come controllo stocastico ed **i picchi che appaiono al di sotto di tale soglia non devono essere interpretati o possono esserlo con estrema cautela e per scopi ben limitati;**
- Attualmente non esiste quindi un valido metodo per stabilire una soglia per la tipizzazione LCN e questo continuerà ad essere uno dei maggiori punti deboli dell'applicazione

- Interpretazione del profilo

- I due fattori che influenzano la robustezza della tipizzazione LCN sono gli effetti stocastici e la sensibilità di rilevazione. I protocolli proposti per l'interpretazione di profili generati da LCN considerano, quindi, questi elementi caratteristici (*Gill P. et al., 2000*), ma mentre tali linee guida suggerite per l'interpretazione sono basate su studi di profili da una singola sorgente usando campioni pressoché ottimali, la scarsa qualità che spesso caratterizza i campioni di interesse forense e le misture aumentano i problemi di interpretazione dei dati LCN;
- **Ad oggi non sono state ancora descritte delle linee guida ben sviluppate per l'interpretazione di LCN nei casi di misture.** Poiché molti campioni da contatto sono misture (*Gill P., 2001; Caddy B. et al., 2009*), tale lacuna negli studi di validazione e nelle linee guida interpretative deve essere considerata una seria carenza.

- Drop-out allelico

Il drop-out allelico è il fenomeno correlato alla tipizzazione LCN più semplice da descrivere. Se ad esempio un allele 15 viene osservato nella prova LCN, allora sulla base di quella prova ogni individuo omozigote per l'allele 15 oppure eterozigote 15, X (dove X può essere qualunque allele) non può essere escluso come potenziale contributore per quel campione.

La $p(D)$ è basata sull'osservazione sperimentale. Tuttavia è difficile giustificare $p(D)$ basandosi esclusivamente su studi sperimentali usando campioni ottimali e applicando tale calcolo ad ogni singolo caso reale. Il drop-out è, infatti, correlato sia alla quantità che alla qualità del campione in esame. Questi parametri sono spesso indefinibili nei campioni LCN e sono specifici per ogni singolo campione.

Il drop-out allelico non può essere chiamato in causa solo sulla base di studi di validazione controllati condotti in laboratorio e quindi ulteriori ricerche devono necessariamente essere portate avanti prima di poter fornire dei valori di $p(D)$.

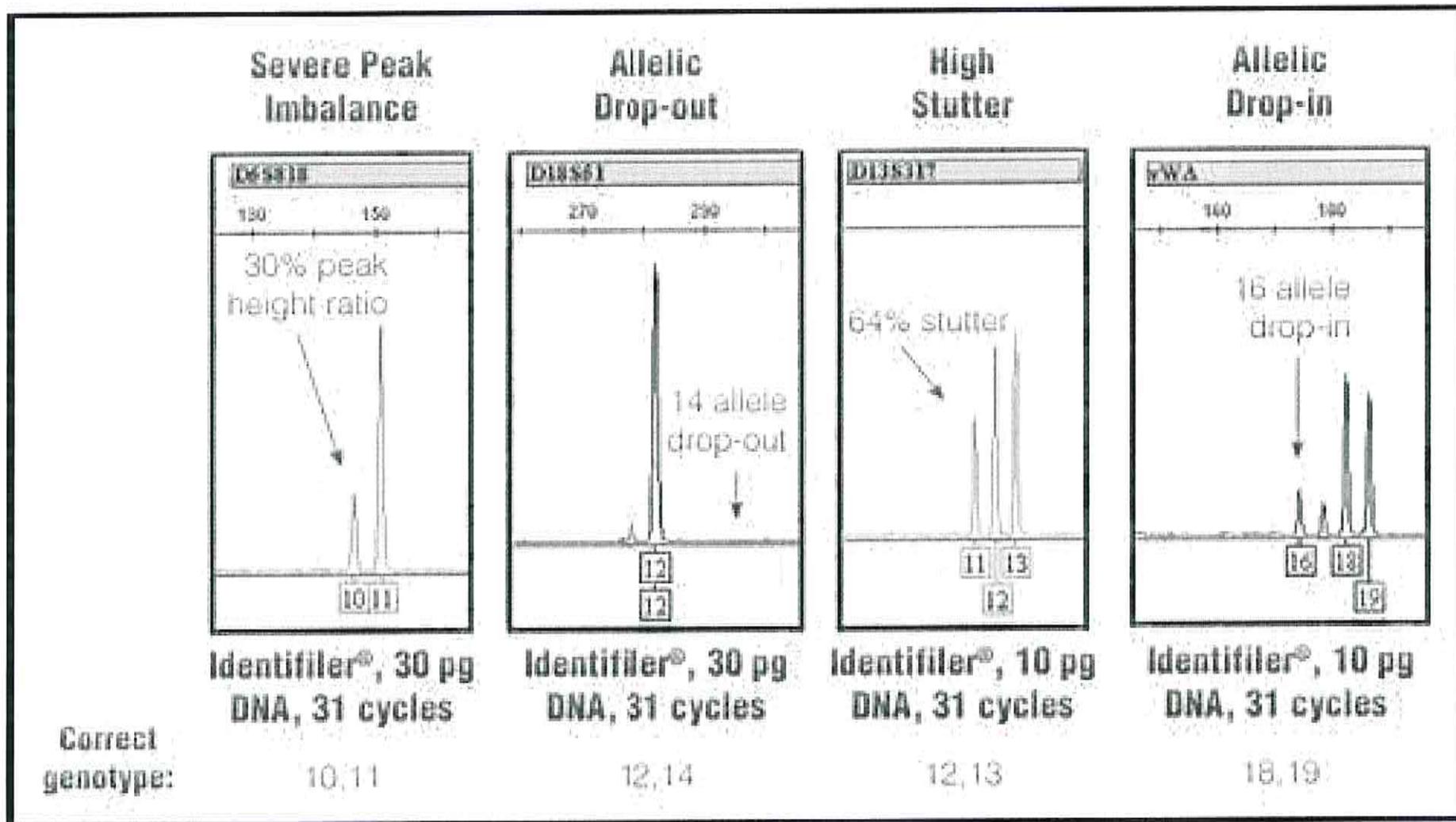
- Stutter

Le **stutter** sono dei picchi aspecifici dovuti alla produzione, durante la PCR, di un prodotto di amplificazione più corto di una ripetizione rispetto al corrispondente allele.

Il meccanismo di formazione delle stutter è il seguente: durante la replicazione i due filamenti di DNA si appaiano e la polimerasi allunga quello in posizione 5'→3'. Può capitare a volte che in uno dei due filamenti una ripetizione resti spaia e i due filamenti risultino sfalsati. Nella maggior parte dei casi la ripetizione spaia si trova sul filamento che funge da stampo, per cui il filamento neosintetizzato presenterà una ripetizione in meno.

La presenza di stutter influenza l'interpretazione dei profili genetici, soprattutto nel caso in cui due o più individui possano aver contribuito al profilo della traccia in esame (traccia mista).

Durante la generazione di profili STR da LCN, **il valore percentuale di stutter è variabile e assolutamente non informativo in quanto un picco di stutter può sorpassare l'altezza o l'area del picco allelico associato** (*Gill P. et al., 2000, Gill P., 2001*). Sebbene alcuni ricercatori (*Gill P. et al., 2000*) abbiano tentato di definire la probabilità di stutter attraverso calcoli statistici, la probabilità di stutter ed il valore percentuale rispetto al vero allele non possono essere predetti; è, infatti, possibile che un picco di stutter possa evidenziarsi due volte in analisi replicate e pertanto interpretato come un vero allele. La probabilità che una stutter sia evidenziabile due volte in analisi replicate non è ancora stata studiata approfonditamente e si attendono inoltre raccomandazioni sull'interpretazione delle stutter in campioni misti.



Effetti stocastici che avvengono casualmente durante l'amplificazione di basse quantità di DNA con un aumentato numero di cicli di PCR (Butler J.M.).

- Contaminazione

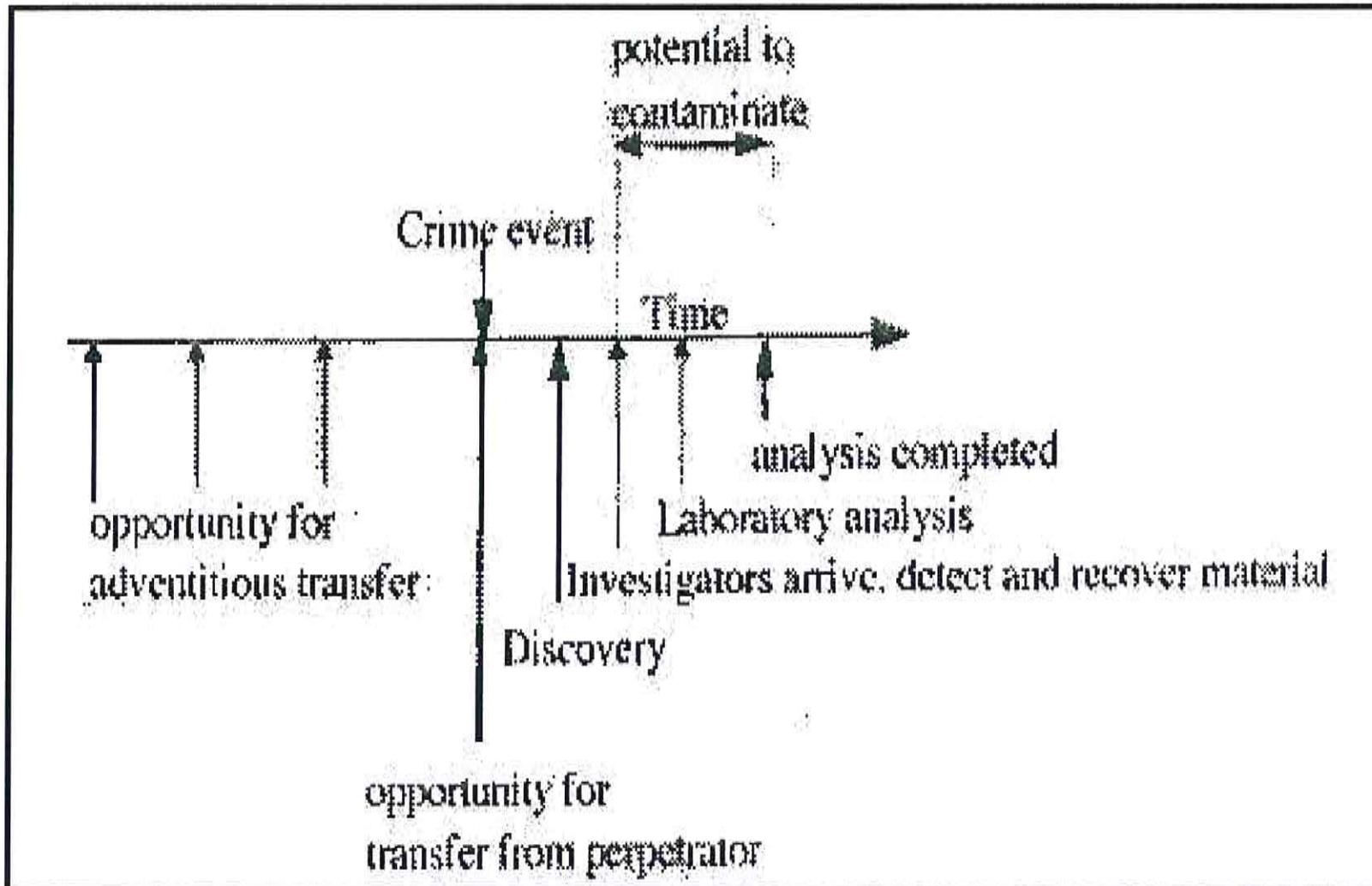
La Commissione DNA della ISFG nelle sue raccomandazioni per l'interpretazione delle misture dà la seguente definizione di contaminazione: *“DNA introdotto dopo il crimine e a partire da una sorgente non correlata alla scena del crimine: gli investigatori, i tecnici di laboratorio, lo strumentario del laboratorio”*.

Questa è una definizione molto ristretta della sorgente di contaminazione, in realtà DNA contaminante a basso livello può derivare dai reagenti e da altri prodotti di consumo del laboratorio, dal personale del laboratorio stesso e **da contaminazione crociata da campione a campione.**

Molti campioni LCN sono campioni da contatto e pertanto bassi livelli di DNA possono ad esempio essere evidenziati nel reperto a partire da contaminazione ambientale sulla scena del crimine. La contaminazione può, altresì, verificarsi durante il campionamento e la manipolazione dei campioni. Pertanto, la comparsa di drop-in allelico può essere sia intrinseco ai campioni che indotto durante il campionamento sulla scena del crimine. La predizione della probabilità di drop-in basata esclusivamente su dati sperimentali può, pertanto, non essere utile riguardo la simulazione delle circostanze nelle quali il drop-in può essersi verificato.

- **Affermazioni sul profilo ricavato dal campione in esame** riguardo la determinazione di quale sia un vero allele e quale un drop-in **devono essere necessariamente pronunciate senza conoscere quale sia il profilo del sospettato; solo così può essere, infatti, garantito un approccio qualitativamente ineccepibile ed equilibrato nell'interpretazione del profilo emergente dal campione in esame;**
- **L'interpretazione del profilo ottenuto dal campione effettuata avendo a disposizione il profilo di riferimento del sospettato è indicativo di disequilibrio ed è in pieno contrasto con la natura assolutamente oggettiva delle scienze forensi;**
- **A causa dei limiti della tipizzazione LCN occorre quindi estrema attenzione a non oltrepassare le pratiche di interpretazione di qualità al fine di garantire la minimizzazione dell'errore interpretativo.**

Gill P. e Buckleton J.S. (2010) sottolineano come le loro definizioni ed analisi non si limitino alle sole fasi di lavorazione nel laboratorio ma comprendano le fasi del trasferimento dalle sorgenti alla scena del crimine, all'unità di repertazione delle prove ed alla stessa unità del DNA:



Gill P. e Buckleton J.S. sottolineano, ancora, che un aspetto fondamentale è quello relativo al peso della prova, la quale può nascere attraverso tre principali modalità:

- a) in modo cosiddetto “innocente”;**
- b) come risultato dell’evento criminoso stesso;**
- c) come risultato di contaminazione o trasferimento involontario (Gill P., 2002).**

Opinione pubblica generalizzata che “se la prova del DNA corrisponde con il sospettato allora deve essere lui il colpevole del reato”, con percezione che la mancata condanna significhi fallimento della scienza: estremamente pericoloso ed è quindi fondamentale diffondere l’idea che la condanna o meno di un sospettato sia una questione irrilevante per lo scienziato, la cui responsabilità deve essere soltanto quella di illustrare correttamente la prova nel contesto dello specifico caso in esame.

La questione di quale sia stata la effettiva modalità di trasferimento del DNA del sospettato sul reperto stesso deve essere quindi valutata dal giudice e non dallo scienziato, il cui ruolo principale è quello di spiegare le varie possibili modalità di trasferimento esistenti nonché i relativi rischi ad ognuna di esse associati (Gill P., 2002).

“Precauzioni contro la contaminazione” suggerite da Butler J.M. (2009) nei casi di campioni di materiale biologico contenenti basso quantitativo di DNA: La sensibilità della PCR richiede una costante attenzione da parte dello staff del laboratorio per assicurare che la contaminazione non abbia effetti sulla tipizzazione del DNA. **La contaminazione delle reazioni di PCR è sempre un problema perché la tecnica è molto sensibile per le basse quantità di DNA. Un operatore preparando la reazione di PCR può inavvertitamente aggiungere il proprio DNA alla reazione se non attento. Allo stesso modo, l'ufficiale di polizia o il tecnico sulla scena del crimine al momento della raccolta delle prove può contaminare il campione se non ha preso adeguate precauzioni.** Per questo motivo ogni campione di prova dovrebbe essere prelevato con pinzette pulite ovvero manipolato con guanti monouso che devono essere cambiati frequentemente.

Al fine di evidenziare la **contaminazione indotta dal laboratorio** ognuno in un laboratorio di DNA forense deve essere tipizzato, al fine di aver un registro di tutti i possibili profili di DNA contaminanti (data base di eliminazione dello staff).

Il personale di laboratorio dovrebbe essere appropriatamente coperto, durante le interazioni con i campioni precedenti l'amplificazione PCR. Le protezioni appropriate includono camici e guanti così come mascherine e cuffie al fine di evitare che cellule cutanee o capelli cadano nelle provette di amplificazione.

Queste precauzioni sono particolarmente importanti quando si lavora con minime quantità di campione o con campioni degradati.

Alcune delle precauzioni utili per evitare la contaminazione nelle reazioni PCR nell'ambiente di laboratorio sono:

- ✓ Le aree di lavorazione pre e post PCR dovrebbero essere fisicamente separate;
- ✓ Lo strumentario così come le pipette e i reagenti per la PCR dovrebbero essere tenuti separati dagli altri strumenti di laboratorio, in particolare quelli usati per l'analisi dei prodotti di PCR;
- ✓ Guanti monouso dovrebbero essere indossati e cambiati frequentemente;
- ✓ Le reazioni dovrebbero essere preparate sotto una cappa aspirante, se disponibile;
- ✓ Dovrebbero essere usati puntali aerosol-resistenti che dovrebbero essere cambiati per ogni campione al fine di prevenire cross-contaminazione durante il trasferimento dei liquidi;
- ✓ I reagenti dovrebbero essere preparati con attenzione al fine di evitare la presenza di qualsiasi DNA o nucleasi contaminanti;
- ✓ L'irradiazione ultravioletta della zona di preparazione della PCR quando la stessa area non è in uso così come la pulizia delle aree di lavoro e dello strumentario con isopropanolo e/o soluzioni di candeggina al 10% aiutano ad assicurare che molecole di DNA estraneo siano distrutte prima dell'estrazione del DNA o della preparazione della PCR

- Controlli

Un ulteriore problema caratteristico della tipizzazione LCN è quello relativo al numero e al tipo di campioni di controllo che dovrebbero essere utilizzati. Ad esempio, ancora non si è discusso riguardo il numero di controlli negativi che dovrebbero essere analizzati per verificare la sporadicità del drop-in. Inoltre, dovrebbe essere chiarito meglio che cosa sia da considerare un controllo positivo: dovrebbe essere ragionevole che i controlli positivi siano della stessa quantità del DNA presente nel campione da esaminare, cosa, in pratica, molto difficile poiché la quantità di DNA in un campione è sconosciuta e difficilmente approssimabile per campioni misti.

- Limiti della tipizzazione LCN

A causa delle minime quantità di DNA contenute nei campioni LCN e dell'estrema sensibilità del metodo (dovuta fondamentalmente al “potenziamento” del protocollo di PCR e di elettroforesi capillare), livelli di DNA presenti in “background” così come DNA da contatto casuale possono essere in tal modo evidenziati, pertanto profili che eventualmente emergono da tali analisi possono non essere affatto riferibili allo specifico caso in esame.

- **Budowle B. et al. (2009)** affermano, inoltre, la necessità di rendere edotta la Comunità Scientifica Internazionale delle limitazioni e problematiche correlate alle tecniche di LCN, affinché tutti coloro che si trovino coinvolti in uno specifico caso investigativo e giudiziario siano a conoscenza dei rischi e dei limiti che possono inficiare i risultati delle indagini.
- **Publicizzare il potenziale applicativo della tipizzazione LCN senza descriverne i limiti non rappresenta l'assunzione di un ruolo responsabile da parte del genetista forense.**

1. la tipizzazione LCN non è una tecnica riproducibile e questo limite deve sempre essere ben evidenziato nelle relazioni;
2. la contaminazione da manipolazione è possibile e tale possibilità deve essere sempre considerata;
3. un campione concentrato può fornire all'analisi dei risultati migliori rispetto ai replicati i quali usano la ridondanza allelica a fini interpretativi;
4. il numero e il tipo dei controlli utilizzati dovrebbe essere chiaramente definito e a questi dovrebbe essere attribuita una affidabilità quantitativa o qualitativa;
5. linee-guida di interpretazione non sono ad oggi ben definite e quelle esistenti riguardano solo i campioni da unica sorgente mentre l'interpretazione delle misture non è stata ancora validata;
6. la contaminazione o drop-in allelico può avere diverse origini;
7. a causa dell'aumentata sensibilità della metodica, il trasferimento secondario non può essere escluso come possibile spiegazione per i risultati di tipizzazione LCN ottenuti;
8. kit per gli STR, reagenti ed altri materiali possono non essere stati sottoposti ad efficaci controlli di qualità al fine di riconoscere un'eventuale contaminazione da DNA estraneo;
9. interpretazioni statistiche e dati di supporto per il calcolo delle probabilità hanno bisogno di essere meglio definiti e sviluppati al fine di colmare l'incertezza associata con la tipizzazione LCN;
10. poiché l'analisi fornisce risultati da campioni infinitesimali, l'origine tissutale del DNA non può, ad oggi, essere desunta.

Riassumendo:

La quantificazione è di fondamentale importanza poiché in presenza di un quantitativo di DNA inferiore a 200 pg/ μ l si rientra nella definizione di **Low Copy Number (LCN)** per la quale sono raccomandati, dalla Comunità Scientifica Internazionale, protocolli mirati all'ottenimento di risultati attendibili dal punto di vista scientifico.

Poiché sono numerosi i problemi che insorgono dall'analisi di quantità sub-ottimali di DNA (sbilanciamento dei picchi, drop-in, drop-out) Autori diversi hanno proposto approcci scientifici in gran parte sovrapponibili che possano rendere più agevole l'interpretazione dei dati ottenuti: il **problema principale dei campioni LCN** è la **contaminazione** del reperto. Devono essere applicati adeguati *protocolli nelle procedure di sopralluogo* al fine di minimizzare la *contaminazione ambientale* sulla scena del crimine e rigidi *protocolli di raccolta e campionamento dei reperti* al fine di minimizzare la *contaminazione da manipolazione* sulla scena del crimine. Parimenti rigorose sono le procedure da tutti raccomandate per ridurre la *contaminazione nel laboratorio* in quanto DNA contaminante a basso livello può derivare dai reagenti e da altri materiali di consumo, dal personale stesso e da contaminazione crociata da campione a campione.

Altro elemento fondamentale riguarda il procedimento da seguire per un'affidabile **interpretazione dei risultati** e per la designazione di un allele in un campione LCN. Il procedimento riconosciuto valido dalla Comunità Scientifica Internazionale è dato dall'**analisi dei replicati** (suddivisione del campione in 2 o più aliquote e vanno considerati alleli solo quei picchi che si ripetono in almeno 2 su 3 replicati): l'osservazione di un allele per più volte aumenta l'affidabilità che esso sia effettivamente derivato dal campione in esame, **assumendo che durante la fase di campionamento non si sia verificata contaminazione.**

La maggior parte degli scienziati che lavorano su LCN sottolineano la **NECESSITÀ DI EFFETTUARE 2-3 REPLICATI** ed affermano che **UN ALLELE DEVE ESSERE OSSERVATO ALMENO DUE VOLTE PER POTER ESSERE DENOMINATO COME TALE:** la ridondanza allelica è a tutt'oggi la metodica riconosciuta ed accettata, ed è alla base dell'affidabilità della tipizzazione LCN.

Replicate Amplification with Consensus Profile

Low amount of DNA examined

*Stochastic
effects*

Amplification #1
Amplification #2
Amplification #3

Consensus Profile Developed
(from repeated alleles observed)

Interpretation Rules Applied
(based on validation experience)
e.g., specific loci may drop out more

**Result can be and usually is
reliable and reproducible**

Single Amplification

Low amount of DNA examined

*Stochastic
effects*

Amplification #1
(only a single test)

**Result can be
unreliable**

Confronto tra approcci diversi nell'analisi di basse quantità di DNA. L'amplificazione di replicati con sviluppo di un profilo di consenso e l'applicazione di regole interpretative basate sull'esperienza di validazione possono portare a risultati affidabili (Butler J.M.).

E' possibile che il prodotto di PCR di un LCN possa evidenziare risultati che provengono da un DNA amplificato che contamina un campione non ancora amplificato: per questo motivo **i campioni in esame devono essere usualmente lavorati in laboratorio prima dei campioni di riferimento al fine di evitare qualsiasi possibilità di contaminazione della prova con DNA già amplificato.**

IL REPERTO 36 È STATO INSERITO, PER LE ANALISI, IN UN CONTESTO OVE ERA GIÀ STATO ESAMINATO UN NUMERO RILEVANTE DI CAMPIONI APPARTENENTI ALLA VITTIMA, PERTANTO, NON SI PUÒ ESCLUDERE CHE POSSA ESSERSI VERIFICATA UNA CONTAMINAZIONE CON LE MODALITÀ SOPRACCENNATE tanto più che non sono stati esibiti i controlli negativi che avrebbero dovuto essere amplificati contestualmente e che avrebbero potuto dare una indicazione sull'assenza di fenomeni di contaminazione.

MODALITA' DI REPERTAZIONE COLTELLO CASA SOLLECITO

CONSIDERAZIONI SULLE INDAGINI DI GENETICA FORENSE SVOLTE DALLA POLIZIA SCIENTIFICA SUL REP. 36 (COLTELLO)

- In merito alla natura del materiale repertato **non sussistono elementi scientificamente probanti la possibile natura ematica della traccia B** (lama del coltello) in quanto sia la diagnosi generica di sangue sia la diagnosi di specie umana sono risultate negative.
- Altrettanto **priva di basi scientifiche è la presenza di presunte cellule di sfaldamento** sulle campionature effettuate sull'impugnatura del coltello.

Tenuto conto che nel caso specifico:

- Non risulta che le modalità di sopralluogo siano state eseguite secondo i protocolli internazionali al fine di minimizzare la contaminazione ambientale;
- Non sono stati applicati i protocolli internazionali di raccolta e campionamento del reperto al fine di minimizzare la contaminazione da manipolazione;
- Non è noto se nel laboratorio siano state applicate le rigorose procedure di decontaminazione al fine di minimizzare la contaminazione da laboratorio;
- Non è stato impiegato un metodo affidabile per la quantificazione del DNA sulle tracce A-B-C e la quantificazione eseguita con Fluorimetro Qubit™ ha fornito, per le tracce B-C un risultato “too low” indicativo della presenza di un quantitativo di DNA al di sotto della soglia di sensibilità del Fluorimetro (<200 pg/μl) e quindi indicativo della presenza di un reperto verosimilmente LCN;

- **dai tracciati elettroforetici esibiti si evince che il campione indicato con la lettera B (lama del coltello) doveva essere considerato un campione LCN (sbilanciamento dei picchi, RFU al di sotto di 50 per la maggior parte degli alleli) ed in quanto campione LCN avrebbero dovuto essere applicate tutte le cautele indicate dalla Comunità Scientifica Internazionale tra le quali ricordiamo:**
 - a) **rigoroso rispetto delle modalità di decontaminazione dello strumentario , del laboratorio e del personale stesso (come già detto, non sono riportate la procedure adottate per minimizzare la contaminazione);**
 - b) **analisi del reperto in un laboratorio ove non erano stati analizzati i reperti ascrivibili alla vittima, al fine di evitare qualsiasi possibilità di contaminazione della prova con DNA già amplificato. Per contro è stato riferito che il reperto è stato inserito per le analisi in un contesto ove erano già stati esaminati un numero rilevante di campioni appartenenti alla vittima;**
 - c) **esecuzione di 2-3 amplificazioni di replicati con sviluppo di un profilo di consenso. Nel caso in esame l'amplificazione è stata eseguita una sola volta;**
 - d) **impiego di controlli negativi nella procedure di amplificazione al fine di verificare la presenza di contaminazione: negli elettroferogrammi allegati non sono riportati né i controlli negativi né i controlli positivi.**

E' del tutto carente la documentazione in atti relativa alla **tracciabilità** delle operazioni analitiche eseguite. In particolare:

- Per quanto riguarda le analisi di **quantificazione** del DNA, sia nella Relazione Tecnica Indagini di Genetica Forense (RTIGF) sia in sede GUP, la CT ha ripetutamente affermato di avere eseguito la quantificazione *mediante Real Time PCR su tutte le campionature* effettuate sul coltello, *ma questa affermazione è smentita dalla documentazione prodotta*: in realtà per le campionature A-B-C è stato utilizzato il *Fluorimetro QubitTM* ;
- In merito all'estratto ottenuto dalla campionatura B (lama del coltello), si evince che tale estratto è stato ripetutamente concentrato ma non è riportato in alcuno dei documenti il procedimento predetto

Si possono trarre le seguenti CONCLUSIONI:

▪ relativamente alla campionatura A (impugnatura del coltello: cod. identificativo 47329): si concorda con la conclusione cui è giunta la CT circa l'attribuzione del profilo genetico ottenuto da tale campionatura a Knox Amanda Marie;

▪ relativamente alla campionatura B (lama del coltello: codice identificativo 47330): non si condividono le conclusioni circa la certa attribuzione del profilo rilevato sulla traccia B alla vittima Kercher Meredith Susanna Cara poiché il profilo genetico, così come ottenuto, appare inattendibile in quanto non supportato da procedimenti analitici scientificamente validati.

Né, per quanto precedentemente esplicitato, si può escludere che il risultato ottenuto da tale campionatura possa derivare da fenomeni di contaminazione verificatasi in una qualunque fase della repertazione e/o manipolazione e/o dei processi analitici eseguiti.

ANALISI DI LABORATORIO RIPORTATE
NELLA RTIGF RELATIVE AL REP.165 B

Il Rep.165B è così descritto a pag. 13 della RTIGF “*Gancetto di reggiseno con piccola porzione di stoffa annessa di colore bianco, macchiata di presunta sostanza ematica, rinvenuto nella stanza della vittima (già Rep. Y)*”.

Dalla scheda dello **Stato Avanzamento Lavori (SAL)** si evince che al Rep.165B (N. 2 Tracce) è stato attribuito un codice identificativo (*Codice Sample ID*) di seguito riportato: **Codice Sample ID= 48896**

Sono riportate, inoltre, (cfr. SAL) le seguenti informazioni:

Tipo di Traccia: **PRESUNTA SALIVA**

Descrizione Traccia: **Presunte cellule di sfaldamento–B (ganci)**

Quantità estratto: 50

Ubicazione estratto: 271/F1

Analisi eseguite

Data 1[^] estrazione: 29-12-07

Si evince dalla SAL che sul Rep.165B non è stata eseguita la diagnosi generica di sangue, mediante il test della tetrametilbenzidina (TMB), né è stata eseguita alcuna indagine di laboratorio atta ad evidenziare la presenza di materiale biologico di natura non ematica.

ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando l'estrattore automatico *BioRobot "EZ1"* (*Qiagen*) (pag.201 della RTIGF).

Dalla Scheda Avanzamento Lavori (SAL) si evince che:

- l'estrazione del DNA dalle tracce 165B è stata eseguita in data 29-12-07;
- la "Quantità di estratto" era pari a 50 µl (cfr SAL).

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

A pag. 201 della RTIGF è riportata la seguente tabella:

Estrazione DNA BioRobot "EZ1" (QIAGEN)	traccia A sostanza ematica eseguita	traccia B presunte cellule di sfaldamento eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della Applied Biosystems	☑	☑

Da quanto riportato nella tabella si evince che la quantificazione del DNA è stata effettuata mediante Real Time PCR, utilizzando apparecchiatura *7700 Sequence Detector ABI PRISM™ (Applied Biosystems)*.

Non è riportata, invece, alcuna indicazione circa il kit utilizzato per detta quantificazione.

Dalla disamina dei rapporti di *Real Time PCR* esibiti risulta che la quantificazione mediante detta metodica è stata eseguita, in data 3 gennaio 2008, in due replicati che hanno fornito i seguenti valori:

48896 = 0.14

48896 = 0.09

Pertanto la media di DNA presente nel campione era pari a 0.115 ng/μl.

Tenuto conto che la “*quantità di estratto*” era 50 μl (cfr. SAL), moltiplicando 0.115 ng/μl x 50 μl, il DNA totale era pari a 5.75 ng, quantitativo certamente rilevante, che consentiva di ritenere positiva la traccia in esame.

AMPLIFICAZIONE STRs AUTOSOMICI

In merito alla successiva amplificazione del DNA estratto, a pag 201 della RTIGF, si legge testualmente:

“L’amplificazione degli STRs autosomici e del cromosoma Y è stata effettuata secondo le modalità già riportate a pag. 31, 33 e 34 sull’estratto relativo alla traccia B. La traccia A è stata invece sottoposta alla sola amplificazione degli STRs autosomici. Entrambi gli amplificati sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare”.

Tenuto conto di quanto riportato nella RTIGF (pag. 202) e dell’assenza di annotazioni specifiche nel SAL si deve ritenere che non sia stata apportata alcuna modifica alle indicazioni fornite dalla ditta produttrice del kit ovvero sia che sia stato impiegato un volume totale di 25 µl costituito rispettivamente da: *15 µl di Mix di amplificazione + 10 µl di DNA estratto.*

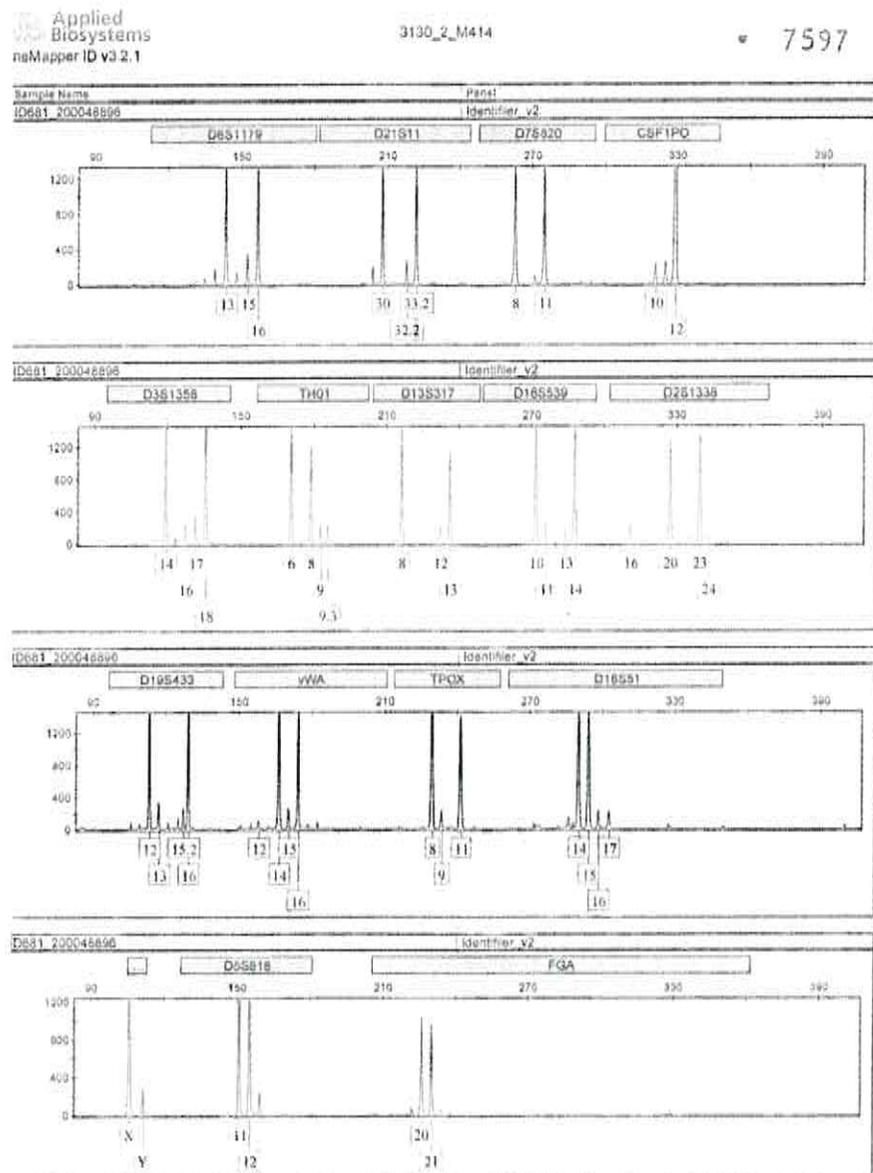
Pertanto, il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione PCR è stato di 1.15 ng ($0.115 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 1.15 \text{ ng}$), che rientra nel range suggerito dai kit (0.5-1.25 ng/µl di DNA templatato).

ELETTROFORESI CAPILLARE STRs AUTOSOMICI

Il prodotto di amplificazione degli *STRs autosomici* ottenuto dal Rep.165B è stato sottoposto ad elettroforesi capillare mediante strumentazione *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* utilizzando il software di analisi “*Gene Mapper*”.

Poiché non risulta dagli atti che sia stata apportata alcuna modifica al protocollo di elettroforesi si desume che le condizioni di corsa siano state quelle standard indicate dal kit.

Si riporta di seguito il tracciato relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla *campionatura 165B* datata "Jun 10, 2008 12:58 PM", allegata alla RTIGF:



Poiché in più marcatori é visibile un numero di picchi superiore a 2 la CT ha, giustamente, formulato l'ipotesi trattarsi “*di un profilo genetico (Tabella 165-I) derivante da **mistura di sostanze biologiche appartenenti ad almeno due individui dei quali almeno uno di sesso maschile***” (RTIGF, pag. 202).

Successivamente la CT conclude che “*Il confronto effettuato tra il genotipo derivante dalla traccia B del Rep.165 con quelli appartenenti a SOLLECITO Raffaele e KERCHER Meredith Susanna Cara ... ha fornito un risultato di **compatibilità**, cioè il profilo genetico mostrato in Tabella 165-I è compatibile con l'ipotesi di **mistura di sostanze biologiche** (presumibilmente cellule di sfaldamento) appartenenti a **SOLLECITO Raffaele ed a KERCHER Meredith Susanna Cara**”.*

	KERCHER M.S.C. + SOLLECITO R.
locus genetico	genotipo traccia B
D8S1179:	13, 15, 16
D21S11:	30, 32.2, 33.2
D7S820:	8, 11
CSF1PO:	10, 12
D3S1358:	14, 16, 17, 18
TH01:	6, 8, 9, 9.3
D13S317:	8, 12, 13
D16S539:	10, 11, 14
D2S1338:	16, 20, 23, 24
D19S433:	12, 13, 15.2, 16
HumvWA3:	12, 14, 15, 16
TPOX:	8, 9, 11
D18S51:	14, 15, 16, 17
D5S818:	11, 12
HumFGA:	20, 21
sexo	XY=mistura genetica

STUTTER: picchi aspecifici dovuti alla produzione, durante la PCR, di un prodotto di amplificazione più corto di una ripetizione rispetto al corrispondente allele. Durante la replicazione i due filamenti di DNA si appaiano e la polimerasi allunga quello in posizione 5'→3'; capita a volte che in uno dei due filamenti una ripetizione resti spaiata e i due filamenti risultino sfalsati. Nella maggior parte dei casi la ripetizione spaiata si trova sul filamento che funge da stampo, per cui il filamento neosintetizzato presenterà una ripetizione in meno.

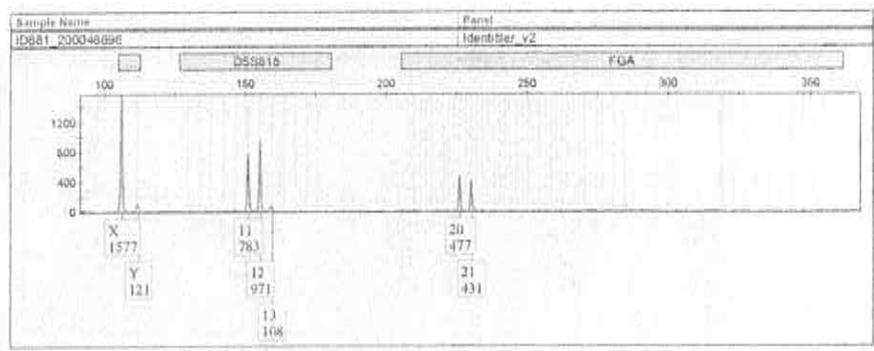
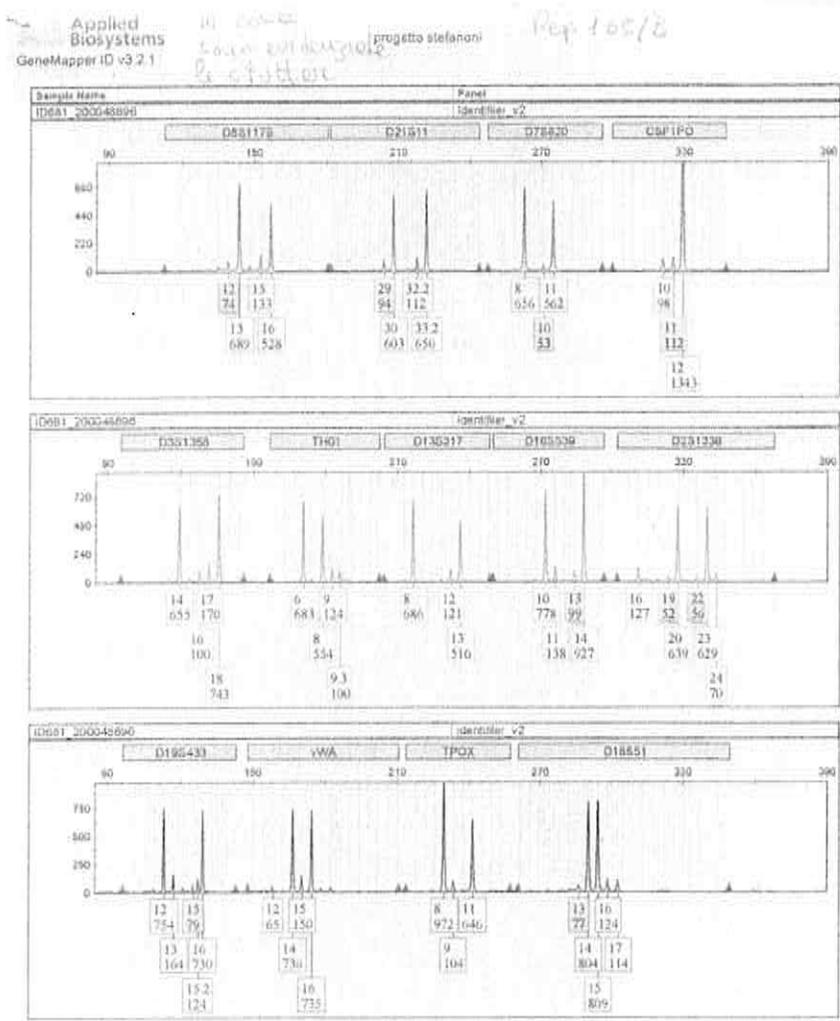
La presenza di stutter influenza l'interpretazione dei profili genetici, soprattutto nel caso in cui due o più individui possano aver contribuito al profilo della traccia in esame (traccia mista).

Poiché la presenza di più picchi in diversi marcatori indica che si è in presenza di un profilo misto e che la stessa CT conferma che esistono standard internazionali ***“che sono comunque delle raccomandazioni per l'interpretazione corretta quindi sono delle linee guida”***, è necessario ricordare quale sia la definizione e l'interpretazione delle stutter in una mistura riportata nelle Raccomandazioni della Società Internazionale di Genetica Forense (**“DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures”**; *P.Gill et al., For Sci Int., 90-101, 2006*) cui fa riferimento la CT.

“6. Treatment of stutter: Le caratteristiche delle bande stutter (una ripetizione in meno rispetto all'allele vicino) sono valutate in relazione alla misura dell'allele vicino associato.

L'area o l'altezza dei picchi stutter viene misurata come proporzione (Stp) dell'area o altezza dell'allele vicino. $Stp = \Phi_{stutter} / \Phi_{allele}$. In generale $Stp < 0.15$ ”

Si riporta di seguito l'elettroferogramma, datato *Sep 25, 2009 10:10 AM*, relativo all'interpretazione delle stutter eseguita dalla Dr.ssa Stefanoni, inviatoci dalla stessa, mediante CD-rom, in data 29 aprile 2011.

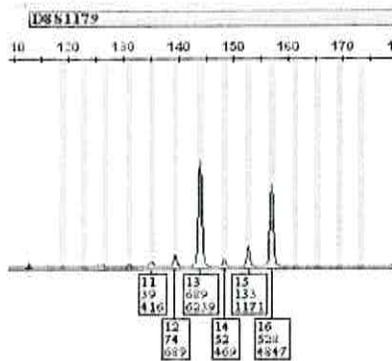


Al fine di valutare se l'interpretazione delle stutter nell'elettroferogramma allegato alla RTIGF sia stata effettuata, come affermato dalla CT, secondo gli "standard internazionali" e secondo quanto raccomandato dalla ISFG, è stato esaminato il tracciato elettroforetico, inviatoci dalla Dr.ssa Stefanoni, mediante e-mail, in data 10 maggio 2011, con le indicazioni relative all'altezza e alle aree di tutti i picchi presenti.

In tale tracciato non è riportata alcuna data di esecuzione della corsa elettroforetica ma dal confronto tra questo e l'elettroferogramma datato *Sep 25,2009 10:10 AM*, ove sono indicate le stutter, si osserva che i picchi presentano le stesse altezze, quindi si ritiene che il tracciato inviatoci in data 10 maggio 2011 si riferisca a quello datato *Sep 25,2009 10:10 AM*. Tuttavia dal confronto dei predetti elettroferogrammi con l'elettroferogramma allegato alla RTIGF (datato *Jun 10,2008 12:58 PM*), emergono difformità circa l'altezza dei picchi espressi in RFU (cfr. elettroferogrammi) in quanto nel tracciato allegato alla RTIGF i picchi presentano RFU superiori a 1200 mentre nei tracciati predetti (elettroferogramma del 10 maggio 2011, elettroferogramma datato *Sep 25,2009 10:10 AM*) i picchi presentano RFU nettamente inferiori a 1200.

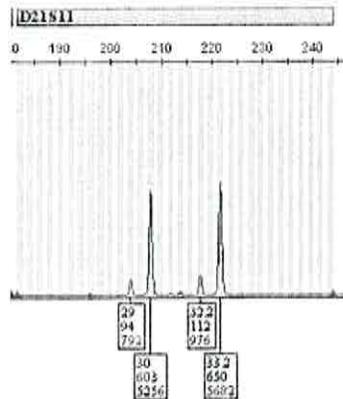
Verranno analizzati di seguito alcuni marcatori del DNA, già oggetto di contestazione, riportando per ognuno di essi i valori numerici relativi all'altezza dei picchi, altezza che verrà utilizzata per valutare, secondo le Raccomandazioni della Società Internazionale di Genetica Forense (ISFG), se i picchi presenti graficamente debbano essere interpretati come alleli o come stutter:

D8S1179



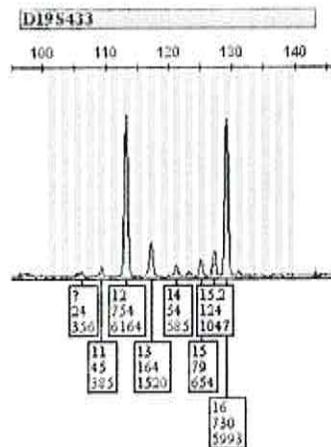
Picco 13 ↑ 689 = allele
 Picco 14 ↑ 52 (39.09% dell'allele 15) = allele
 Picco 15 ↑ 133 (25.18% dell'allele 16)= allele
 Picco 16 ↑ 528= allele

D21S11



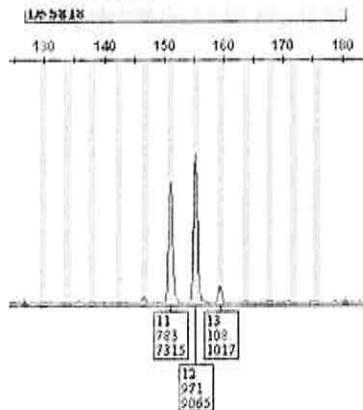
Picco 29 ↑ 94 (15.58% dell'allele 30) = allele
 Picco 30 ↑ 603 = allele
 Picco 32.2 ↑ 112 = allele
 Picco 33.2 ↑ 650 = allele

D19S433



Picco 12 ↑ 754 = allele
Picco 13 ↑ 164 = allele
Picco 14 ↑ 54 = allele
Picco 15.2 ↑ 124 = allele
Picco 16 ↑ 730 = allele

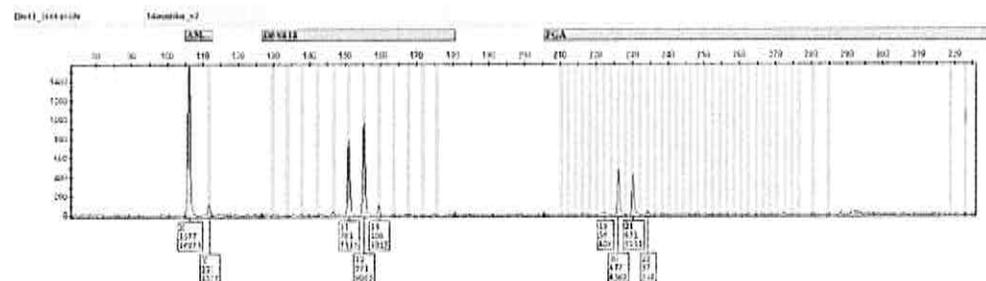
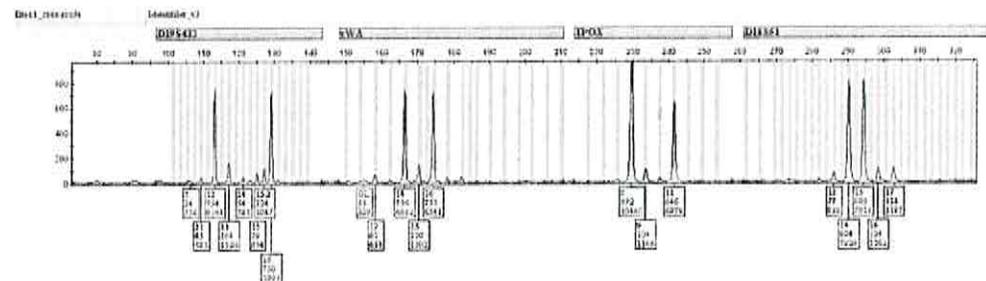
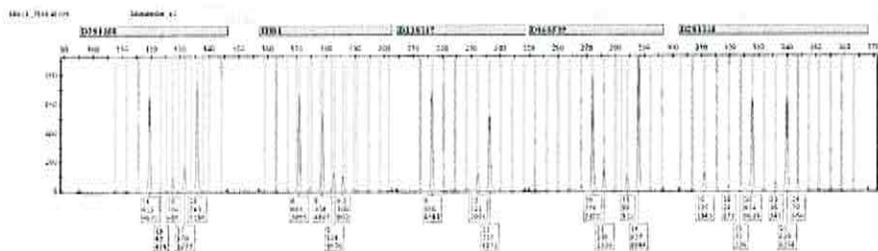
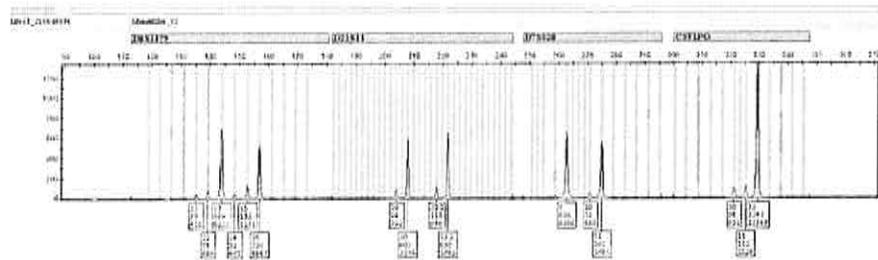
D5S818



Picco 11 ↑ 783 = allele
Picco 12 ↑ 971 = allele
Picco 13 ↑ 108 = allele (non posizione stutter)

Si può affermare che, relativamente ai marcatori D8S1179, D21S11, D19S433, D5S818, vi sia stata una **erronea interpretazione** dei picchi presenti nel tracciato elettroforetico in quanto sono stati **considerati stutter picchi la cui altezza era oltre 50 RFU (D19S433: picco 14 ↑ 54) o superavano la soglia del 15% dell'allele maggiore (D8S1179: Picco 14 ↑ 52 (39.09% dell'allele 15); D21S11: Picco 29 ↑ 94 (15.58% dell'allele 30) o non erano in posizione stutter (D5S818) e che, pertanto, dovevano essere considerati alleli.**

Applicando al caso in esame la **Raccomandazione n° 6 dell'ISFG**, (*qualora in una mistura gli alleli del contributore minore siano della stessa altezza o area delle stutter e quindi gli alleli e le stutter non siano distinguibili, dovrebbero essere inclusi nella valutazione gli alleli in posizione stutter che non supportano la tesi dell'accusa*) e tenuto conto dell'analoga considerazione circa il possibile verificarsi di drop-out allelico (*ISFG, punto n. 7*) ne deriva che tutti i picchi presenti nei singoli marcatori del DNA, così come riportati nell'elettroferogramma allegato, devono essere considerati alleli.



Anche qualora si volesse limitare l'applicazione della Racc. 6 a quei picchi >50 RFU in posizione stutter, *si evidenzia comunque un profilo dovuto alla commistione di più individui costituiti da un contribuente maggiore e da più contribuenti minori*, come riassunto nella tabella che si riporta di seguito:

DNA	RTIGF	Interpretazione elettroferogramma (ISFG: Racc. 6)	Interpretazione elettroferogramma (Racc. 6: solo picchi altezza superiore 50 RFU)
D8S1179	13 15 16	11-12-13-14-15-16	12-13-14-15-16
D21S11	30 32.2 33.2	29-30-32.2-33.2	29-30-32.2-33.2
D7S820	8 11	8-10-11	8-10-11
CSF1PO	10 12	10-11-12	10-11-12
D3S1358	14 16 17 18	14-15-16-17-18	14-16-17-18
TH01	6 8 9 9.3	6-8-9-9.3	6-8-9-9.3
D13S317	8 12 13	8-12-13	8-12-13
D16S539	10 11 14	10-11-13-14	10-11-13-14
D2S1338	16 20 23 24	16-18-19-20-22-23-24	16-19-20-22-23-24
D19S433	12 13 15.2 16	11-12-13-14-15-15.2-16	12-13-14-15-15.2-16
VWA	12 14 15 16	12-14-15-16	12-14-15-16
TPOX	8 9 11	8-9-11	8-9-11
D18S51	14 15 16 17	13-14-15-16-17	13-14-15-16-17
D5S818	11 12	11-12-13	11-12-13
FGA	20 21	19-20-21-22	20 21

AMPLIFICAZIONE DEL CROMOSOMA Y

In merito alla successiva amplificazione dell' estratto per il cromosoma Y, a pag 34 della RTIGF si legge testualmente:

*“Analogamente a quanto già riportato riguardo gli STRs autosomici (v. pag.31), allo scopo di ottenere il profilo genetico (aplotipo) del cromosoma Y, specifico del DNA di origine maschile, sono state amplificate le seguenti regioni geniche di interesse mediante l'impiego di coppie di oligonucleotidi-primers specifici per le regioni fiancheggianti i seguenti polimorfismi **DY3S391, DYS389I, DYS439, DYS389II, DYS438, DYS437, DYS19, DYS392, DYS393, DYS390, DYS385**, utilizzando il kit commerciale “Y-Filer” della Applied Biosystems (Foster City, CA) secondo le informazioni contenute nel relativo “User Manual”. I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare mediante strumentazione ABIPRISM 3130 Genetic Analyzer utilizzando il software di analisi “Gene Mapper”.*

Per quanto riguarda il kit **AmpFlSTR Yfiler**, le indicazioni fornite dalla ditta produttrice sono le seguenti:

N. campioni x 9.2 µl di AmpFlSTR Yfiler PCR Reaction Mix;

N. campioni x 0.8 µl di AmpliTaq Gold DNA Polymerase;

N. campioni x 5 µl di AmpFlSTR Yfiler Primer Set;

DNA 10 µl;

Volume finale della reazione 25 µl; range di concentrazione del DNA consigliato pari a 0.5-1.00 ng/µl.

Tenuto conto di quanto riportato nella RTIGF e dall'assenza di annotazioni specifiche nel SAL si deve ritenere che non sia stata apportata alcuna modifica alle indicazioni fornite dalla ditta produttrice del kit ovvero sia che sia stato impiegato un volume totale di 25 μl costituito da: *15 μl di Mix di amplificazione + 10 μl di DNA estratto.*

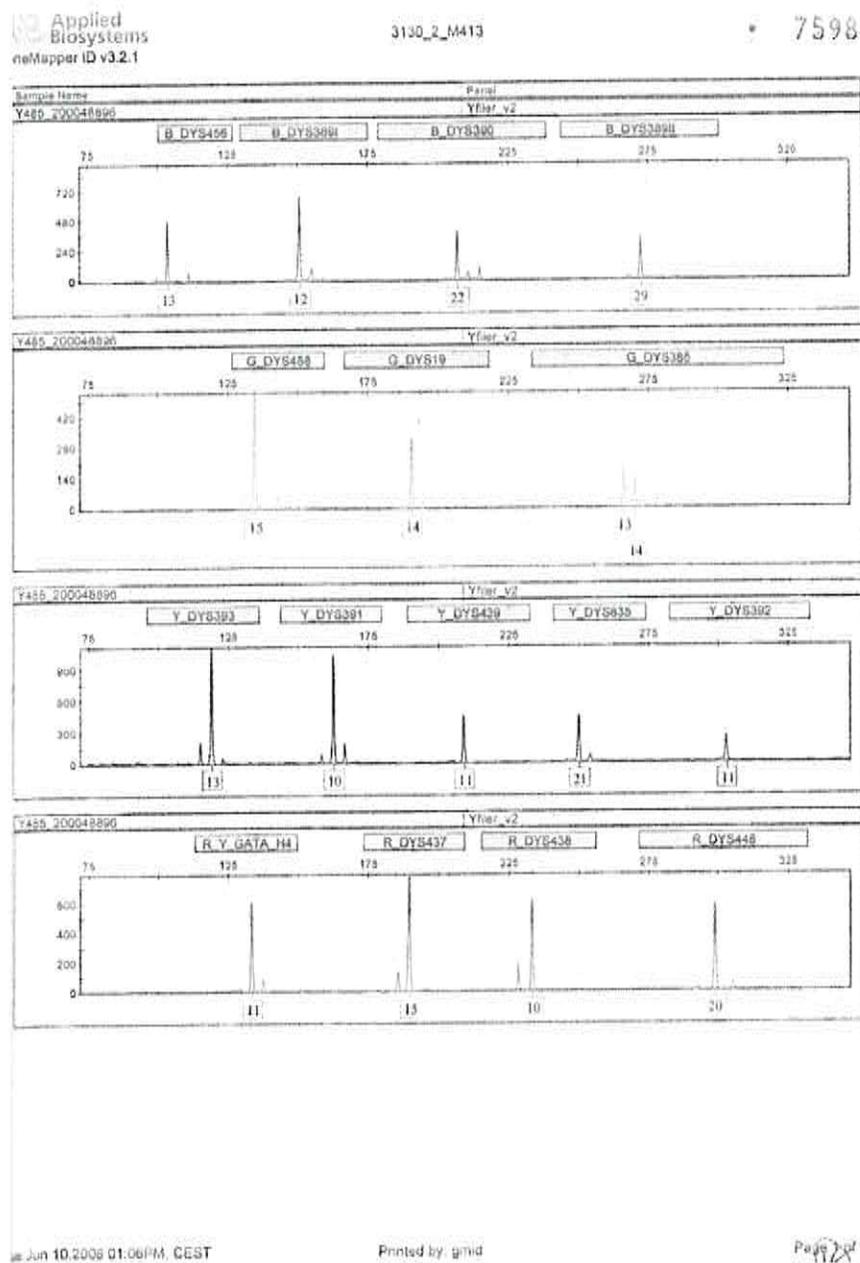
Pertanto, il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione PCR è stato di 1.15 ng ($0.115 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 1.15 \text{ ng}$), che rientra nel range suggerito dai kit (0.5-1.00 ng/ μl di DNA template).

ELETTROFORESI CAPILLARE

Il prodotto di amplificazione del cromosoma Y ottenuto dal Rep.165B è stato sottoposto ad elettroforesi capillare mediante strumentazione *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* utilizzando il software di analisi "*Gene Mapper*".

Poiché non risulta dagli atti che sia stata apportata alcuna modifica al protocollo di elettroforesi si desume che le condizioni di corsa siano state quelle standard indicate dal kit.

Si riporta di seguito il tracciato relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla campionatura 165B datata "Jun 10,2008 01:06 PM", allegata alla RTIGF:



La CT conclude che “L’analisi del cromosoma Y ha consentito di determinare l’aplotipo Y mostrato in **Tabella 165-II**, relativo al DNA estratto dalla traccia B. Anche tale risultato conferma la presenza di DNA appartenente a **SOLLECITO Raffaele** nella traccia analizzata, poiché l’aplotipo Y ottenuto è uguale a quello appartenente a **SOLLECITO Raffaele** (riscontro effettuato con l’aplotipo Y già riportato in **Tabella 30-II** di pag. 63 estrapolato dall’analisi genetica del tampone salivare prelevato allo stesso”.

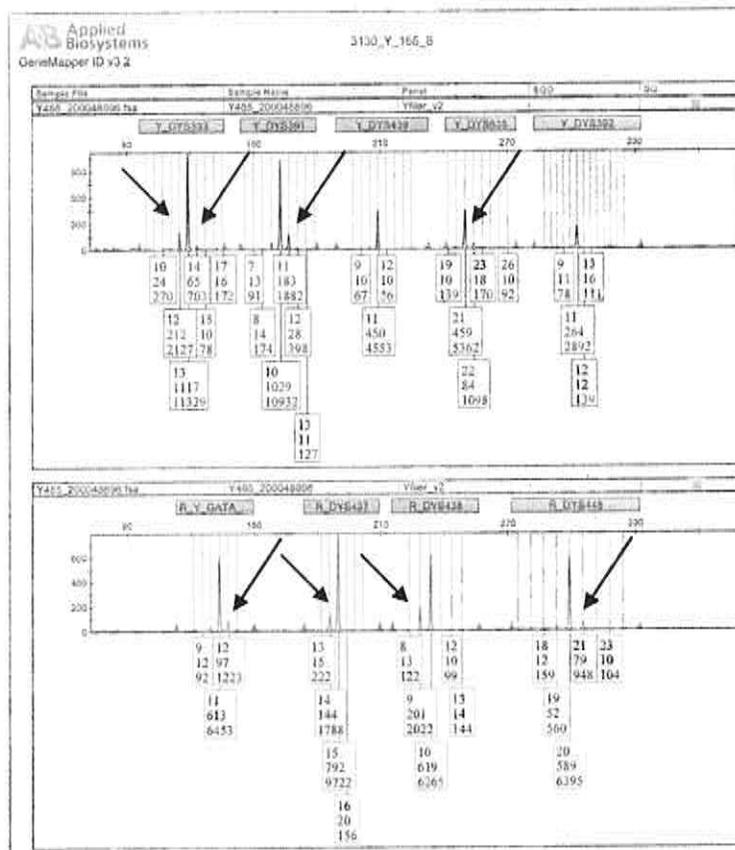
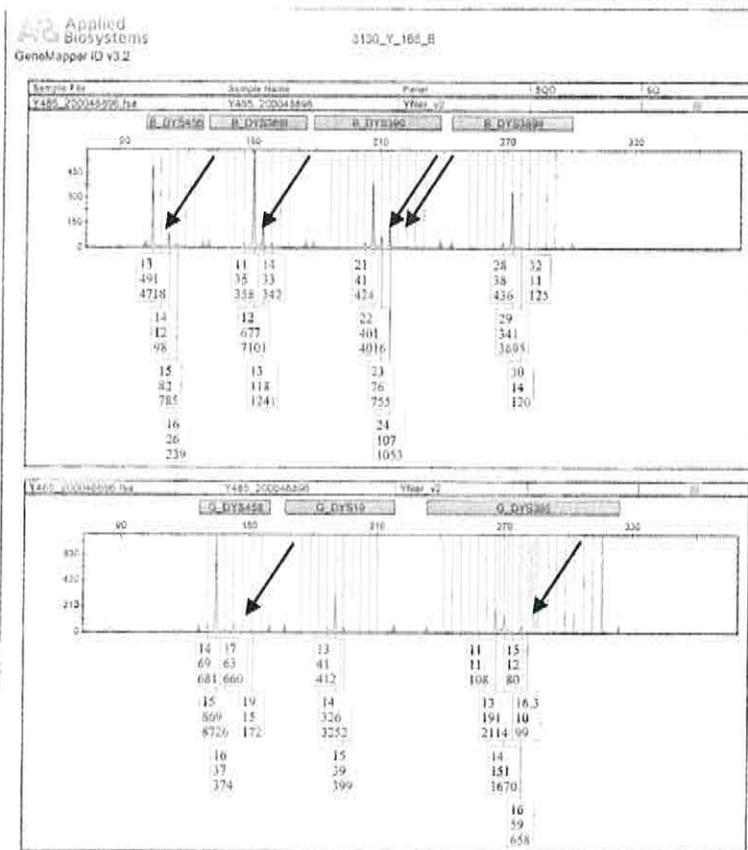
Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dalla CT per il cromosoma Y

	SOLLECITO R.
locus genetico	aplotipo Y traccia B
DYS456	13
DYS389I	12
DYS390	22
DYS389II	29
DYS458	15
DYS19	14
DYS385	13, 14
DYS391	13
DYS391	10
DYS391	11
DYS385	21
DYS392	11
YGATAH4	11
DYS437	15
DYS438	10
DYS448	20

Successivamente ci è stato fornito dalla Dr.ssa Stefanoni il tracciato elettroforetico (*mag 11,2011 04:08 PM*) della medesima corsa ma con le indicazioni relative all'altezza e alle aree di tutti i picchi presenti.

Oltre ai picchi indicati nella RTIGF come alleli, sono presenti picchi ulteriori con altezze che superano la soglia di 50 RFU i quali, pur non essendo in posizione stutter, non sono stati presi in considerazione dalla CT.

Sono segnalati con una freccia i picchi non riportati nella RTIGF:



Da quanto precedentemente illustrato si evince che nell'elettroferogramma relativo al cromosoma Y sono presenti più alleli di quelli riportati nella RTIGF.

Nella tabella seguente sono riassunti gli alleli evidenziati ad una lettura attenta dell'elettroferogramma:

LOCUS	RTIGF	NS LETTURA	ALLELI NON LETTI
DYS456	13	13, 15	15 (↑ 82)
DYS389I	12	12, 13	13 (↑ 118)
DYS390	22	22, 23, 24	23 (↑ 76), 24 (↑ 107)
DYS389II	29	29	-----
DYS458	15	15, 17	17 (↑ 63)
DYS19	14	14	-----
DYS385	13,14	13, 14, 16	16 (↑ 59)
DYS393	13	12, 13, 14	12 (↑212=18.97% allele 13) 14 (↑ 65)
DYS391	10	10, 11	11 (↑ 183)
DYS439	11	11	-----
DYS635	21	21, 22	22 (↑ 84)
DYS392	11	11	-----
YGATA	11	11, 12	12 (↑ 97)
DYS437	15	14, 15	14 (↑144=18.18% allele 15)
DYS438	10	9, 10	9 (↑201=32.47% allele 10)
DYS448	20	20, 21	21 (↑ 79)

Da ciò deriva che nel DNA estratto dal Rep.165B sono presenti più contributori minori di sesso maschile, a conferma di quanto già osservato negli elettroferogrammi degli STRs autosomici e che non sono stati evidenziati dalla CT.

Quest'ultima affermazione è suffragata dall'elettroferogramma relativo al cromosoma Y ove sono presenti chiaramente più alleli, che pur essendo particolarmente evidenti, non sono stati presi in considerazione dalla CT.

Si tratta, pertanto, di un profilo genetico derivante da mistura di sostanze biologiche non meglio identificate (si ricorda che non è stata eseguita alcuna indagine mirata all'evidenziazione delle ipotizzate cellule di sfaldamento quindi l'affermazione è priva di fondamento scientifico) la cui componente maggiore è rappresentata da DNA della vittima e la componente minore è rappresentata da DNA proveniente da più individui (cfr. STRs autosomici) di sesso maschile (cfr. cromosoma Y), un aplotipo Y dei quali corrisponde all'aplotipo Y di Raffaele Sollecito.

In merito all'attendibilità del reperto con specifico riferimento "*anche ad eventuali contaminazioni*" si ritiene opportuno esaminare le **modalità e le circostanze nelle quali è avvenuta l'acquisizione del Rep.165B.**

Il reperto è stato recuperato 46 giorni dopo il crimine, in un contesto altamente suggestivo di contaminazione ambientale.

Il DNA ottenuto, pur sufficiente quantitativamente per permettere le analisi, non soddisfa i requisiti minimi qualitativi, per via dell'evidenza di contaminazione ambientale.

Diversi picchi (cfr tabella STRs autosomici e aplotipo cromosoma Y) che dovevano, sino a prova contraria, essere considerati alleli, non sono stati presi in considerazione nelle analisi, tuttavia la loro presenza era indicativa del fatto che, oltre alla Kercher e al Sollecito, altri soggetti non identificati erano rappresentati nelle tracce genetiche rilevate sulla scena del crimine. A questo riguardo, era necessario procedere ad ulteriori amplificazioni del DNA estratto al fine di confermare la presenza dei diversi aplotipi presenti sulla scena del crimine, cosa che non risulta sia stata effettuata, pur essendo disponibile un adeguato quantitativo di estratto (cfr.SAL: 50 µl di estratto).

Inoltre, la documentazione circa la possibile contaminazione del reperto, sia prima che dopo il recupero, è inadeguata.

La semplice negatività del controllo di amplificazione, peraltro non allegata, non è sufficiente a escludere contaminazioni ambientali del reperto precedenti l'estrazione e amplificazione del DNA. Infatti, sarebbe stato necessario ottenere i profili allelici presenti nel contesto dell'ambiente.

- Il reperto fu recuperato sul pavimento, ove era prevedibilmente a contatto con polvere ambientale che, in ambienti chiusi frequentati da esseri umani, è composta in larga misura da elementi (cellule, peli, capelli, etc) di origine umana;
- Si è dimostrato che la polvere di ambienti chiusi può contenere decine di microgrammi di DNA per grammo, dipendendo il quantitativo di DNA dall'intensità della frequentazione degli individui e dalla quantità di polvere che si accumula nello specifico ambiente;
- E' stato ampiamente dimostrato che la presenza di polvere ambientale costituisce una significativa sorgente di contaminazione in investigazioni forensi, poiché il DNA derivante da tale polvere può evidenziarsi sotto forma di alleli in analisi di polimorfismi.

- Il rischio di interpretare non correttamente tali contaminanti ambientali da polvere può essere minimizzato solo avendo l'accortezza di istituire **procedure di controllo estremamente stringenti**, ivi inclusa **l'analisi di estratti da tamponi di cotone sterile imbevuti di buffer sterile passati sulle superfici ambientali per prelevare campioni di polveri**;
- In ogni caso, i profili allelici ottenuti da polvere ambientale, o da campioni contaminati con polvere ambientale, possono essere ritenuti indicativi degli individui che hanno frequentato quel determinato ambiente;
- Tuttavia, è stato evidenziato che la correlazione diretta tra frequentazione umana e livelli di polvere con la quantità e la qualità del DNA umano in essa presente è difficile da generalizzare a causa di potenziali effetti di altri fattori non controllati. Infatti, variabili ambientali, inclusa la luce, il calore e l'umidità possono degradare il DNA, e residui di detergenti (ad es. candeggina) possono distruggere il DNA. Inoltre, i sistemi di ventilazione possono fungere da veicolo di trasferimento della polvere tra le diverse stanze introducendo DNA proveniente da individui che non necessariamente hanno frequentato uno specifico ambiente (*Toothman MH. et al., 2008*);
- **Per avanzare ipotesi interpretative, sarebbe stato necessario procedere ad amplificazioni multiple sul reperto 165B i cui alleli avrebbero dovuto essere comparati con gli alleli ottenuti da amplificati multipli effettuati su estratti di multipli prelievi di polvere ambientale**
- **Solo alleli riscontrati sul Rep.165B, e non sulla polvere ambientale, avrebbero potuto essere considerati di possibile rilievo indiziario**, e ciò indipendentemente dall'altezza e dall'area dei picchi ad essi relativi. Non essendo ciò stato fatto, i profili allelici del reperto 165B non sono, a nostro avviso, da considerarsi probatori.

MODALITA' DI REPERTAZIONE VIA DELLA PERGOLA

CONSIDERAZIONI SULLE INDAGINI DI GENETICA FORENSE SVOLTE DALLA POLIZIA SCIENTIFICA SUL REP.165B (GANCETTI DI REGGISENO)

- In merito alla natura del materiale prelevato dal predetto reperto **non sussistono elementi scientificamente probanti la presenza di presunte cellule di sfaldamento;**
- Dal tracciato elettroforetico relativo agli **STRs autosomici**, si può affermare che relativamente ai marcatori *D8S1179*, *D21S11*, *D19S433*, *D5S818* vi è stata una **erronea interpretazione dei picchi presenti nel tracciato elettroforetico** in quanto sono stati considerati stutter picchi la cui altezza era oltre 50 RFU (*D19S433* picco 14↑54) o superavano la soglia del 15% dell'allele maggiore (*D8S1179*, *D21S11*, *D5S818*) o non erano in posizione stutter (*D5S818*) e che, pertanto, dovevano essere considerati alleli: nel DNA estratto dal Rep.165B sono presenti più contributori minori che non sono stati evidenziati dalla CT;
- Dal tracciato elettroforetico relativo ai marcatori del **cromosoma Y**, oltre ai picchi indicati nella RTIGF come alleli, si evince la **presenza di picchi ulteriori** con altezze che superano la soglia di 50 RFU che, pur non essendo in posizione stutter, non sono stati presi in considerazione dalla CT: nel DNA estratto dal Rep.165B sono presenti più contributori minori, a conferma di quanto già osservato negli elettroferogrammi degli STRs autosomici e che non sono stati evidenziati dalla CT;

- Riteniamo che la CT sia giunta alla conclusione restrittiva (presenza di due soli individui: la vittima e Raffaele Sollecito) a seguito di una non corretta interpretazione degli elettroferogrammi degli STRs autosomici per aver **disatteso le raccomandazioni della ISFG** circa la corretta interpretazione delle misture;
- Il reperto è stato recuperato 46 giorni dopo il crimine, in un contesto altamente suggestivo di contaminazione ambientale;
- Si ritiene che nei sopralluoghi effettuati in Via della Pergola non siano state applicate le procedure di sopralluogo ed i corretti protocolli di raccolta e campionamento dei reperti universalmente note, anche al fine di minimizzare la contaminazione ambientale e la contaminazione da manipolazione.

CONCLUSIONI

- Le indagini da noi eseguite al fine di accertare la **presenza di sangue** sul Rep.36 (coltello) e sul Rep.165B (gancetti di reggiseno) hanno dato **esito negativo**.
- Le indagini citomorfologiche sui reperti predetti **non hanno evidenziato la presenza di materiale cellulare**. Alcune campionature del Rep.36 (coltello), ed in modo particolare il campione "H", presentano granuli con una morfologia caratteristica circolare/esagonale con struttura centrale a raggiera. Un approfondito studio microscopico, unitamente alla consultazione di dati presenti in letteratura, hanno permesso di accertare che le strutture in questione sono riconducibili a **granuli di amido**, quindi materiale di natura vegetale.
- La quantificazione degli estratti ottenuti dalle campionature effettuate sul Rep.36 (coltello) e Rep.165B (gancetti reggiseno), eseguita mediante Real Time PCR, **non ha evidenziato presenza di DNA**.

REPERTO 36 (COLTELLO)

- ✓ Relativamente agli accertamenti genetici eseguiti sulla **traccia A** (impugnatura del coltello) si concorda con la conclusione cui è giunta la CT circa l'**attribuzione del profilo genetico ottenuto da tale campionatura a Knox Amanda Marie**;
- ✓ Relativamente alla **traccia B** (lama del coltello) riteniamo che **gli accertamenti tecnici effettuati non siano attendibili** per i seguenti motivi:
 - **Non sussistono elementi scientificamente probanti la natura ematica della traccia B** (lama del coltello);
 - Dai tracciati elettroforetici esibiti si evince che il campione indicato con la lettera B (lama del coltello) era un **campione Low Copy Number (LCN)** e, in quanto tale, avrebbero dovuto essere applicate tutte le cautele indicate dalla **Comunità Scientifica Internazionale**;
 - Tenuto conto che non è stata seguita alcuna delle raccomandazioni della **Comunità Scientifica Internazionale**, relativa al trattamento di campioni **Low Copy Number (LCN)**, **non si condividono le conclusioni circa la certa attribuzione del profilo rilevato sulla traccia B (lama del coltello) alla vittima Kercher Meredith Susanna Cara poiché il profilo genetico, così come ottenuto, appare inattendibile in quanto non supportato da procedimenti analitici scientificamente validati**;
 - **Non sono state seguite le procedure internazionali di sopralluogo ed i protocolli internazionali di raccolta e campionamento del reperto**;
 - Non si può escludere che il risultato ottenuto dalla campionatura B (lama del coltello) possa derivare da **fenomeni di contaminazione verificatasi in una qualunque fase della repertazione e/o manipolazione e/o dei processi analitici eseguiti**.

REPERTO 165B (GANCETTI DI REGGISENO)

Relativamente al Rep. 165B (gancetti di reggiseno) riteniamo che **gli accertamenti tecnici effettuati non siano attendibili** per i seguenti motivi:

- **Non sussistono elementi scientificamente probanti la presenza di presunte cellule di sfaldamento sul reperto;**
- **Vi è stata una erronea interpretazione del tracciato elettroforetico degli STRs autosomici;**
- **Vi è stata una erronea interpretazione del tracciato elettroforetico relativo al cromosoma Y;**
- **Non sono state seguite le procedure internazionali di sopralluogo ed i protocolli internazionali di raccolta e campionamento del reperto;**
- **Non si può escludere che i risultati ottenuti possano derivare da fenomeni di contaminazione ambientale e/o di contaminazione verificatasi in una qualunque fase della repertazione e/o manipolazione di detto reperto.**