

*Osservazioni sulla perizia a firma della
Prof.ssa Vecchiotti e del Dr. Conti*

Dr.ssa Patrizia Stefanoni

Sommario degli argomenti trattati

- Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti
- Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia
- Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti
- Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

Pagina 30 perizia

In conclusione **non ci sono evidenze della presenza di materiale cellulare nei campioni analizzati** con la tecnica di citocentrifugazione e colorazione con ematossilina.

Alcuni campioni (A-E-F-H-I) ed in modo particolare il campione "H", **presentano granuli con una morfologia caratteristica circolare/esagonale con struttura centrale a raggiera**. Un più approfondito studio microscopico insieme alla consultazione di dati presenti in letteratura hanno permesso di determinare che le strutture in questione sono riconducibile a **granuli di amido**, quindi, materiale di natura vegetale.

Preso atto che **nelle tamponature (A-B-C-D-E-F-G-H-I) effettuate sul Rep. 36 (coltello) e nelle tamponature (L-M) eseguite sul Rep. 165B (gancetti di reggiseno) non era presente DNA utile per le ulteriori indagini di laboratorio** (amplificazione, elettroforesi) i periti comunicavano, verbalmente, ai consulenti delle parti che avrebbero proceduto alla disamina della Consulenza Tecnica espletata dalla Polizia Scientifica, così come da quesito formulato in sede di conferimento dell'incarico peritale.

30

I periti concludono affermando l'impossibilità di continuare le analisi per la mancanza di un quantitativo sufficiente di DNA

**CIO' E' SOLO
PARZIALMENTE VERO:
NON E' VALIDO PER TUTTE
LE CAMPIONATURE
ANALIZZATE**

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

di genetica forense, il quale consente l'isolamento del DNA per mezzo di particelle paramagnetiche e può essere usato per l'estrazione di DNA da una grande varietà di campioni, incluse tracce essiccate e liquidi biologici.

Per l'estrazione del DNA dai suddetti campioni è stato seguito il protocollo indicato nel manuale d'uso del kit di seguito riportato:

- 1) prelievo del tampone e inserimento all'interno di una provetta da 1,5 mL;
- 2) aggiunta all'interno di ogni singola provetta di 250 μ L di Lysis Buffer (preliminarmente preparato tramite l'aggiunta di 1 μ L di DTT 1M per ogni 100 μ L di Lysis Buffer) ed incubazione a 70°C per 30';
- 3) trasferimento del Lysis Buffer e del campione all'interno di una nuova provetta da 1,5 mL dotata di cestello per centrifuga e successiva centrifugazione alla massima velocità (13000 rpm) per 2';
- 4) rimozione del cestello; aggiunta di 7 μ L di resina magnetica; vortex ed incubazione a temperatura ambiente per 5';
- 5) vortex e posizionamento della provetta sul supporto magnetico; rimozione della soluzione;
- 6) lavaggio con 100 μ L di Lysis Buffer (sol. di lavoro);
- 7) lavaggio con 100 μ L di Wash Buffer 1X (preliminarmente preparato tramite l'aggiunta di 15 ml di etanolo assoluto e 15 ml di isopropanolo al Wash Buffer 2X fornito dal kit), ripetuto per un totale di 3 lavaggi;
- 8) rimozione accurata della soluzione; asciugatura con tappo aperto, sul supporto magnetico, a temperatura ambiente, per 5'-10'
- 9) aggiunta di 30 μ L di Elution Buffer ed incubazione a 65°C per 5';
- 10) vortex e riposizionamento della provetta sul supporto magnetico;
- 11) trasferimento della soluzione in una provetta nuova;
- 12) conservazione dell'estratto a +4°C.

Si precisa che i campioni in esame sono stati rigorosamente sottoposti alle procedure di estrazione del DNA singolarmente secondo una precisa organizzazione temporo-spaziale della lavorazione, con l'utilizzo di puntali sterili monouso dotati di filtro. Le suddette operazioni sono state svolte indossando mascherine, camici monouso e guanti monouso i quali venivano regolarmente sostituiti ad ogni passaggio di lavorazione da un campione all'altro.

perizia pagina 12

12

Protocollo di estrazione del DNA (Kit *DNA IQ™* Systems)

“Aggiunta di 30 μ l di Elution Buffer”

..... quindi il DNA alla fine del processo è contenuto in 30 μ l di liquido.

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

- Campionature effettuate sul coltello (da 'A' ad 'I'): quantitativo DNA estratto dal punto "I" = $0.005 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (TABELLA PAG. 21, DATI DI QUANTIFICAZIONE)
- Calcolo del quantitativo totale di DNA a disposizione per la campionatura 'I':

$$0.005 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 30 \mu\text{l} = 0.150 \text{ ng DNA} = 150 \text{ pg}$$

$$150 \text{ pg} - 30 \text{ pg} = 120 \text{ pg}$$

utili per l'amplificazione
con un kit di nuova generazione
(utilizzati per la quantificazione)

N.B.: 1 ng = 1000 pg

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

POTENZIALITA' DEI KIT DI NUOVA GENERAZIONE:

ES: kit *PowerPlex® ESI* e *ESX* PROMEGA

4. Add the final volume of each reagent listed in Table 1 into a sterile, 1.5ml amber-colored tube.

Table 1 shows the component volumes per reaction. A worksheet to calculate the required amount of each PCR amplification mix component is provided in Section 9.D (Table 5).

Table 1. PCR Amplification Mix for the PowerPlex® ESI 17 System.

PCR Amplification Mix Component ¹	Volume Per Reaction
Water, Amplification Grade	to a final volume of 25.0µl
PowerPlex® ESI 5X Master Mix	5.0µl
PowerPlex® ESI 17 10X Primer Pair Mix	2.5µl
template DNA (0.5ng) ^{2,3}	up to 17.5µl
total reaction volume	25µl

¹Add Water, Amplification Grade, to the tube first, then add PowerPlex® ESI 5X Master Mix and PowerPlex® ESI 17 10X Primer Pair Mix. The template DNA will be added at Step 6.

²Store DNA templates in nuclease-free water or TE⁻⁴ buffer (10mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1mM EDTA). If the DNA template is stored in TE buffer that is not pH 8.0 or contains a higher EDTA concentration, the volume of DNA added should not exceed 20% of the final reaction volume. PCR amplification efficiency and quality can be greatly altered by changes in pH (due to added Tris-HCl), available magnesium concentration (due to chelation by EDTA) or other PCR inhibitors, which may be present at low concentrations depending on the source of the template DNA and the extraction procedure used.

³Apparent DNA concentrations can differ, depending on the DNA quantification method used (13). We strongly recommend that you perform experiments to determine the optimal DNA amount for your DNA quantification method.

5. Vortex the PCR amplification mix for 5–10 seconds, then pipet PCR amplification mix into each reaction tube.
- ⓘ Failure to vortex the PCR amplification mix sufficiently can result in poor amplification or locus-to-locus imbalance.
6. Pipet the template DNA (0.5ng) for each sample into the respective tube containing PCR amplification mix.
7. For the positive amplification control, dilute 9947A DNA to 1.0ng in the



$$\text{“I”} = 0.005 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 17,5 \mu\text{l} = 0,0875 \text{ ng} = 87,5 \text{ pg DNA}$$

$$(0,0875 \text{ ng} \times 1000 = 87,5 \text{ pg})$$

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

POTENZIALITA' DEI KIT DI NUOVA GENERAZIONE:

ES: kit *PowerPlex® ESI* e *ESX* PROMEGA

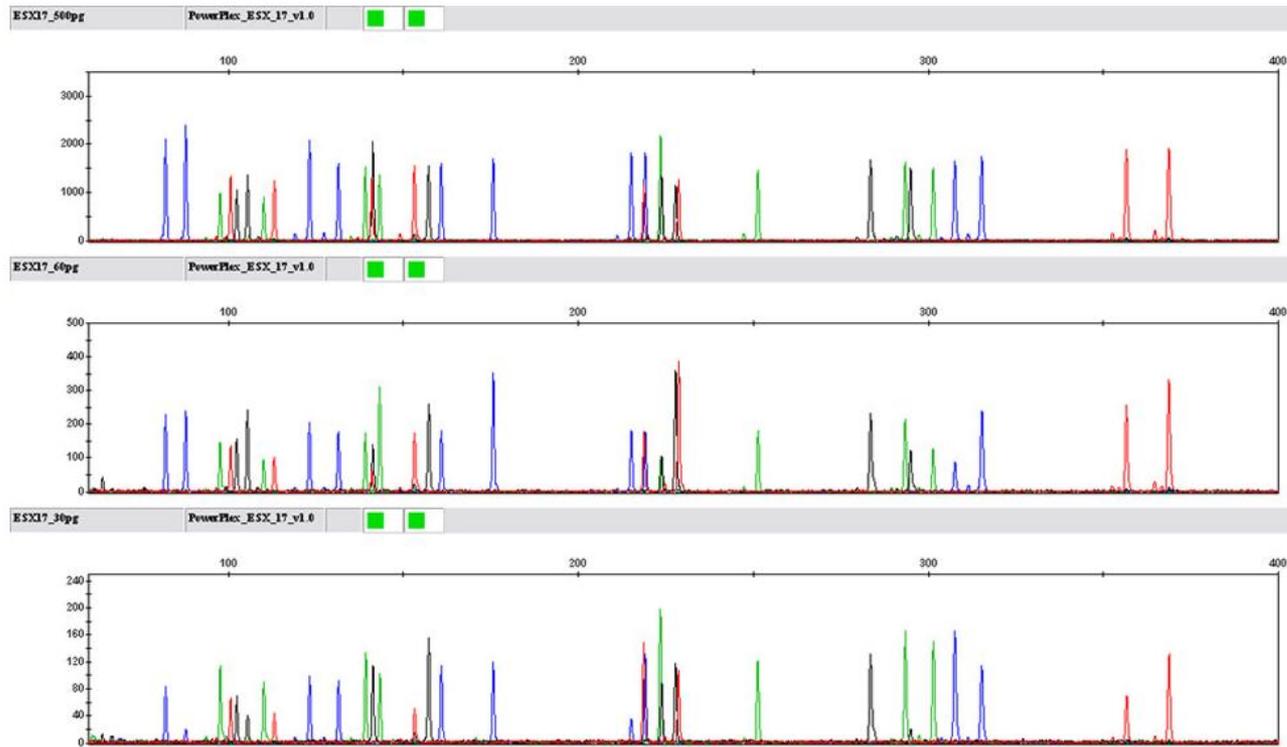
“The PowerPlex® ESX and ESI Systems can accommodate a range of template DNA concentrations. Balance was optimized at **0.5 ng of DNA** using the manufacturer's recommended 30-cycle protocol⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾ ⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾ , and product specifications ensure that it will amplify as little as **100pg of DNA** (Figure 3). Developmental studies showed that the PowerPlex® ESX and ESI Systems are sensitive enough to give interpretable results when amplifying **much less than 100pg of DNA** (Figure 3).”

WWW.promega.com/

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

POTENZIALITA' DEI KIT DI NUOVA GENERAZIONE:

ES: kit *PowerPlex® ESX* PROMEGA



Sensitivity of the PowerPlex® ESX 17 System.

[Close](#)

Decreasing amounts of template were amplified using the PowerPlex® ESX 17 System. All amplifications were performed on an Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 as directed in the PowerPlex® ESX 17 System Technical Manual #TMD024. Once amplified, samples were separated using an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer and a 3kV, 5-second injection. Representative electropherograms from three replicates are shown for 500pg, 60pg and 30pg template DNA (top to bottom). Using a 50RFU threshold, all alleles were called for the 500pg and 60pg samples. Across the three replicates of the 30pg samples, 80% (82/102) of alleles were called. Note that all PowerPlex® ESX and ESI Systems gave similar results.

500 pg DNA

60 pg DNA

30 pg DNA

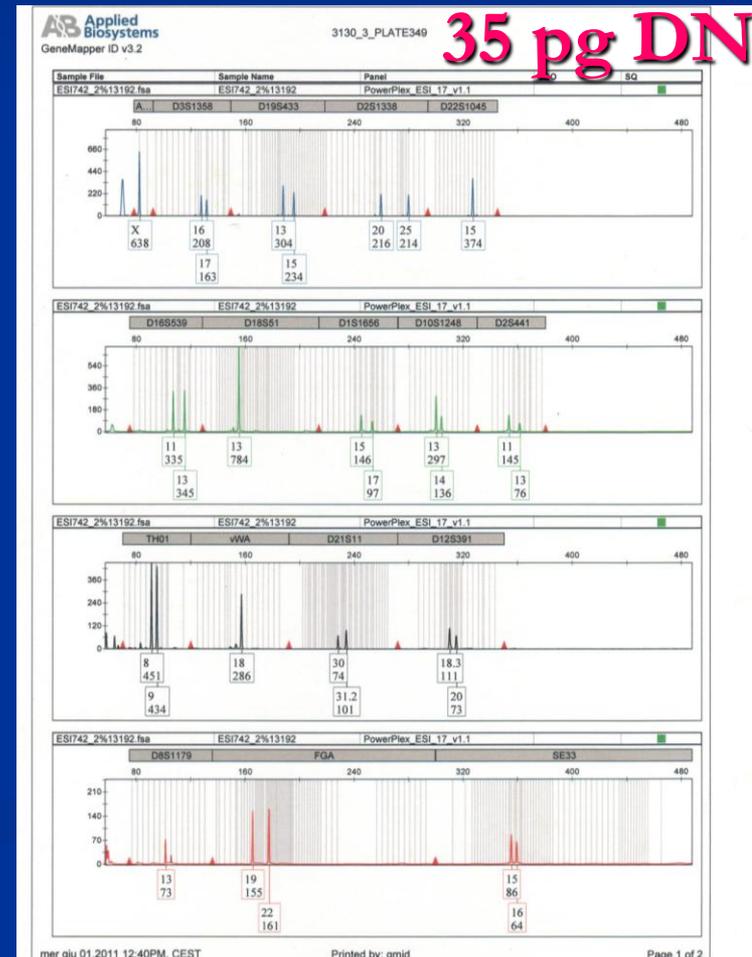
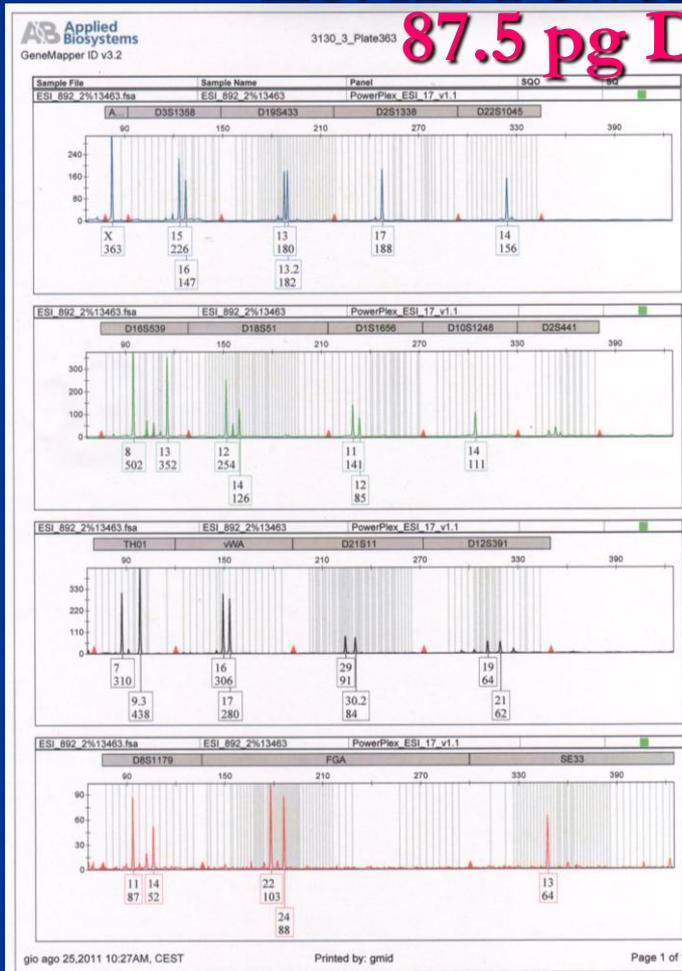
Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

POTENZIALITA' DEI KIT DI NUOVA GENERAZIONE:

ES: kit **PowerPlex® ESI** PROMEGA

87.5 pg DNA

35 pg DNA



Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

Parere di J.M. Butler sui kit di quantificazione attualmente in commercio

Comments on DNA Quantitation

- qPCR has enabled lower amounts of DNA to be quantified in recent years – providing in some cases a false sense of confidence in accuracy at these low levels
- Remember that qPCR is also subject to stochastic effects and thus DNA quantitation will be less accurate and exhibit more variation at the low end...
- **Next generation STR kits** with their greater sensitivity and ability to overcome inhibition **have the potential to make the current qPCR DNA quantitation kits obsolete as an appropriate gatekeeper** to whether or not to continue with a low level, compromised DNA sample

“I kit STR di nuova generazione...hanno la capacità di farci in modo che gli attuali kit di quantificazione in Real-Time PCR sono strumenti obsoleti per decidere in maniera affidabile se continuare o meno con l'analisi di bassi livelli di DNA o con DNA di non buona qualità”

*Indiana DNA Training
Workshop, 28 Marzo 2011*

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

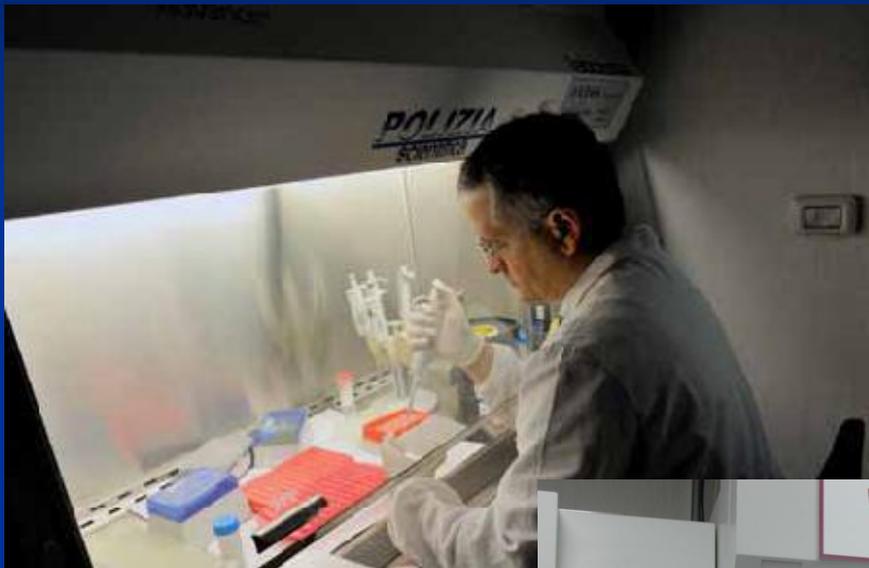
*Utilizzo delle **CAPPE ASPIRANTI**
nel corso delle analisi*

Trascrizione udienza 30/07: pag. da 52 a 54

La Prof.ssa Vecchiotti afferma di non conoscere se le analisi condotte dalla Scientifica fossero state espletate con l'utilizzo di cappe aspiranti: tale informazione era ricavabile dagli atti dal

**verbale di udienza C.d.A. del 23/05/2009
(pag.156)**

Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti CAPPE ASPIRANTI al Servizio Polizia Scientifica



Nuovi accertamenti tecnici svolti dai periti

*Utilizzo delle **CAPPE ASPIRANTI** nel corso delle analisi*

Afferma, inoltre di non aver operato sotto cappa nel corso delle sue analisi perché non lo ha ritenuto utile dato che **tutti i presenti** erano perfettamente coperti quando sono stati fatti i prelievi.

Ma le analisi genetiche non si esauriscono nel momento dei prelievi. Ad esempio, nel corso della *QUANTIFICAZIONE* non erano presenti solo i C.T. nel laboratorio ma diversi altri operatori, estranei alle analisi in questione, che non indossavano alcun dispositivo di protezione individuale (mascherine, camici ecc.)

**Questioni di carattere generale
riguardanti alcuni argomenti
trattati in perizia**

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia Es. di ricerca in Pub-Med

GILL, P., 2002, riferimento di pag.87 Perizia

See 22 articles in 2002 by Gill P:

- Tumour location and prognostic characteristics as determinants of survival of women with invasive breast cancer: South Australian breast cancer registries, 1987-1998. Gill PG et al. Breast. (2002)
- Probing the reactivity of photoinitiators for free radical polymerization: time-resolved infrared spectroscopy of benzoyl radicals. Colley CS et al. J Am Chem Soc. (2002)
- A multicenter phase II study of the intravenous administration of the anti-herpesvirus ganciclovir in patients with acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma. Bernstein ZP et al. Cancer. (2002)

Results: 1 to 20 of 44

- Costs of pulmonary rehabilitation and predictors of adherence in the National Emphysema Treatment Trial.
1. Fan VS, Giardino ND, Blough DK, Kaplan RM, Ramsey SD, Nett Research Group. COPD. 2008 Apr;5(2):105-16.
PMID: 18415609 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)
- Sex, depression, and risk of hospitalization and mortality in chronic obstructive pulmonary disease.
2. Fan VS, Ramsey SD, Giardino ND, Make BJ, Emery CF, Diaz PT, Benditt JO, Mosenfar Z, McKenna R Jr, Curtis JL, Fishman AP, Martinez FJ, National Emphysema Treatment Trial (NETT) Research Group. Arch Intern Med. 2007 Nov 26;167(21):2345-53.
PMID: 18039994 [PubMed - indexed for MEDLINE] [Free Article](#)
[Related citations](#)
- Psychological impact and cosmetic outcome of surgical breast cancer strategies.
3. Nano MT, Gill PG, Kollias J, Bochner MA, Malycha P, Winefield HR. ANZ J Surg. 2005 Nov;75(11):940-7.
PMID: 16336362 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)
- Qualitative assessment of breast reconstruction in a specialist breast unit.
4. Nano MT, Gill PG, Kollias J, Bochner MA, Carter N, Winefield HR. ANZ J Surg. 2005 Jun;75(6):445-53; discussion 371-2.
PMID: 15943735 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)
- Participation in the RACS sentinel node biopsy versus axillary clearance trial.
5. Wetzig NR, Gill PG, Ung O, Collins J, Kollias J, Gillett D, GebSKI V, Greig C, Ray A, Stockler M, RACS SNAC Group. ANZ J Surg. 2005 Mar;75(3):98-100.
PMID: 15777362 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)
- Breast volume replacement using the latissimus dorsi miniflap.
6. Nano MT, Gill PG, Kollias J, Bochner MA. ANZ J Surg. 2004 Mar;74(3):98-104.

44 lavori
scientifici:

quale di
questi è
quello
citato?

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

BIBLIOGRAFIA RIPORTATA: il 38% degli articoli e dei testi scientifici citati sono stati pubblicati *a partire dal 2008*, quindi posteriori allo svolgimento degli accertamenti tecnici svolti dalla Polizia Scientifica (Novembre 2007 – Maggio 2008)

Sarebbe stato corretto riferirsi soltanto a quello che era *“lo stato dell’arte”* nell’ambito della genetica forense al momento della produzione dei dati

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

ENFSI: 60 members in 34 countries

ENFSI has developed successfully from its beginning; the number of members has increased steadily over the years, from 11 member laboratories in 1993 to 60 in 2011.

These laboratories come from 34 countries and are geographically spread across Europe: Austria, Azerbaijan, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Montenegro, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Russia, Serbia, Slovenia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland, Turkey, Ukraine and the United Kingdom.

A quick look at the map of Europe shows the exact locations of the ENFSI-institutes.

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

Alla luce dell'importanza che viene ad assumere, ai fini del successo delle indagini di laboratorio, il corretto svolgimento dell'attività di sopralluogo e repertamento, all'interno dell'*ENFSI* (European Network of Forensic Science Institutes, organismo nato nel 1995 al quale aderiscono 19 paesi europei) è stato promosso un gruppo di lavoro denominato "*Scena del Crimine*", al fine di standardizzare le procedure e le metodiche impiegate; le indicazioni vengono riportate nel Good Practice Manual for Crime Scene Management (Manuale di Buona Pratica nella Gestione della Scena del Crimine).

Pag.38 perizia: **Informazione
errata e
non aggiornata**

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

Central Anticrime Directorate of Italian National Police, Forensic Science Police Service (DAC-SPS) - Rome, Italy

Name of institute + abbreviation (national language)

Direzione Centrale Anticrimine della Polizia di Stato, Servizio Polizia Scientifica (DAC-SPS)

Name of institute + abbreviation (English language)

Central Anticrime Directorate of Italian National Police, Forensic Science Police Service (DAC-SPS)

Website

www.poliziadistato.it/articolo/966-Investigations#centrale_anticrimine

Director

Piero Angeloni

ENFSI's permanent representative

Renato Biondo

E-mail

dipps.serviziopoliziascientifica.rm@poliziadistato.it

Address

Via Tuscolana, 1548
00173
Rome (RM)
Italy

T. +39 06 46543322

F. +39 06 46543662

Characteristics

- Founded 1903;
- Part of the Italian National Police which is under the Ministry of the Interior, Public Security Department;
- ENFSI member since 1994;
- Accreditation since 2009 based on ISO 9000;
- It operates all over Italy through its 14 Interregional/Regional Office and 103 Local Office



Membro ENFSI dal 1994

Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche (RaCIS) - Rome, Italy

Name of institute + abbreviation (national language)

Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche (RaCIS)

Name of institute + abbreviation (English language)

Forensic science laboratories of Carabinieri Force (RaCIS)

Website

www.carabinieri.it/Internet/Arma/Oqqi/RACIS

Director

Brigadier General Nicola Raggetti

ENFSI's permanent representative

Brigadier General Nicola Raggetti

E-mail

raciscdo@carabinieri.it

Address

Viale di Tor di Quinto
151
00191
Rome
Italy

T. +39 068 098 04 20

F. +39 068 098 38 82

Characteristics

- Founded in December 15th, 1955
- Under the Command of Carabinieri Mobile and Specialized Units Headquarter "PALIDORO" (Ministry of Interior for public order and Ministry of Defence for military tasks)
- Certificate since 2008 based on ISO 9001 and waiting to be accredited on ISO 17025
- ENFSI member since 1992 (founding member)



Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

The poster features the following elements:

- Ministero dell'Interno** (Ministry of the Interior)
- DIPARTIMENTO DELLA PUBBLICA SICUREZZA** (Department of Public Security)
- DIREZIONE CENTRALE ANTICRIMINE DELLA POLIZIA DI STATO** (Central Directorate of Criminal Investigation of the State Police)
- SERVIZIO POLIZIA SCIENTIFICA** (Forensic Police Service)
- DAC** (Anticrime Central Directorate) logo on the left.
- DIREZIONE CENTRALE ANTICRIMINE DELLA POLIZIA DI STATO - SERVIZIO POLIZIA SCIENTIFICA** logo on the right.
- 27° ENFSI WG & EDNAP Meeting** in large yellow text.
- ENFSI** logo (European Network of Forensic Science Institutes) on the bottom left.
- The DNA Profiling Group** logo (EDNAP) on the bottom right.
- The European DNA Profiling Group (EDNAP)** text below the logo.
- DAC Anticrime Central Directorate**
Forensic Science Police Service
Rome, 12-14 september 2007

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

grosso modo in maniera casuale, perché non avevo nessun dato, nessun elemento per stabilire perché fare proprio la campionatura in questo punto anziché, magari, non lo so in un altro".

Corte d'Assise (verbale d'udienza del 23.05.09, pag. 94) " *la traccia B è stata prelevata in questo punto in base a nessuna rilevante traccia dal punto di vista biologico che era visibile diciamo ad occhio. Il punto della A è stato campionato, del manico naturalmente, come anche il D, F con l'intento di eventualmente trovare DNA della persona che avesse impugnato quell'arma".*

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° tre prelievi sull'**impugnatura** del coltello (campionature indicate con le lettere **A-D-F**) e n° quattro prelievi sulla **lama** (campionature indicate con le lettere **B-C-E-G**) per un totale di n° sette 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 traccia 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

perizia pag 51

Dr.ssa Stefanoni

Dr.ssa Stefanoni

Verbale C.d.A. 23/05/2009
pag. 32 (anche 25+152)
(udienza GUP pag.29)

di laboratorio, quindi cambio dei guanti, utilizzo di tutto il materiale che viene a contatto con ogni traccia monouso, quindi io il puntale con cui prendo fisicamente una quantità così esigua di DNA dopo lo butto, prendo un'altra cosa dopo la butto, e così via, quindi ogni traccia viene praticamente toccata una sola volta dal materiale con cui viene a contatto, che è tutto materiale plastico.

PRESIDENTE - Con riferimento a questa domanda lei può dire se nell'effettuare queste analisi, oggetto di domande di questo processo, si sono verificate delle anomalie, si sono verificati dei fatti che hanno potuto determinare in laboratorio questa contaminazione?

RISPOSTA - No, e comunque vengono adottati dei controlli, vengono immessi dei controlli all'interno di ogni... come dire sessione di lavoro, quindi se io faccio l'estrazione faccio anche contemporaneamente un'estrazione di un campione bianco, per così dire, cioè un campione dove io so che sicuramente non c'è DNA, perché non glielo metto, c'è tutto il resto, quindi c'è come dire tutta l'altra mix di reazione, quel campione mi deve dare un'estrazione zero, cioè non deve estrarre DNA, oltretutto anche la parte di estrazione che noi effettuiamo, anch'esso essendo un sistema robotizzato utilizza materiale monouso, quindi ci sono delle strip, delle linguette di plastica dove sono attaccate al di sotto tutte le varie provette con tutti i vari liquidi che servono, questa strip viene aperta con una perforazione che, come si è detto, viene aperta al momento dell'utilizzo,

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

Nella *Guidance on the Production of Best Practice Manuals within ENFSI, ref cod. QCC-BPM-008, 01/05/2008*, si evidenzia fra l'altro:

- "4.3.2 L'esperto dovrebbe anche valutare il rischio di contaminazione, o qualsiasi altra problematica che potrebbe incidere sull'integrità dei reperti, prima che i reperti forniti per l'esame siano inviati al laboratorio per l'esame, o prima dell'inizio delle analisi...

- 5.1.1 Particolare risalto dovrebbe essere dato nel manuale alle procedure per evitare la contaminazione e ai consigli dati al fine di supportare gli individui nella gestione degli specifici rischi associati con l'analisi ...;

- 5.1.3 Le considerazioni sulle precauzioni anti-contaminazione appropriate dovrebbero basarsi non solo su quelle per le analisi in discussione ma per tutti i tipi di prova che potrebbero essere potenzialmente disponibili. Se queste includono materiali che potrebbero essere richiesti per analisi successive del DNA, estrema cautela dovrebbe essere adottata a causa della sensibilità delle attuali tecniche di analisi del DNA, mediante l'utilizzo di appropriati indumenti includendo guanti e maschera facciale (refer Appendix 2):

- 5.4.1 Tutti i reperti dovrebbero essere chiusi e sigillati appena sono stati presi usando buste o contenitori di misura appropriata e costituiti da materiale che eviti il danneggiamento della confezione o la rottura dei sigilli;

- 5.4.3 Una volta sigillati, i contenitori non devono essere riaperti fuori dall'ambiente del laboratorio. E se in circostanze eccezionali devono essere riaperti allora deve essere stilata una completa e dettagliata documentazione delle condizioni nelle quali sono stati aperti".

Tali requisiti sono presenti in una busta di carta?

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

Riferimenti alle procedure e ai protocolli adottati da varie Polizie straniere in merito alla raccolta e conservazione di tracce biologiche (**perizia da pag.31 a 39**):

E' COMPLETAMENTE **ERRATO** RIFERIRSI A TALI PROCEDURE COME A "PROTOCOLLI (o PROCEDURE) INTERNAZIONALI" (**perizia pagg.103, 144**), poiche' essi risultano essere solo PROTOCOLLI ADOTTATI DALLE SINGOLE POLIZIE DEI VARI STATI STRANIERI in base a loro specifiche esigenze, a loro specifiche legislazioni e organizzazioni dei vari corpi di Polizia locale.

COSA BEN DIVERSA E' RIFERIRSI A **PROTOCOLLI INTERNAZIONALMENTE CONDIVISI**, che ad oggi **NON ESISTONO IN EUROPA** per quanto riguarda il sopralluogo tecnico. 26

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

Norma ISO/IEC 17020: “*Criteri generali per il funzionamento dei vari tipi di organismi che effettuano attività di ispezione*”

Rappresenta un tentativo di uniformare le procedure di sopralluogo a livello *ENFSI* secondo criteri standardizzati

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

Situazione attuale a livello *ENFSI*



Implementing ISO 17020

8 - members plan to become accredited for SoC

Arson investigation at the fire scene
3 members



Accredited/certified ENFSI laboratories

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
ISO 17025	13	16	20	25	31	36
ISO 17020				1	2	3
ISO 9001	4	5	6	8	10	10
Other	3	3	5	4	2	6

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

Questione dei tempi di conservazione delle tracce reperite

- *Forensic Evidence Handbook, Missouri State Highway Patrol, Forensic Laboratory*

- *North Carolina State Bureau of Investigation, Evidence Guide, January 2010:*
"Raccolta, chiusura e conservazione delle prove:...Evitare eccessivo calore, umidità, fluttuazioni di temperatura mantenendo le prove in condizioni ambientali controllate... Permettere che una traccia umida o costituita da fluidi biologici si asciughi prima della conservazione. Conservare la prova in contenitori opportuni (carta, buste, cartoni, ma non in plastica) al fine di evitare la formazione di condensa... Chiudere sempre i reperti in carta. Non usare mai contenitori di plastica... Considerazioni di sicurezza per le prove biologiche... Seguire sempre le precauzioni universali... Usare guanti puliti... Non agitare la macchia ed evitare di spargere fini particelle che possano fluttuare nell'aria.

Sempre per quanto riguarda le modalità di reperizione, queste possono essere sinteticamente riassunte, 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.**

- *Sangue e tracce di fluidi biologici* possono essere reperite nei seguenti modi: se l'oggetto macchiato può essere trasportato al laboratorio avvolgerlo in un foglio di carta o in una busta e inviare al laboratorio; se non può essere trasportato assorbire la traccia su tessuto inumidito con acqua distillata, fare asciugare prima di chiudere definitivamente. Per il trasporto, al fine di prevenire la cross-contaminazione, il tessuto può essere messo in un contenitore plastico per non più di 2 ore. Appena giunto in laboratorio, il tessuto deve essere rimosso dalla plastica e messo ad asciugare. A questo punto chiudere in un contenitore di carta e metterlo in una busta di carta ...

- *Sangue e fluidi biologici umidi* possono essere reperiti nei seguenti modi: tutte le tracce devono essere chiuse separatamente per prevenire la cross-contaminazione, se la traccia può essere trasportata al laboratorio allora chiudere in un contenitore di carta (o contenitore di plastica se il tempo di trasporto è inferiore alle 2 ore) portare in un luogo sicuro e permettere di asciugarsi completamente, richiudere in un contenitore di carta. Se non può essere trasportato al laboratorio, allora assorbire la traccia su un piccolo frammento di cotone sterile. Chiudere in carta (o plastica se il tempo di

**A meno che non
vengano conservati
a -20°C.**

**Ma nel caso
specifico cosa è
successo?**

perizia pagg. 35-36

trasporto è inferiore alle 2 ore), porre in posto sicuro e far asciugare completamente;
quindi richiudere in un contenitore di carta.
In nessuna circostanza tracce bagnate o umide possono rimanere in plastica o in contenitori di carta per più di 2 ore ...".

Quest'ultima indicazione deve essere assolutamente rispettata e tutti i protocolli e le procedure danno precisi avvertimenti in merito; come ad esempio in *Physical Evidence Handbook, Dipartimento di Giustizia dello Stato del Wisconsin, Laboratori Regionali di Stato (7th Edition)*:

- "... bisogna assicurarsi che la traccia non sia alterata o contaminata tra il tempo della reperizione 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...".

Ed ancora, *Department of Justice, Understanding DNA Evidence: A Guide For Victim Service Providers*:

- "... investigatori e personale di laboratorio devono sempre indossare guanti usa e getta, usare strumentario pulito, ed evitare di toccare altri oggetti, compreso il proprio corpo, quando maneggiano le prove. Fattori ambientali, come calore ed umidità, possono anche accelerare la degradazione del DNA. Ad esempio, tracce bagnate o umide che sono chiuse in plastica creeranno un terreno di crescita di batteri che possono distruggere le prove di DNA. Conseguentemente, le prove biologiche dovrebbero essere asciugate completamente all'aria, chiuse in carta, e correttamente etichettate. Trattato in questo modo, il DNA può essere conservato per anni senza rischi di degradazione, persino a temperatura ambiente...".

L'adozione dei protocolli e delle procedure fin qui esposte sono universalmente applicate non solo in altri Continenti ma anche a livello Europeo così come riportato nell'*Interpol Handbook on DNA data Exchange and Practice - Recommendations from the Interpol DNA Monitoring Expert Group - second edition 2009*:

- "... campioni fluidi... Se sangue, seme o saliva è presente come liquido o traccia umida, deve essere prelevata usando un tampone asciutto o pipetta. Tamponi di cotone sterile sono disponibili per prelevare tracce della crime scene. La traccia deve essere prelevata su un'area del tampone e non strofinando sopra l'intera superficie della

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia

- Le tracce di natura biologica campionate nel corso del I° sopralluogo (2 - 4 Novembre 2007) sono state conservate a temperatura controllata (-20°C) immediatamente al momento della raccolta (nel freezer della casa della vittima)
- Poi una prima *trance* di tracce, ritenute più significative, sono state trasportate ai laboratori di Genetica Forense del Servizio Polizia Scientifica già dalla sera del 3 Novembre (sabato) e messe in lavorazione il giorno successivo (domenica)

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia Questione dei tempi di conservazione delle tracce repertate (SAL prime 2 pagine)

I^a Tracce di reperti analizzati

Stato Avanzamento Lavori (SAL)

SERVIZIO POLIZIA SCIENTIFICA
DIV. III
AREA INDAGINI BIOLOGICHE

FUNZIONARIO

N. Fascicolo	Cod.	Inizio	Isp./Per.	Unità	In Comune	Num.	Data alla
N. Trattazione	BIO	Oper.	Coordinatore	Operativa	con	Reperti	Scrittura
L10747-01	100010747					20	

Elenco Reperti

Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto
L10747-01-000	1	presunta S.E. prelevata dalla finestra lato esterno <i>(Rep0)</i>

Elenco Tracce

Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia	Quantità Estratt	Ubicazione Estratto
L10747-01-000-01	200047029	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	50	260/D4
TETRAMETILBENZIDINA LUMINOL CROMATOGRAFIA GEL SILIC IMMUNOELETTROSI NERESI METODICHE IMMUNOLOGICHE SPECIE ANIMALE					
POSITIVO					

Stato Avanzamento Lavori (SAL)

Data 1 ^a	Data 2 ^a	Data 3 ^a	Data 1 ^a	Data 2 ^a	Data 3 ^a	Data 1 ^a	Kit	Data 2 ^a	Kit
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Com
05-11-07									

Stato Avanzamento Lavori (SAL)

Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto
L10747-01-001	2	tracce di presunta S.E. rinvenute sulla stoffa del piumone

Elenco Tracce

Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia	Quantità Estratt	Ubicazione Estratto
L10747-01-001-01	200047030	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	50	260/D5
TETRAMETILBENZIDINA LUMINOL CROMATOGRAFIA GEL SILIC IMMUNOELETTROSI NERESI METODICHE IMMUNOLOGICHE SPECIE ANIMALE					
POSITIVO					

Data 1 ^a	Data 2 ^a	Data 3 ^a	Data 1 ^a	Data 2 ^a	Data 3 ^a	Data 1 ^a	Kit	Data 2 ^a	Kit	Data 3 ^a	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run 3
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strumento
05-11-07												/	/	/

Elenco Tracce

Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia	Quantità Estratt	Ubicazione Estratto
L10747-01-001-02	200047031	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	50	260/D6
TETRAMETILBENZIDINA LUMINOL CROMATOGRAFIA GEL SILIC IMMUNOELETTROSI NERESI METODICHE IMMUNOLOGICHE SPECIE ANIMALE					
POSITIVO					

Data 1 ^a	Data 2 ^a	Data 3 ^a	Data 1 ^a	Data 2 ^a	Data 3 ^a	Data 1 ^a	Kit	Data 2 ^a	Kit	Data 3 ^a	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run 3
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strumento
05-11-07												/	/	/

05/11/2007

Primi risultati genetici

**Valutazione delle analisi effettuate
sul Reperto 36 (coltello) e relative
conclusioni dei periti**

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

- Problematica del kit utilizzato per la quantificazione in Real-Time (anche in riferimento alla traccia 165/B)
- Problematica della quantificazione mediante Fluorimetro Qubit™
- Mancato riferimento in relazione tecnica dell'utilizzo del fluorimetro per la quantificazione delle tracce 36/A-B-C
- Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione
- Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica del kit utilizzato per la quantificazione in Real-Time PCR

Avendo specificato lo strumento utilizzato appariva superfluo specificare anche il kit dal momento che, all'epoca delle analisi (11/2007 – 5/2008), ne esisteva in commercio *solo uno* compatibile con quello strumento

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Successivamente è stata eseguita la quantificazione del DNA estratto dalle campionature predette.

A pag.78 della RTIGF sono riportate le seguenti tabelle

Estrazione DNA BioRobot "EZ1" (QIAGEN)	traccia A presunta cellula di stabilimento eseguita	traccia B presunta sostanza biologica eseguita	traccia C presunta sostanza biologica eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della Applied Biosystems	⊕	⊕	⊕

Estrazione DNA BioRobot "EZ1" (QIAGEN)	traccia D presunta cellula di stabilimento eseguita	traccia E presunta sostanza biologica eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della Applied Biosystems	⊕	⊕

Estrazione DNA BioRobot "EZ1" (QIAGEN)	traccia F presunta cellula di stabilimento eseguita	traccia G presunta sostanza biologica eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della Applied Biosystems	⊕	⊕

Da quanto riportato nelle tabelle predette si evince che la quantificazione del DNA è stata effettuata per tutte le campionature mediante Real Time PCR, utilizzando apparecchiatura 7700 Sequence Detector ABI PRISM™ della ditta Applied Biosystems.

Non è riportata, invece, alcuna indicazione circa il kit utilizzato per la quantificazione del DNA.

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".

**perizia pag.54
(e pag.108)**

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Problematica del kit utilizzato per la quantificazione in Real-Time

DOMANDA - E lei parlava prima se non sbaglio di un'analisi specifica e generica della traccia e della quantificazione.
RISPOSTA - Sì.
DOMANDA - Queste procedure per quanto concerne la piccola traccia trovata sul gancetto mi illustra come sono state fatte?
RISPOSTA - Seguendo i protocolli...
DOMANDA - La quantificazione della traccia sul gancetto.
RISPOSTA - Utilizzando il kit Quantifiler l'Applied Biosystem.
DOMANDA - E qual è la quantità, approssimativa?
RISPOSTA - Mi scusi, non capisco, la quantità di cosa? Dell'estratto di DNA totale?
DOMANDA - Sì, sì.
RISPOSTA - Al momento io non ce l'ho però, diciamo, è una quantità adatta per avere poi l'amplificato, perché si è avuto l'amplificato.
DOMANDA - Sì, lei sa, noi due ci siamo già viste in udienza preliminare, che una delle cose che noi segnaliamo è la quantità di traccia mi interessava sapere come è stata quantificata questa traccia.
RISPOSTA - Con il software adatto per la quantificazione che è incluso praticamente nello strumento, nel 7700 che noi utilizziamo.
DOMANDA - Sì, quello che le chiedo è questo: premesso che noi stiamo parlando, l'ha già detto lei, di una traccia sui gancetti, è giusto?
RISPOSTA - Sì.

R.G. 8/08 - 22/05/2009 c/ Amanda Knox Marie + 1

108

Verb. C.d.A. pag 108

**avv. Buongiorno
dr.ssa Stefanoni**

Inoltre,
l'informazione era
ricavabile dagli atti.

Infatti il kit era stato
specificato nel corso
dell'Udienza davanti
alla Corte di Assise
(22/05/2009), ad una
precisa domanda
dell'avv. Buongiorno

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto

36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica quantificazione mediante Fluorimetro Qubit™

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"*, ovvero sia un valore che si deve ritenere non solo al di sotto della soglia di sensibilità del Fluorimetro indicata dal manuale (concentrazioni di DNA pari a 0.2 ng/µl), ma al di sotto del valore di 0.08 ng/µl, valore 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

In merito alla successiva amplificazione degli estratti a pag.78-79 della CT si legge testualmente:

"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".

A pag 31 della CT sono riportate le modalità di *"amplificazione mediante PCR"*: *"allo scopo di ottenere il profilo di DNA dal materiale genetico estratto dalle tracce analizzate sono state amplificate le seguenti regioni genetiche (loci) mediante l'impiego di coppie di oligonucleotidi-primers specifici per le regioni fiancheggianti i vari polimorfismi di interesse: D3S1358, HumvWA31, D16S539, HumFGA, HumTH01, TPOX, CSF1PO, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D19S433, D2S1338, amelogenin (sex test) utilizzando il kit commerciale "AmpFISTRIdentifler" della Applied Biosystem (Foster City, CA) secondo gli "User Manual".*

PERIZIA PAG 57

DR.SSA STEFANONI →

DR.SSA GINO →

campione?

RISPOSTA - 50 micro litri.

DOMANDA - Questi 50 micro litri sono stati poi ulteriormente concentrati oppure?

RISPOSTA - Sì.

DOMANDA - E che volume ha ottenuto?

RISPOSTA - Intorno ai 20, 22, 23 micro litri.

DOMANDA - Dopodiché si è passato alla fase, appunto, della quantificazione?

RISPOSTA - Sì.

DOMANDA - Quantificazione che ha fatto con real time immagino?

RISPOSTA - Eh, sì.

DOMANDA - E ha quantificato solo la quantità di D.N.A. in toto o ha anche provato a effettuare una quantificazione specifica per il cromosoma Y?

RISPOSTA - No, soltanto per la generica.

DOMANDA - **Si ricorda qual è la quantità di D.N.A.?**

RISPOSTA - Allora la quantità totale che io ho avuto poi alla fine perché ovviamente dipende sia dal numero di cicli a cui io ho la soglia di segnale e sia poi al risultato espresso come concentrazione quindi in nanogrammi micro litro.

DOMANDA - Ecco se me lo può esprimere in nanogrammi micro litro?

RISPOSTA - In nanogramma micro litro era molto bassa, era qualcosa come...

GIUDICE - Se ne ha un ricordo preciso cioè se deve buttare la...

RISPOSTA - Non mi ricordo la quantità totale, ecco!

DOMANDA - **Ma secondo lei era nell'ordine di qualche nanogrammo o quasi al picogrammo?**

RISPOSTA - Sì, era nell'ordine di qualche centinaio di picogrammi, questo sì, sulla quantità totale.

DOMANDA - Questo le ha fatto pensare che ci si potesse trovare davanti a quello che noi chiamiamo (inc.) ?

RISPOSTA - Sì, è possibile, certo!

**ERA CHIARAMENTE
UNA STIMA IL
VALORE DICHIARATO
FATTA SULLA BASE DEL
RISULTATO VISIVO**

(ELETTROFEROGRAMMA)

UDIENZA GUP

pag 178

R.G. 662/2000/2008 c/ KNOX AMANDA MARIA + 2

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Problematica quantificazione mediante Fluorimetro Qubit™

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"*, ovvero sia un valore che si deve ritenere non solo al di sotto della soglia di sensibilità del Fluorimetro indicata dal manuale (concentrazioni di DNA pari a 0.2 ng/μl), ma al di sotto del valore di 0.08 ng/μl, valore 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

In merito alla successiva amplificazione degli estratti a pag.78-79 della CT si legge testualmente:

"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".

A pag 31 della CT sono riportate le modalità di "amplificazione mediante PCR": "allo scopo di ottenere il profilo di DNA dal materiale genetico estratto dalle tracce analizzate sono state amplificate le seguenti regioni genetiche (loci) mediante l'impiego di coppie di oligonucleotidi-primers specifici per le regioni fiancheggianti i vari polimorfismi di interesse: D3S1358, HumvWA31, D16S539, HumFGA, HumTH01, TPOX, CSF1PO, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D19S433, D2S1338, amelogenin (sex test) utilizzando il kit commerciale "AmpFISTRIdentifer" della Applied Biosystem (Foster City, CA) secondo gli "User Manual".

PERIZIA PAG 57

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"*, ovvero sia un valore che si deve ritenere non solo al di sotto della soglia di sensibilità del Fluorimetro indicata dal manuale (concentrazioni di DNA pari a 0.2 ng/μl), ma al di sotto del valore di 0.08 ng/μl, valore che il Fluorimetro ha rilevato per la traccia A.

**Tale affermazione è errata
(peraltro, ripetuta anche a
pag.100)**

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica quantificazione mediante Fluorimetro Qubit™

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 "INVITROGEN"

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 $\mu\text{gr}/\text{mL}$	CONCENTRAZIONE CAMPIONE $\text{ng}/\mu\text{l}$
Standard 1	ok	
Standard 2	ok	
1%47326	too low	---
2%47327	too low	---
3%47328	0.57	0.116
4%47329	0.4	0.08
5%47330	too low	---
6%47331	too low	---

13 novembre 2007

Rep 35
Rep 36

La differenza tra valore **rilevato (0.4)** dallo strumento e valore **calcolato (0.08)** è fondamentale.

La concentrazione reale del campione in provetta è **0.08 ng/µl**

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica quantificazione mediante FluorimetroQubit™

CALCOLIAMO:

Valore letto x 200
μl di campione

Formula generale $\frac{\text{Valore letto} \times \text{μl di campione}}{1000} = \text{concentrazione DNA in provetta}$

0.4 x 200
1 di campione

Caso specifico: $\frac{0.4 \times 200}{1000} = 0.08 \text{ ng/μl}$

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica quantificazione mediante Fluorimetro Qubit™

Intervallo di sensibilità: da 0,2 ng a 100 ng

The screenshot shows the Invitrogen website interface. At the top left is the Invitrogen logo. To the right are links for 'Quick Order' and 'Italy' with a flag icon. Below this is a red navigation bar with links for 'Products & Services', 'Applications', 'Brands', 'Guides', 'Support', and 'Corporate'. A search bar is located below the navigation bar, with the text 'Search by catalog number or keyword' and a 'Search' button. To the right of the search bar is a shopping cart icon with '0 Items'. Below the search bar is a 'LOGIN' button. The main content area is titled 'Product Details' and shows the breadcrumb path: 'Invitrogen Life Science > Products & Services > Kits & Assays > Nucleic Acid Quantitation Assay Kits > Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit, 500 assays *0.2-100 ng* *for use with the Qubit™ fluorometer*'. There are 'Print' and 'Email' icons. A 'Related Applications' box contains a link to 'Nucleic Acid Quantitation'. On the left, there is a 'Related Product Types' section with links for 'Biochemical Assay Kits', 'Cell Analysis Kits', and 'Cell Based Assay Kits'. The product name 'Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit, 500 assays *0.2-100 ng* *for use with the Qubit™ fluorometer*' and catalog number 'Cat. No. Q32854' are prominently displayed.

Cosa accade se la quantità di Dna incognita letta dal fluorimetro è **minore di 0.2 ng**? **NON SI HA ALCUN DATO NUMERICO** ma una “valutazione” data dallo strumento in base alla soglia di sensibilità in esso presente: *too low (troppo basso)*

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica quantificazione mediante Fluorimetro Qubit™

Se di un campione ho misurato 1 μl e il fluorimetro non fornisce un numero (*too low*) vuol dire che in 1 μl la quantità di Dna è al di sotto di 0,2 ng; ma se io, in teoria, avessi potuto misurare *tutto* il volume del campione a mia disposizione, cosa avrei potuto ottenere?



Ad es. se 1 μl = 0,02 ng (lo strumento *non* lo legge: *too low*)
in 20 μl = 0,02 x 20 = 0,40 ng totali di Dna

(lo strumento darebbe un numero)

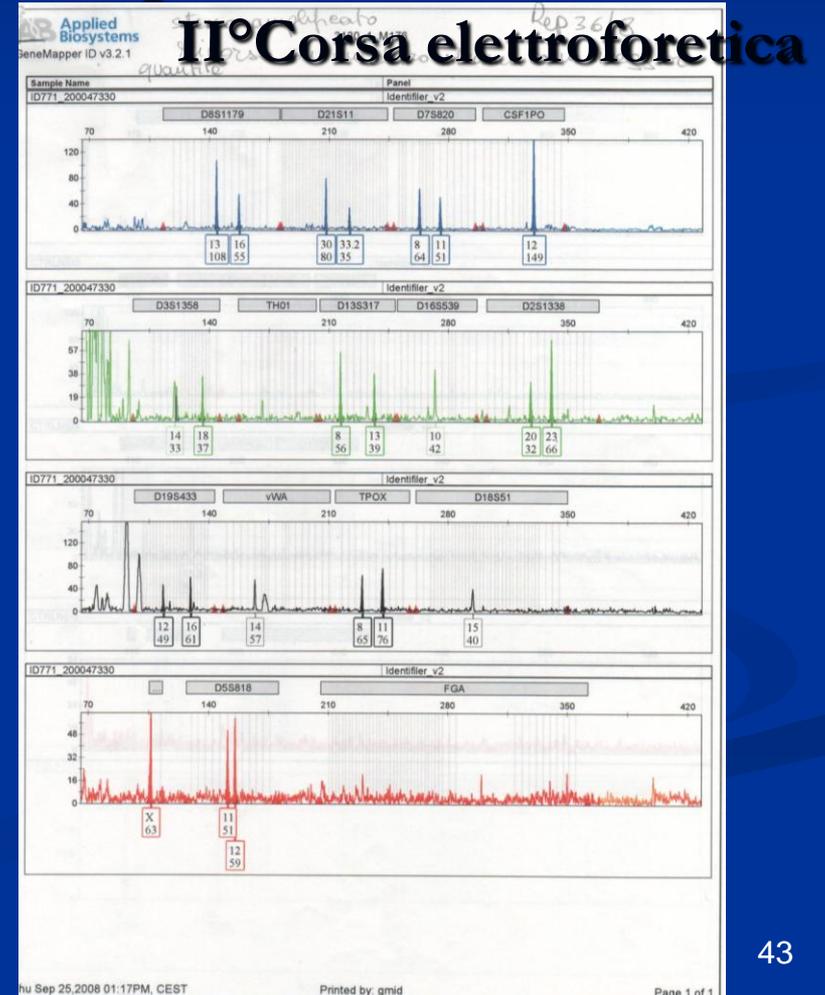
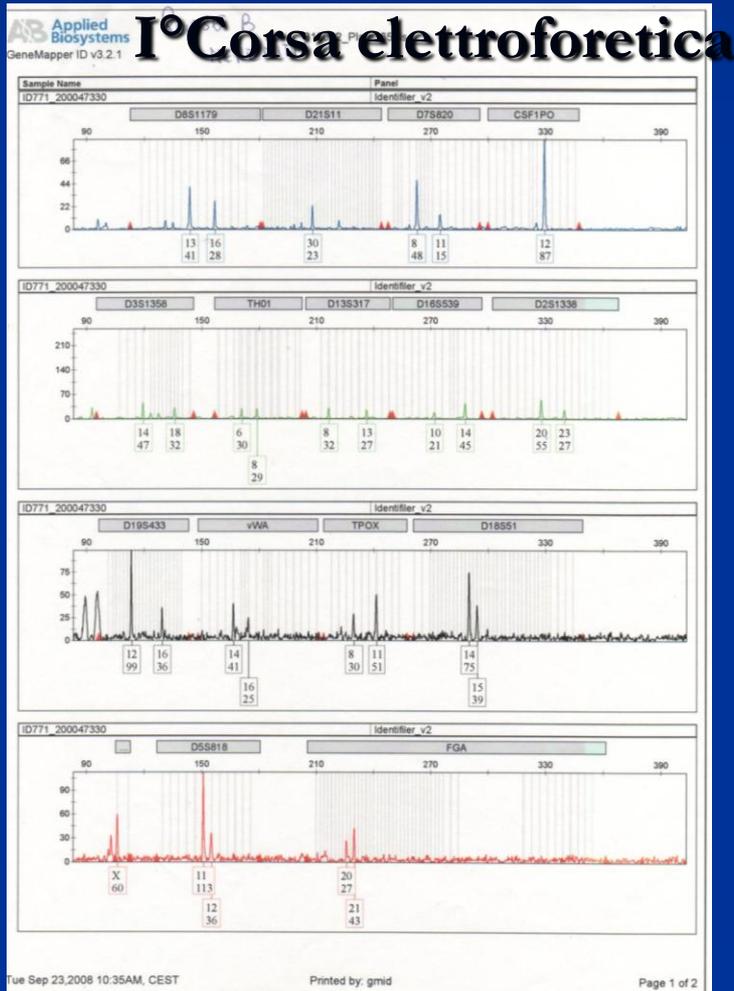
Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Mancato riferimento in relazione tecnica dell'utilizzo del fluorimetro per la quantificazione delle tracce 36/A-B-C

- Per 54 delle complessive 460 tracce analizzate, è stata effettuata la quantificazione mediante il fluorimetro QUBIT™ nelle date 6 -13 e 14 novembre 2007, mentre per le restanti è stata utilizzata la tecnica in Real-Time PCR
- Questa variazione rispetto alla abituale procedura di quantificazione non è stata riportata in relazione tecnica per semplice dimenticanza al momento della stesura della stessa essendo stato un evento del tutto eccezionale l'utilizzo di una metodica di quantificazione diversa da quella abituale, risalente ad oltre sei mesi prima.

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

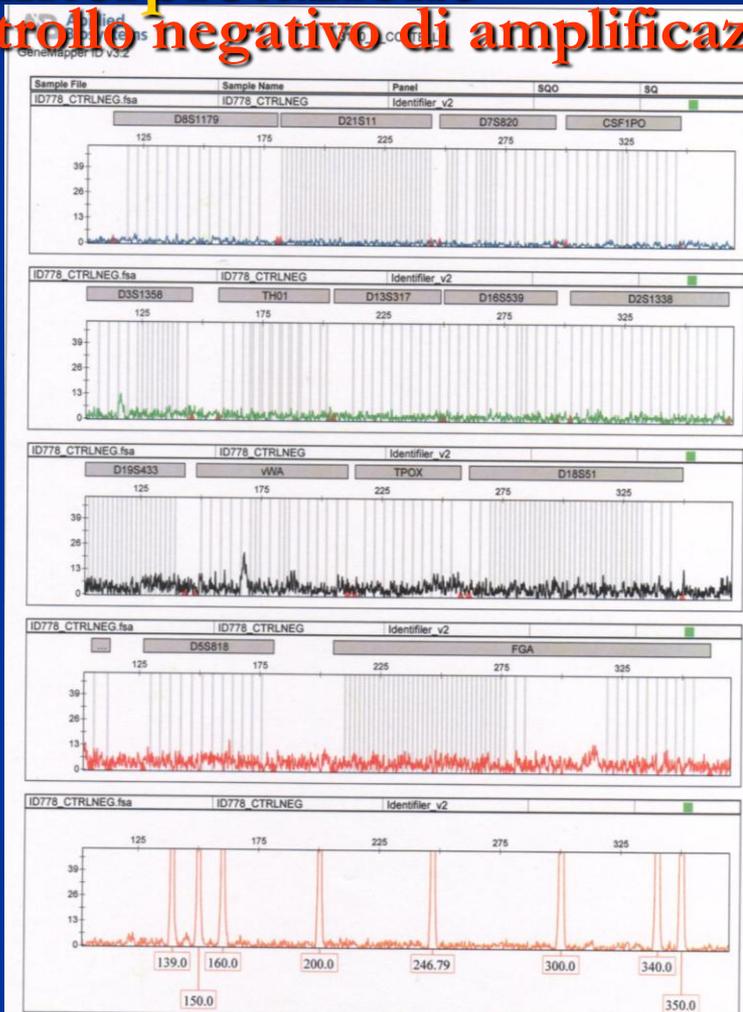
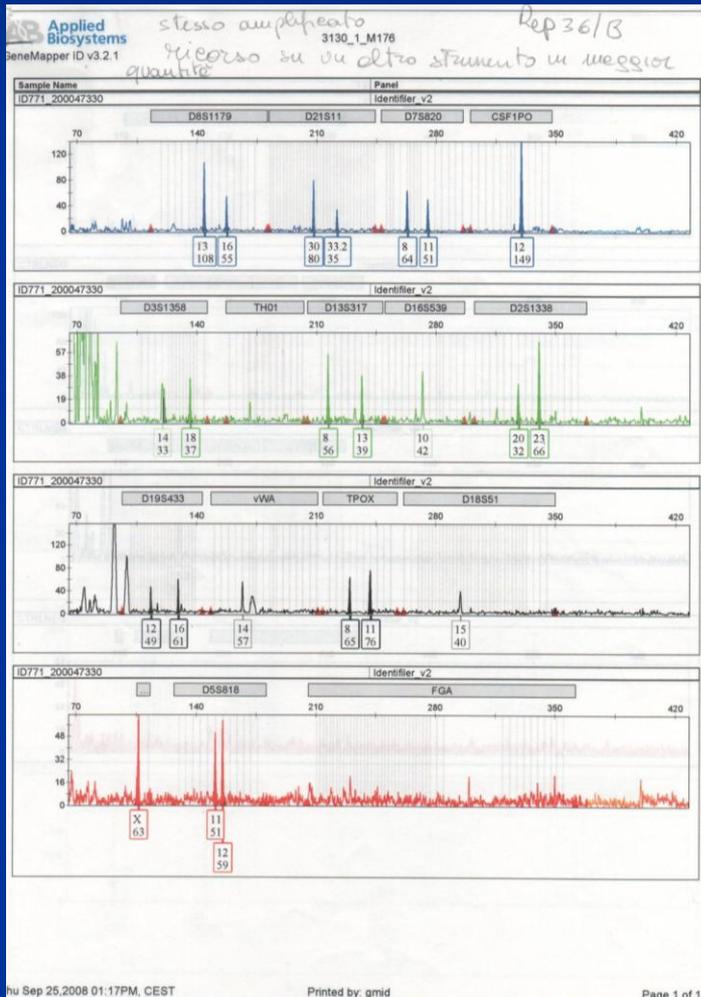
Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

Controllo negativo di amplificazione



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione: **VALORE-SOGLIA**

“However, the conservative nature of these commonly used thresholds can also arbitrarily remove from consideration legitimate signal from trace and secondary contributors to an evidentiary sample-matters of critical importance in many criminal investigations.” *J.R. Gilder et al., J. Forensic Sci. 2007, Vol.52, N.1 pag.97-101*

“Tuttavia, la natura conservativa di queste soglie comunemente utilizzate può anche eliminare in maniera arbitraria segnale legittimo ed altri segnali di contributori secondari in un campione probatorio - questione di importanza critica nelle tante investigazioni criminali.”

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

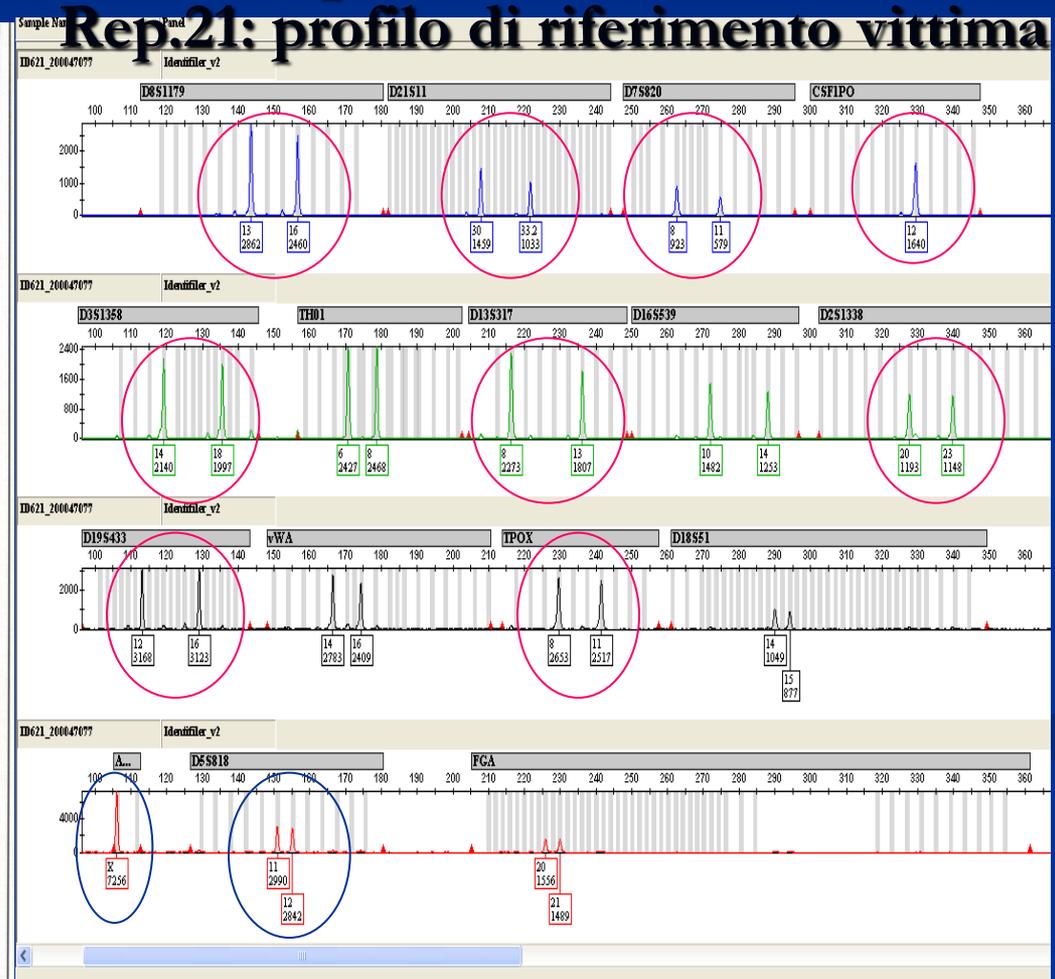
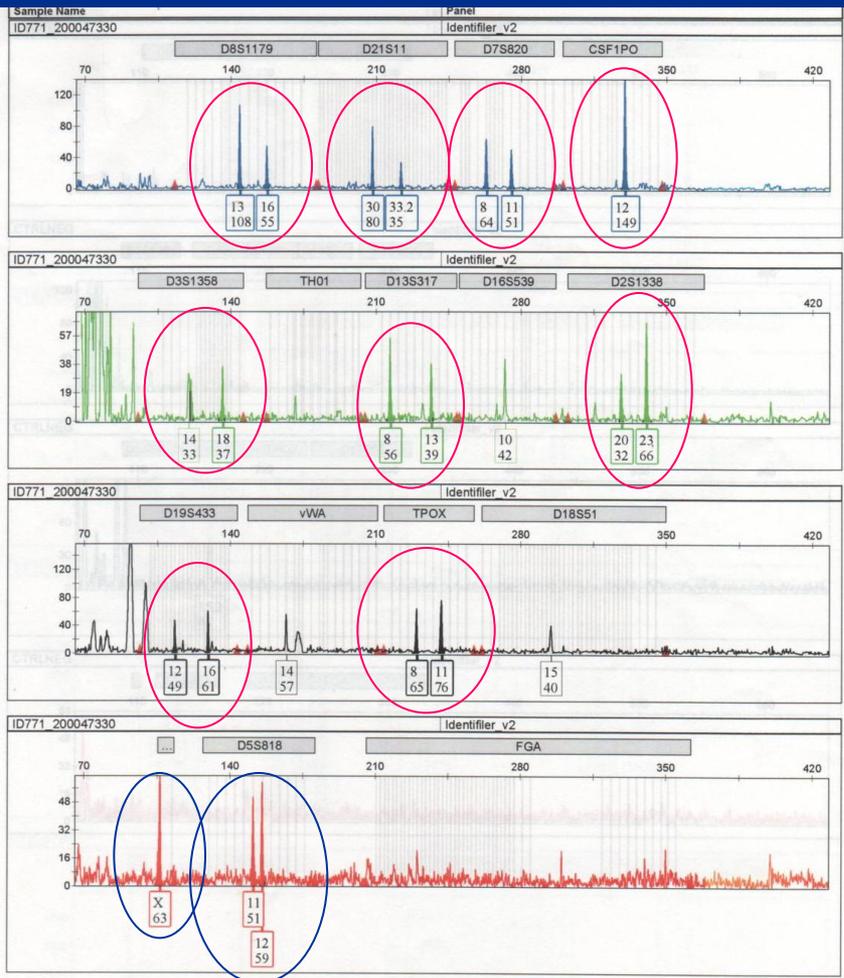
Concetto di **PROFILO COMPLETO** o **INCOMPLETO**

Un profilo genetico si definisce **COMPLETO** quando sono presenti picchi allelici in ognuno dei *loci* genici presenti nel kit di tipizzazione (PCR), tipicamente 16 *loci* genici (vecchi kit) o 17 *loci* genici (kit di nuova generazione).

Si definisce **INCOMPLETO** quando non sono determinati i picchi di fluorescenza in uno o più *loci* genici per ragioni insite nella qualità del DNA in analisi

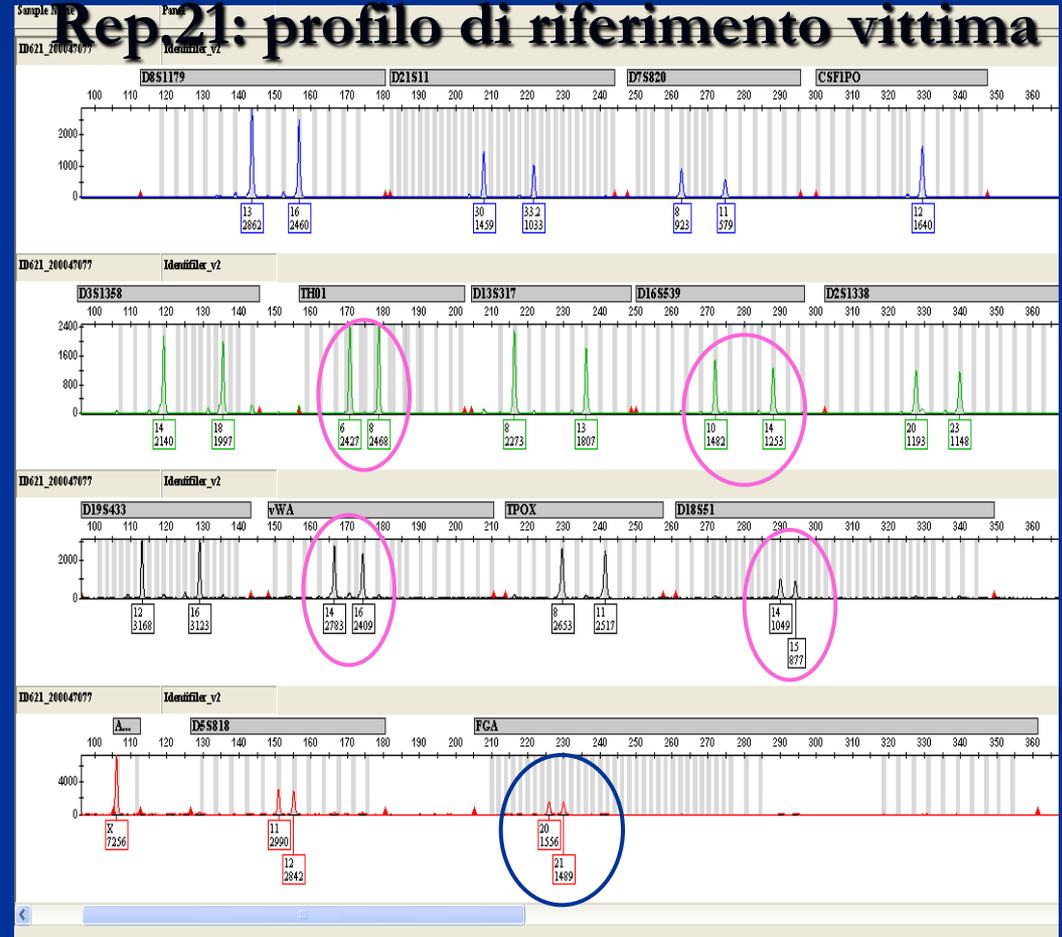
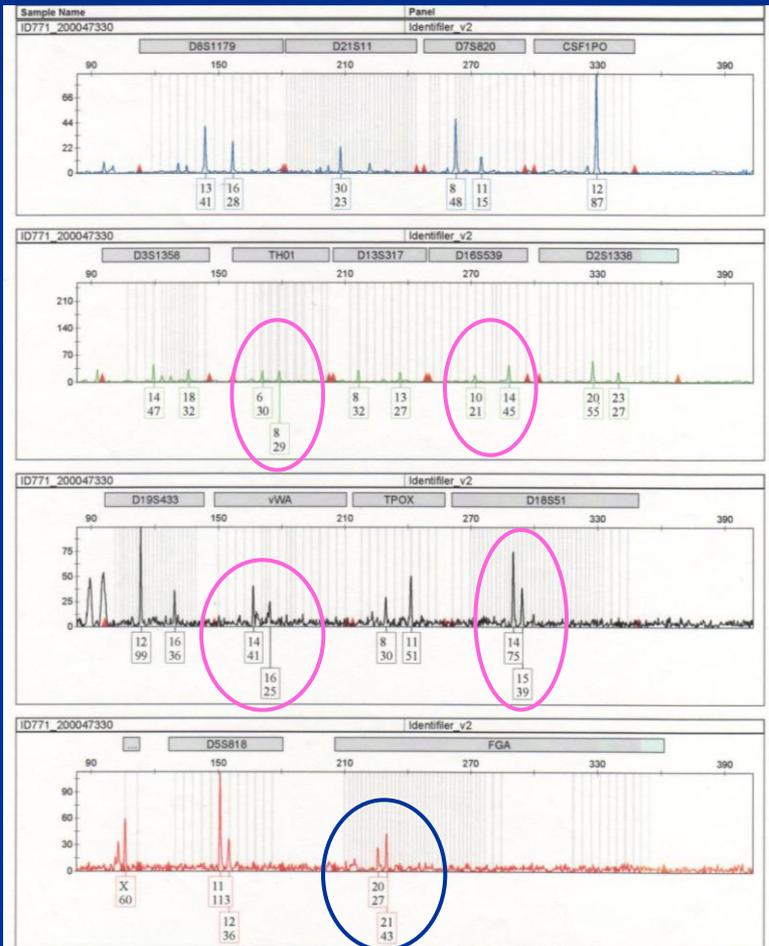
Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

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

Locus	Campionatura B I corsa elettroforetica	
	Altezza picchi	Bilanciamento degli eterozigoti $Hb = \frac{a}{a+b}$
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

**Valori di bilanciamento
II° corsa elettroforetica**

D7: 0,79 (51/64 RFU)

D19: 0,80 (49/61 RFU)

TPOX: 0,85 (65/76 RFU)

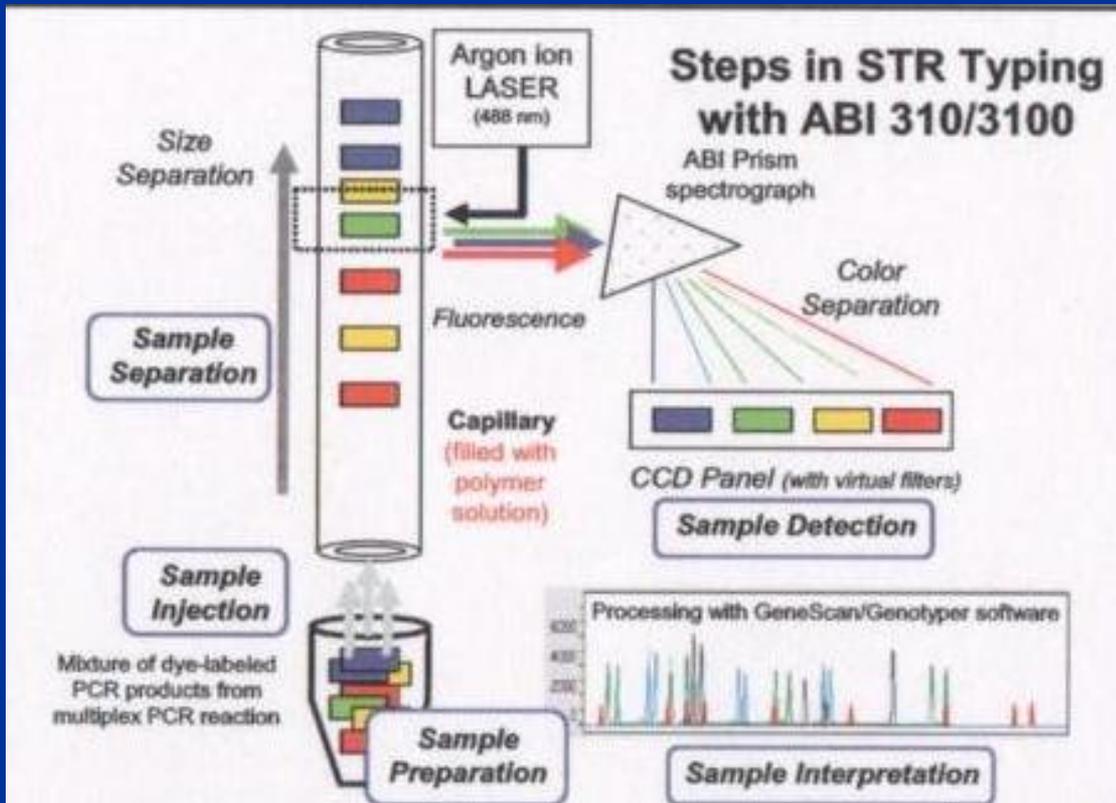
D5: 0,86 (51/59 RFU)

perizia pag.76

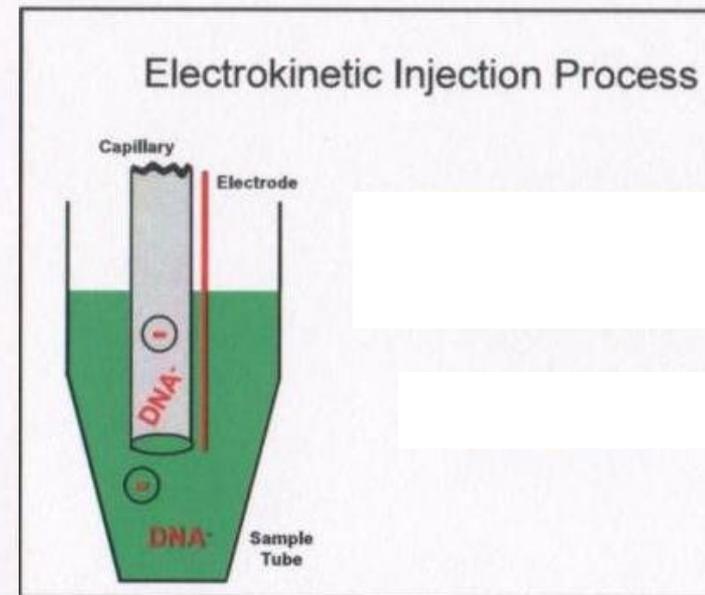
Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

Perché uno stesso campione di DNA sottoposto a 2 corse elettroforetiche può mostrare picchi di altezze diverse?



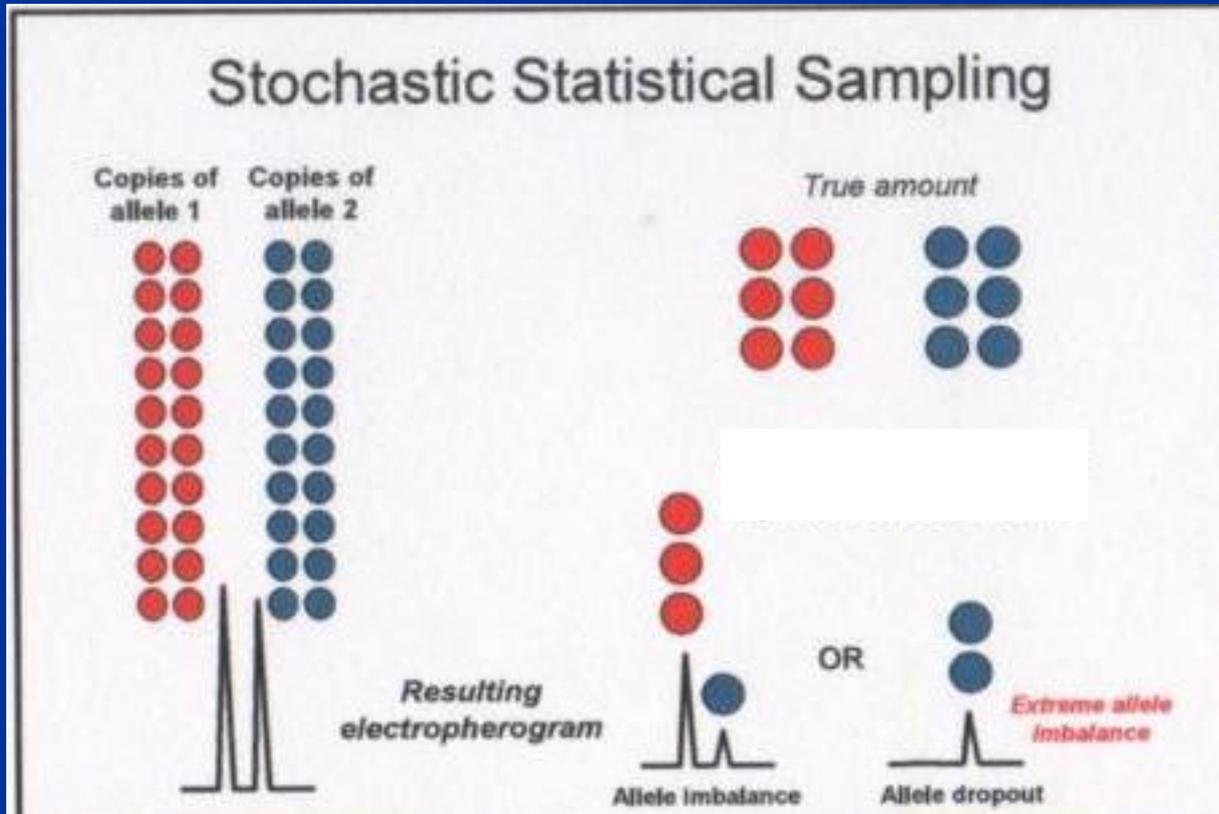
Processo elettroforetico



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

Perché uno stesso campione di DNA sottoposto a due corse elettroforetiche può mostrare picchi di altezze diverse?



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

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).

perizia pag.77

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

In effetti la CT non ha ripetuto l'amplificazione dell'estratto ma ha eseguito due corse elettroforetiche dello stesso amplificato e ciò che appare subito evidente, dal confronto tra le due distinte corse, è la presenza di sbilanciamento dei picchi con inversione degli stessi, fino ad arrivare in alcuni casi a perdita di alleli o alla presenza di un picco aggiuntivo (cfr. tracciati elettroforetici I-II corsa, Sep 2008).

perizia pag.79

Questo picco
aggiuntivo è
estraneo al
profilo della
vittima?

(Può quindi
essere definito
un *Drop-in?*)

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

Gill P. e Buckleton J.S. (2010) affermano di concordare con Budowle B. et al. (2009) sulle questioni espresse relativamente alle problematiche inerenti la contaminazione. Riguardo, inoltre, la critica da questi ultimi sollevata nei confronti dei primi riguardo la restrizione della definizione di *drop-in* alle sole lavorazioni interne al laboratorio, lo stesso Gill sottolinea 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 reperazione delle prove ed alla stessa unità del DNA* (Gill P., Kirkham A., 2004).

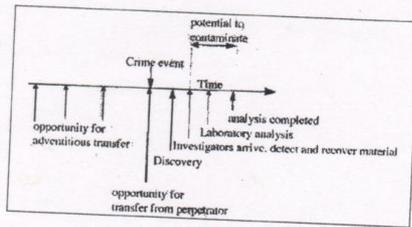


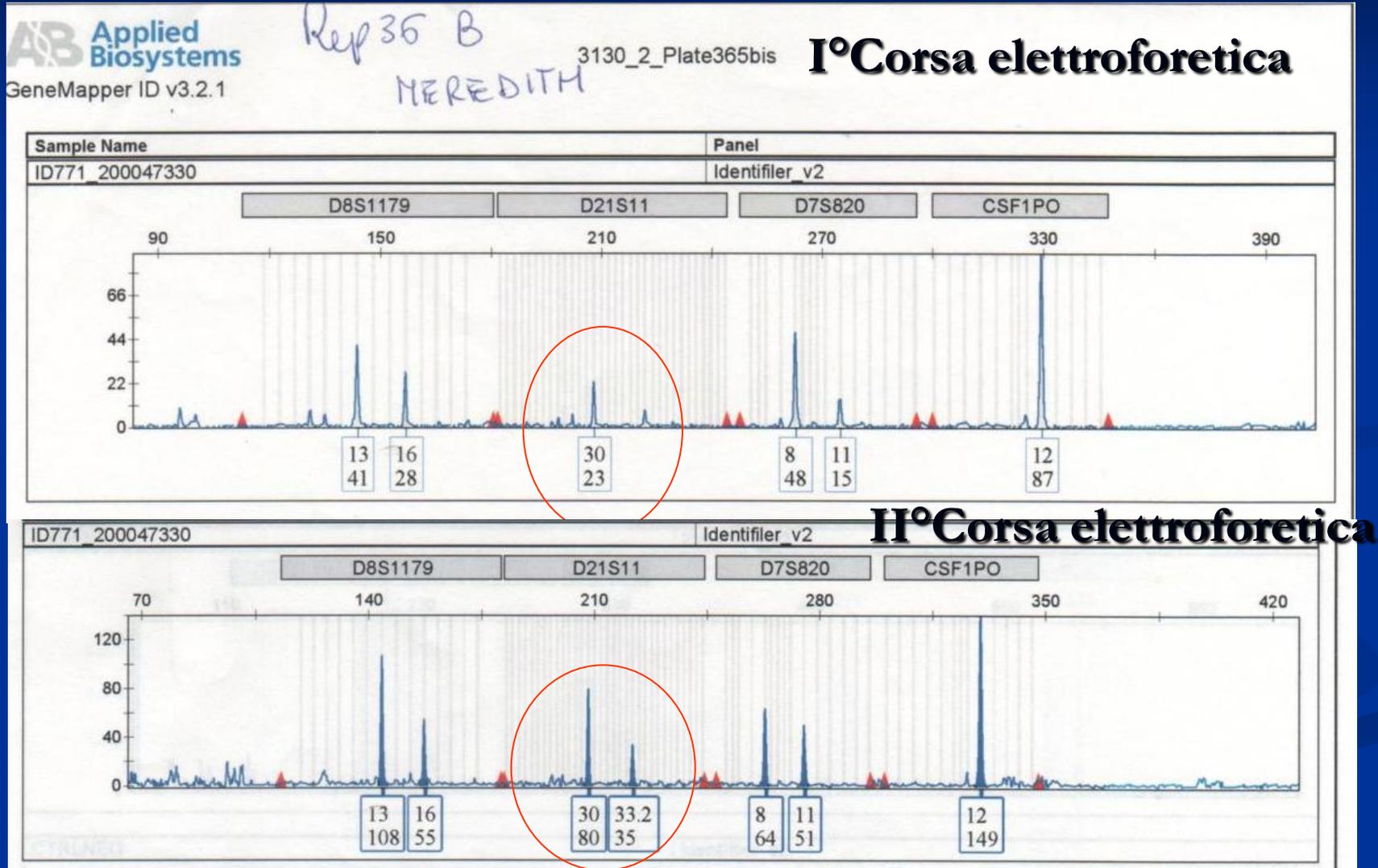
Figura 1: sequenza temporale generalizzata volta ad illustrare le possibili modalità attraverso le quali può avvenire la propagazione di un profilo di DNA.

Gli stessi Autori, riguardo la problematica della *contaminazione* sottolineano la differenza sostanziale tra il fenomeno del *drop-in* e la cosiddetta "*gross contamination*": mentre la prima si riferisce alla comparsa di uno o due alleli per campione originanti da sorgenti indipendenti, la seconda si riferisce invece a molteplici alleli provenienti da un'unica sorgente sconosciuta (e pertanto questi stessi alleli

Definizione di Drop-in

“..comparsa di uno o due alleli per campione originanti da sorgenti indipendenti...”, (dal DNA del campione in esame)

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti



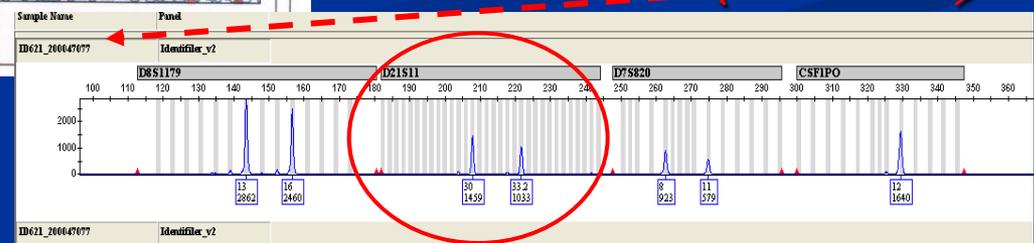
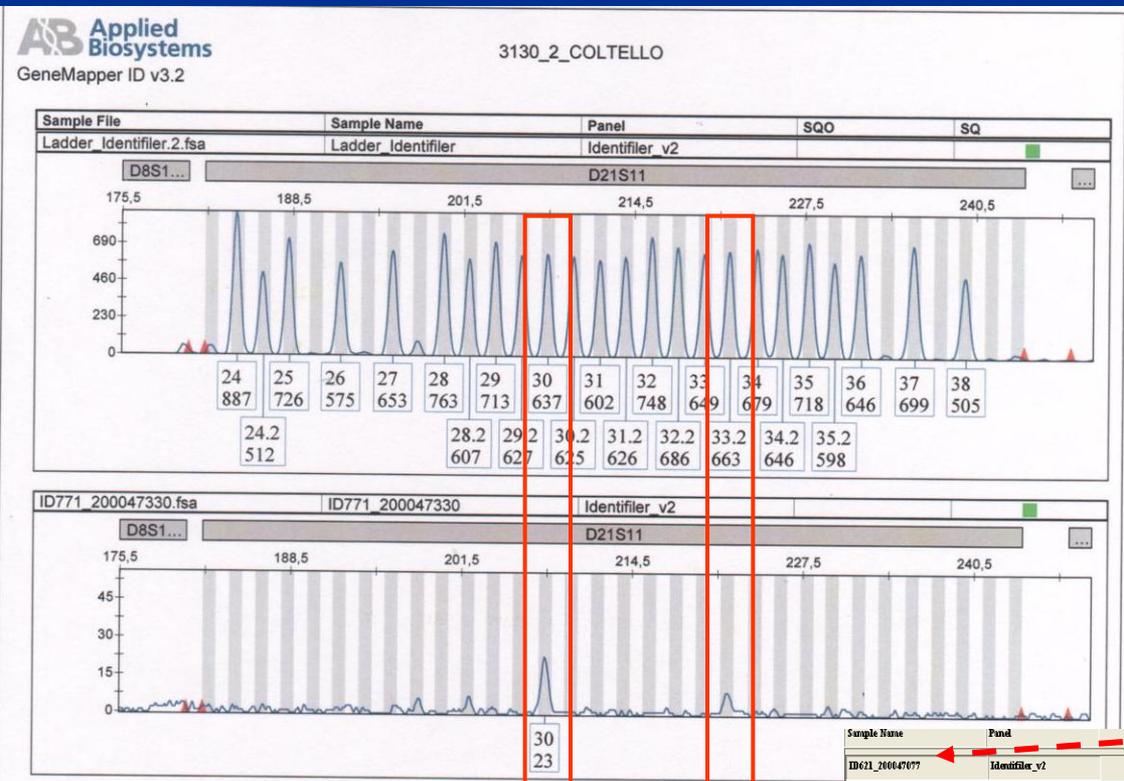
Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

Conclusione

l'allele 33.2 nel D21 non è un Drop-in ma un allele appartenente al profilo della vittima

Rep.21 profilo di riferimento vittima_(ID47077)



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

Notevoli perplessità, invece, sorgono sul quantitativo di DNA estratto dalla **traccia B** che sarebbe stato aggiunto alla mix di reazione. Il condizionale è d'obbligo in quanto 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.

In particolare, dapprima, afferma di aver concentrato l'estratto, 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 (*mai eseguita!*) 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 dal momento che 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.

In pratica è stata eseguita una amplificazione senza conoscere uno dei parametri fondamentali ossia la concentrazione del DNA eventualmente estratto dalla traccia B.

Ciò che sorprende è che, data la delicatezza dell'indagine, non sia stata eseguita la quantificazione delle tracce B e C con la Real Time, come è avvenuto per le tracce D-E-F-G al fine di accertare se si fosse in presenza di un campione Low Copy Number (LCN), per il quale si sarebbe dovuto adottare un procedimento diverso e più complesso.

L'ipotesi di avere un campione che poteva essere considerato LCN è stata prospettata dalla Dott.ssa Gino nel corso dell'udienza GUP ed è stata condivisa dalla Dr.ssa Stefanoni ("*Si è possibile, certo!*", pag. 178) la quale, pur consapevole delle problematiche inerenti i campioni con basso quantitativo di DNA (Low Copy Number), non ha ritenuto opportuno applicare alcuna delle precauzioni che vengono raccomandate dalla comunità scientifica in caso di LCN.

L'ipotesi di avere un campione che poteva essere considerato LCN è stata prospettata dalla Dott.ssa Gino nel corso dell'udienza GUP ed è stata condivisa dalla Dr.ssa Stefanoni ("*Si è possibile, certo!*", pag. 178) la quale, pur consapevole delle problematiche inerenti i campioni con basso quantitativo di DNA (Low Copy Number), non ha ritenuto opportuno applicare alcuna delle precauzioni che vengono raccomandate dalla comunità scientifica in caso di LCN.

Perizia, pag.60

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Problematica sulla qualità del profilo genetico della traccia 36/B e sua interpretazione

campione?
RISPOSTA - 50 micro litri.
DOMANDA - Questi 50 micro litri sono stati poi ulteriormente concentrati oppure?
RISPOSTA - Sì.
DOMANDA - E che volume ha ottenuto?
RISPOSTA - Intorno ai 20, 22, 23 micro litri.
DOMANDA - Dopodiché si è passato alla fase, appunto, della quantificazione?
RISPOSTA - Sì.
DOMANDA - Quantificazione che ha fatto con real time immagino?
RISPOSTA - Eh, sì.
DOMANDA - E ha quantificato solo la quantità di D.N.A. in toto o ha anche provato a effettuare una quantificazione specifica per il cromosoma Y?
RISPOSTA - No, soltanto per la generica.
DOMANDA - Si ricorda qual è la quantità di D.N.A.?
RISPOSTA - Allora la quantità totale che io ho avuto poi alla fine perché ovviamente dipende sia dal numero di cicli a cui io ho la soglia di segnale e sia poi al risultato espresso come concentrazione quindi in nanogrammi micro litro.
DOMANDA - Ecco se me lo può esprimere in nanogrammi micro litro?
RISPOSTA - In nanogramma micro litro era molto bassa, era qualcosa come...
GIUDICE - Se ne ha un ricordo preciso cioè se deve buttare...
RISPOSTA - Non mi ricordo la quantità totale, ecco...
DOMANDA - Ma secondo lei era nell'ordine di qualche nanogrammo o quasi al picogrammo?
RISPOSTA - Sì, era nell'ordine di qualche centinaio di picogrammi, questo sì, sulla quantità totale.
DOMANDA - Questo le ha fatto pensare che ci si potesse trovare davanti a quello che noi chiamiamo (inc.) ?
RISPOSTA - **Sì, è possibile, certo!**

Dr.ssa GINO

D.: Questo le ha fatto pensare che ci si potesse trovare davanti a quello che noi chiamiamo (inc.)?

Dr.ssa STEFANONI

R.: Sì, è possibile, certo!

Trascrizione pag.178 GUP

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Concetto generale di contaminazione

Se un reperto o una traccia viene accidentalmente contaminato da DNA estraneo al reperto o traccia, l'analisi di tipizzazione del DNA mostrerà il profilo genetico (completo o parziale) appartenente al soggetto contaminante, quindi individuabile in maniera precisa, se precedentemente noto il suo profilo genetico.

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

potenziale di contaminazione o drop-in allelico. Studi di validazione condotti con analisi di replicati di basse quantità di DNA sono stati quindi effettuati al fine di stabilire la soglia di drop-out e drop-in allelico usando 10, 30 e 100 pg con diversi kit commerciali per la tipizzazione STR in condizioni di numero di cicli PCR sia normale che aumentato. I risultati ottenuti con campioni eterozigoti dimostrano che un approccio basato sull'analisi dei replicati fornisce risultati attendibili con campioni provenienti da unica sorgente, qualora sia stato creato un profilo di consenso. A causa della natura limitata dei campioni biologici che possono essere recuperati da tracce presenti sulla scena del crimine, spesso bisogna decidere se continuare o meno con l'analisi di basse quantità di DNA. Così come per ogni misura scientifica, la validazione aiuta a definire i limiti delle tecniche utilizzate. Nel caso della validazione delle analisi del DNA a scopi forensi studi di sensibilità, nei quali campioni di DNA di controllo sono diluiti a basse quantità, permettono ad un laboratorio di stabilire a quale punto una tecnica di rilevazione non sia più in grado di fornire risultati attendibili. Gli Autori sostengono che l'analisi ripetuta di aliquote replicate dello stesso campione di DNA di controllo diluito permette la valutazione della riproducibilità dei risultati. **Aumentando la sensibilità della metodica di analisi incrementando il numero di cicli di PCR,** gli effetti stocastici possono diventare però più evidenti.

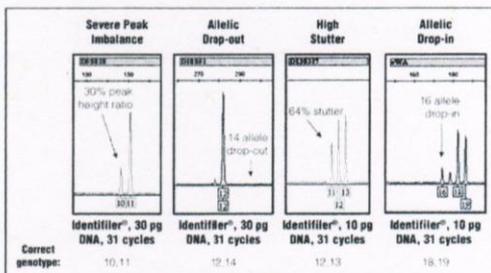


Figura 2. Effetti stocastici che avvengono casualmente durante l'amplificazione di basse quantità di DNA con un **aumentato numero di cicli di PCR.**

L'analisi ripetuta di aliquote replicate dello stesso campione di DNA di controllo diluito permette la valutazione della riproducibilità dei risultati. **Aumentando la sensibilità della metodica di analisi incrementando il numero di cicli di PCR,** gli effetti stocastici possono diventare però più evidenti.

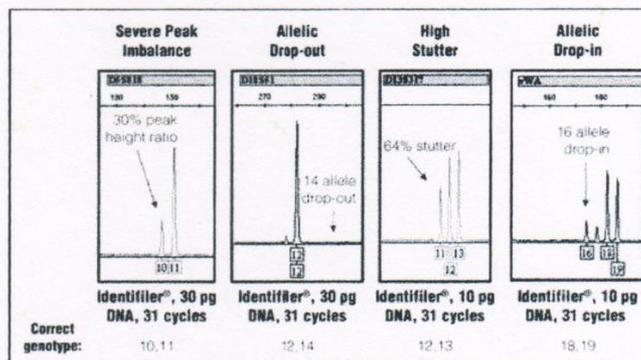


Figura 2. Effetti stocastici che avvengono casualmente durante l'amplificazione di basse quantità di DNA con un **aumentato numero di cicli di PCR.**

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

perizia pagg.101 + 102

udienza GUP, la CT ha affermato di aver *concentrato* il campione B fino a "20, 22, 23 microlitri", di averlo quantificato mediante Real Time (GUP, pag.178 "Quantificazione che ha fatto con la real time immagino?" R "Eh, si") e successivamente concentrato di nuovo fino a "10 microlitri" ma di queste operazioni non vi è traccia nella documentazione esibita (cfr. SAL). Né è noto quale fosse la quantità di DNA nell'estratto concentrato a "20, 22, 23 microlitri" e/o la quantità di DNA nell'estratto concentrato a 10 µl.

Il problema della quantificazione è di fondamentale importanza poiché in presenza di un quantitativo di DNA inferiore a 200 pg/µl 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 quantitativi 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.

Va sottolineato che ciò che accomuna tutti i protocolli proposti è la consapevolezza che il **problema principale dei campioni LCN** è la **contaminazione** del reperto, pertanto, gli Autori sono unanimemente concordi nell'affermare che 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** (decontaminazione degli ambienti, adeguate protezioni degli operatori, controllo dei reagenti impiegati nelle procedure ecc.) in quanto è ben noto che DNA contaminante a basso livello può derivare dai reagenti e da altri materiali di consumo del laboratorio, dal personale stesso e da contaminazione crociata da campione a campione.

Va fatto rilevare dalla Comunità Scientifica Internazionale che, anche qualora vengano scrupolosamente applicati i protocolli di carattere generale sopra indicati,

l'aumento della sensibilità della metodica PCR (ottenuta apportando modifiche ai protocolli standard di amplificazione, l'aumento dei cicli di PCR, il raddoppio del tempo di annealing, l'aumento del tempo di iniezione) *rappresenta in ogni caso un maggior potenziale di contaminazione* pertanto "il trasferimento secondario non può essere escluso come possibile spiegazione per i risultati di tipizzazione LCN ottenuti" (Budowle et al., 2009).

Si fa, inoltre, presente che vi è la possibilità che il prodotto di PCR di un LCN possa evidenziare risultati che provengono da un DNA amplificato che contamina un campione non ancora amplificato e ciò in quanto, come precedentemente riportato, anche il DNA amplificato è molto più concentrato del DNA templato non amplificato, il primo sarà copiato in maniera preferenziale durante la PCR.

Per questo motivo *i campioni in esame debbono essere usualmente lavorati in laboratorio prima dei campioni di riferimento al fine di evitare qualsiasi possibilità di contaminazione della prova con DNA già amplificato.*

Nel caso in esame si ricorda che il reperto 36 è stato inserito, per le analisi, in un contesto ove erano già stati esaminati 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 (Verbale udienza Corte d'Assise del 23.05.09, pag. 29-30) "Allora il coltello è stato analizzato praticamente come reperto nel corso di queste 50 campionature attribuite alla vittima, alcune sono antecedenti all'analisi del coltello naturalmente, ed altre successive, quindi di queste 50 sono state....non so il coltello si colloca, ora non lo so, ad un quarto, ad un terzo di questo flusso di analisi, e comunque in ogni caso anche se fosse stato analizzato il coltello alla fine di tutte queste 50, 60 quelle che sono tracce, in ogni caso questo non pregiudica la bontà del dato, perché ogni traccia viene analizzata in maniera singola, è assolutamente impossibile mescolare una traccia con un'altra, anche perché il fascicolo Kercher è uno dei tanti fascicoli che noi trattiamo in laboratorio e che abbiamo trattato in contemporanea, non è che tutto il servizio di Polizia Scientifica si è fermato ed ha trattato il fascicolo Kercher...").

Applicazione delle
tecniche di PCR
per aumentare la
sensibilità di
analisi

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

dr.ssa GINO
dr.ssa STEFANONI

Va fatto rilevare dalla Comunità Scientifica Internazionale che, anche qualora vengano scrupolosamente applicati i protocolli di carattere generale sopra indicati,

l'aumento della sensibilità della metodica PCR (ottenuta apportando modifiche ai protocolli standard di amplificazione, l'aumento dei cicli di PCR, il raddoppio del tempo di annealing, l'aumento del tempo di iniezione) rappresenta in ogni caso un maggior potenziale di contaminazione pertanto "il trasferimento secondario non può essere escluso come possibile spiegazione per i risultati di tipizzazione LCN ottenuti"
(Bodmer et al., 2000)

**perizia pag. 101 + 102
(ingrandimento)**

**Lo stesso concetto è riportato anche
alle pagg. 94 + 95 della perizia**

DOMANDA - Quindi che tipo di precauzioni ha utilizzato nell'amplificazione di questo D.N.A. nel senso ha aumentato il numero dei cicli?
RISPOSTA - No, sempre 28 cicli perché nella mia molto rischioso, ho amplificato varie volte i campioni quando c'era la possibilità di avere un estratto da potere dividere in due, la prima volta magari con 28 cicli e poi ho aumentato a 30 o 32 e praticamente ho visto che si alzavano molto dei picchi assolutamente, diciamo, insomma non... come dire... su cui non ci si poteva affidare come risultato per cui preferisco amplificare e vedere il risultato a 28 cicli.

DOMANDA - Qual è la quantità espressa in micro litri di D.N.A. che lei ha estratto?

RISPOSTA - Il totale quindi cioè venti micro litri.

DOMANDA - Quindi venti micro litri in un volume finale di quanto?

RISPOSTA - Cioè dieci micro litro in un volume finale di venti perché il kit dell'identity faider può amplificare in venti per cui io ho ulteriormente concentrato e utilizzato tutto l'estratto.

DOMANDA - Ah, quindi cioè noi siamo partiti da un eluito, diciamo, come estratto di 50...

RISPOSTA - Di 50 e l'ho portato a 10 finali.

DOMANDA - No, prima mi ha detto che erano 20, 22?

RISPOSTA - Sì, prima della quantificazione, poi essendo così bassa la quantità di D.N.A. ho preferito utilizzare tutto.

DOMANDA - Ma se si trattava di (inc.) molto probabilmente non sarebbe stato molto più utile seguendo le linee guida effettuare due diverse amplificazioni piuttosto che averne una sola di cui peraltro non ci si può fidare più di tanto visto che non è stata ripetibile?

RISPOSTA - È stata ripetibile l'elettroforesi come ho già detto prima anche se ha un esponente diverso.

trascrizione pag.179 GUP

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto
36 (coltello) e relative conclusioni dei periti
Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione
della lama del reperto

CONCLUSIONE

perché parlarne diffusamente, in diverse pagine della
perizia se ho affermato di **non** aver innalzato il
numero di cicli per aumentare la sensibilità della PCR?

Quindi il problema “*contaminazione da aumento di
sensibilità*” della metodica di analisi è un **FALSO
PROBLEMA** poiché *mai applicata tale strategia di analisi*

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

L'aumento della sensibilità della metodica PCR (ottenuta apportando modifiche ai protocolli standard di amplificazione, l'aumento dei cicli di PCR, il raddoppio del tempo di annealing, l'aumento del tempo di iniezione) rappresenta in ogni caso un maggior potenziale di contaminazione pertanto "il trasferimento secondario non può essere escluso come possibile spiegazione per i risultati di tipizzazione LCN ottenuti" (Budowle et al., 2009).

Si fa, inoltre, presente che vi è la possibilità che il prodotto di PCR di un LCN possa evidenziare risultati che provengono da un DNA amplificato che contamina un campione non ancora amplificato e ciò in quanto, come precedentemente riportato, poiché il DNA amplificato è molto più concentrato del DNA templato non amplificato, il primo sarà copiato in maniera preferenziale durante la PCR

Per questo motivo i campioni in esame debbono essere usualmente lavorati in laboratorio prima dei campioni di riferimento al fine di evitare qualsiasi possibilità di contaminazione della prova con DNA già amplificato.

Nel caso in esame si ricorda che il reperto 36 è stato inserito, per le analisi, in un contesto ove erano già stati esaminati 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 (Verbale udienza Corte d'Assise del 23.05.09, pag. 29-30) "Allora il

coltello è stato analizzato praticamente come reperto nel corso di queste 50 campionature attribuite alla vittima, alcune sono antecedenti all'analisi del coltello naturalmente, ed altre successive, quindi di queste 50 sono state... non so il coltello si colloca, ora non lo so, ad un quarto, ad un terzo di questo flusso di analisi, e comunque in ogni caso anche se fosse stato analizzato il coltello alla fine di tutte queste 50, 60 quelle che sono tracce, in ogni caso questo non pregiudica la bontà del dato, perché ogni traccia viene analizzata in maniera singola, è assolutamente impossibile mescolare una traccia con un'altra, anche perché il fascicolo Kercher è uno dei tanti fascicoli che noi trattiamo in laboratorio e che abbiamo trattato in contemporanea, non è che tutto il servizio di Polizia Scientifica si è fermato ed ha trattato il fascicolo Kercher...").

perizia pag.102

**Non si può definire come
"campione di riferimento" il
DNA presente nelle tracce
provenienti dalla scena del
crimine, anche se
appartenenti in gran numero
alla vittima, perchè a priori
non si conosce il risultato in
termini di "profilo genetico"
di ciò che si analizza...**

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

Definizione di “campione di riferimento”

Dna prelevato ad un individuo noto allo scopo di confrontarlo con i profili genetici sconosciuti ricavati dal Dna estratto dalle tracce repertate sulla scena del crimine, per stabilire una attribuzione, una esclusione o una compatibilità tra il Dna dell'individuo noto e quello sconosciuto riferibile alle tracce

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

l'aumento della sensibilità della metodica PCR (ottenuta apportando modifiche ai protocolli standard di amplificazione, l'aumento dei cicli di PCR, il raddoppio del tempo di annealing, l'aumento del tempo di iniezione) rappresenta in ogni caso un maggior potenziale di contaminazione pertanto "il trasferimento secondario non può essere escluso come possibile spiegazione per i risultati di tipizzazione LCN ottenuti" (Budowle et al., 2009).

Si fa, inoltre, presente che vi è la possibilità che il prodotto di PCR di un LCN possa evidenziare risultati che provengono da un DNA amplificato che contamina un campione non ancora amplificato e ciò in quanto, come precedentemente riportato, poiché il DNA amplificato è molto più concentrato del DNA templato non amplificato, il primo sarà copiato in maniera preferenziale durante la PCR

Per questo motivo i campioni in esame debbono essere usualmente lavorati in laboratorio prima dei campioni di riferimento al fine di evitare qualsiasi possibilità di contaminazione della prova con DNA già amplificato.

Nel caso in esame si ricorda che il reperto 36 è stato inserito, per le analisi, in un contesto ove erano già stati esaminati 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 (Verbale udienza Corte d'Assise del 23.05.09, pag. 29-30) "Allora il coltello è stato analizzato praticamente come reperto nel corso di queste 50 campionature attribuite alla vittima, alcune sono antecedenti all'analisi del coltello naturalmente, ed altre successive, quindi di queste 50 sono state... non so il coltello si colloca, ora non lo so, ad un quarto, ad un terzo di questo flusso di analisi, e comunque in ogni caso anche se fosse stato analizzato il coltello alla fine di tutte queste 50, 60 quelle che sono tracce, in ogni caso questo non pregiudica la bontà del dato, perché ogni traccia viene analizzata in maniera singola, è assolutamente impossibile mescolare una traccia con un'altra, anche perché il fascicolo Kercher è uno dei tanti fascicoli che noi trattiamo in laboratorio e che abbiamo trattato in contemporanea, non è che tutto il servizio di Polizia Scientifica si è fermato ed ha trattato il fascicolo Kercher...").

perizia pag.102

Affermazione ERRATA
Il coltello Rep.36 è stato analizzato ben 6 giorni dopo l'analisi dell'ultima traccia con DNA della vittima ed inoltre in un "contesto" ove erano presenti SOLO reperti attribuibili a Sollecito

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

SAL Reperto 27: bicchiere in vetro accanto al letto della vittima

Stato Avanzamento Lavori (SAL)															
Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto													
28669-01-027	1	Bicchiere in vetro comodino accanto al letto della vittima (Rep.20) app.sup.													
Elenco Tracce															
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia						Quantità Estrattc	Ubicazione Estratto					
28669-01-027-01	200047224	PRESUNTA SALIVA	presunta saliva						50	260/L3					
<small>AMILASI TIPOLOGIA REATTIVO 1 PH / EXP DATE</small>															
Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Kit	Data 2^	Kit	Data 3^	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run	
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strume	
06-11-07												/	/	/	
Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto													
28669-01-028	2	Nr.2 campionature di presunta S.E. interruttore salone semi-interrato (Rep.10/A-B)													
Elenco Tracce															
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia						Quantità Estrattc	Ubicazione Estratto					
28669-01-028-01	200047225	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	presunta sostanza ematica lett.A						50	260/L4					
<small>TETRAMETILBENZIDINA LUMINOL CROMATOGRAFIA GEL SILIC IMMUNOELETTROSINERESI METODICHE IMMUNOLOGICHE SPECIE ANIMALE</small> <small>POSITIVO</small>															
Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Kit	Data 2^	Kit	Data 3^	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run	
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strume	
06-11-07												/	/	/	
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia						Quantità Estrattc	Ubicazione Estratto					
28669-01-028-02	200047226	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	presunta sostanza ematica lett.B						50	260/L5					
<small>TETRAMETILBENZIDINA LUMINOL CROMATOGRAFIA GEL SILIC IMMUNOELETTROSINERESI METODICHE IMMUNOLOGICHE SPECIE ANIMALE</small> <small>POSITIVO</small>															
Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Kit	Data 2^	Kit	Data 3^	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run	
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strume	

SAL relativo
all'ultima traccia
lavorata
contenente DNA
riferibile alla
vittima

Data analisi
06/11/2007

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

**Es. di reperto analizzato
negli stessi giorni del Rep.36**

Stato Avanzamento Lavori (SAL)															
Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto													
28669-01-032	14	NR.1 PAIO DI SCARPE MARCA "NIKE"													
Elenco Tracce															
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia								Quantità Estrattc	Ubicazione Estratto			
28669-01-032-01	200047311	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	presunta sostanza ematica lett. A								50	261/H2			
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u> <u>LUMINOL</u> <u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u> <u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u> <u>SPECIE ANIMALE</u> NEGATIVO															
Data 1^ Estraz. 13-11-07	Data 2^ Estraz.	Data 3^ Estraz.	Data 1^ Quantif.	Data 2^ Quantif.	Data 3^ Quantif.	Data 1^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^ Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run Strume	
Codice Traccia Codice Sample ID Tipo di Traccia Descrizione Traccia Quantità Estrattc Ubicazione Estratto 28669-01-032-02 200047312 PRESUNTA TRACCIA EMATICA presunta sostanza ematica lett B 50 261/H3															
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u> <u>LUMINOL</u> <u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u> <u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u> <u>SPECIE ANIMALE</u> NEGATIVO															
Data 1^ Estraz. 13-11-07	Data 2^ Estraz.	Data 3^ Estraz.	Data 1^ Quantif.	Data 2^ Quantif.	Data 3^ Quantif.	Data 1^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^ Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run Strume	
Codice Traccia Codice Sample ID Tipo di Traccia Descrizione Traccia Quantità Estrattc Ubicazione Estratto 28669-01-032-03 200047313 PRESUNTA TRACCIA EMATICA presunta sostanza ematica lett C 50 261/H4															
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u> <u>LUMINOL</u> <u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u> <u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u> <u>SPECIE ANIMALE</u> NEGATIVO															
Data 1^ Estraz. 13-11-07	Data 2^ Estraz.	Data 3^ Estraz.	Data 1^ Quantif.	Data 2^ Quantif.	Data 3^ Quantif.	Data 1^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^ Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run Strume	

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

Es. di reperto analizzato negli stessi giorni del Rep.36

Stato Avanzamento Lavori (SAL)														
Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto												
28669-01-032	14	NR.1 PAIO DI SCARPE MARCA "NIKE"												
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia					Quantità Estrattc 50		Ubicazione Estratto 261/H5				
28669-01-032-04	200047314	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	presunta sostanza ematica lett D											
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u>	<u>LUMINOL</u>	<u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u>	<u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u>					<u>SPECIE ANIMALE</u>						
NEGATIVO														
Data 1^ Estraz.	Data 2^ Estraz.	Data 3^ Estraz.	Data 1^ Quantif.	Data 2^ Quantif.	Data 3^ Quantif.	Data 1^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^ Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run Strume
13-11-07												/	/	/
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia					Quantità Estrattc 50		Ubicazione Estratto 261/H6				
28669-01-032-05	200047315	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	presunta sostanza ematica lett E											
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u>	<u>LUMINOL</u>	<u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u>	<u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u>					<u>SPECIE ANIMALE</u>						
NEGATIVO														
Data 1^ Estraz.	Data 2^ Estraz.	Data 3^ Estraz.	Data 1^ Quantif.	Data 2^ Quantif.	Data 3^ Quantif.	Data 1^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^ Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run Strume
13-11-07												/	/	/
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia					Quantità Estrattc 50		Ubicazione Estratto 261/H7				
28669-01-032-06	200047316	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	presunta sostanza ematica lett F											
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u>	<u>LUMINOL</u>	<u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u>	<u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u>					<u>SPECIE ANIMALE</u>						
NEGATIVO														
Data 1^ Estraz.	Data 2^ Estraz.	Data 3^ Estraz.	Data 1^ Quantif.	Data 2^ Quantif.	Data 3^ Quantif.	Data 1^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^ Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^ Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run Strume
13-11-07												/	/	/

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione della lama del reperto

Es. di reperto analizzato
negli stessi giorni del Rep.36

Stato Avanzamento Lavori (SAL)														
Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto												
28669-01-032	14	NR.1 PAIO DI SCARPE MARCA "NIKE"												
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia		Descrizione Traccia		Quantità Estrattc		Ubicazione Estratto						
28669-01-032-07	200047317	PRESUNTA TRACCIA EMATICA		presunta sostanza ematica lett G		50		261/H8						
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u> <u>LUMINOL</u> <u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u> <u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u> <u>SPECIE ANIMALE</u> NEGATIVO														
Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Kit	Data 2^	Kit	Data 3^	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strume
13-11-07												/	/	/
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia		Descrizione Traccia		Quantità Estrattc		Ubicazione Estratto						
28669-01-032-08	200047318	PRESUNTA TRACCIA EMATICA		presunta sostanza ematica lett H		50		261/H9						
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u> <u>LUMINOL</u> <u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u> <u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u> <u>SPECIE ANIMALE</u> NEGATIVO														
Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Kit	Data 2^	Kit	Data 3^	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strume
13-11-07												/	/	/
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia		Descrizione Traccia		Quantità Estrattc		Ubicazione Estratto						
28669-01-032-09	200048641	PRESUNTA TRACCIA EMATICA		presunta sostanza ematica lett. I (sx)		50		269L4						
<u>TETRAMETILBENZIDINA</u> <u>LUMINOL</u> <u>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</u> <u>IMMUNOELETTROSINERESI</u> <u>METODICHE IMMUNOLOGICH</u> <u>SPECIE ANIMALE</u> NEGATIVO														
Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Data 2^	Data 3^	Data 1^	Kit	Data 2^	Kit	Data 3^	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strume
17-12-07												/	/	/

**Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto
36 (coltello) e relative conclusioni dei periti
Ipotesi, formulata dai periti, di contaminazione
della lama del reperto**

*Reperti analizzati negli stessi giorni del Rep.36
(tot. 18 tracce)*

- a) Rep.32 –Scarpe“NIKE”(prime 8 campionature)
- b) Rep.33 –Coltello a serramanico marca “CRKT”
- c) Rep.34 –Un paio di boxer elasticizzati da uomo
- d) Rep.35 –Coltello a serramanico lungo 18 cm.

**Tutti oggetti acquisiti a casa di Sollecito
Raffaele in seguito a perquisizione della
Squadra Mobile di Perugia.**

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti Risultati genetici inerenti le prime tre tracce analizzate contemporaneamente (12/11/2007) *sul coltello* (Rep.36)

*Verbale I.O. del 12/11/2007 in
particolare II° pag. con reperti
analizzati nella stessa sessione
di lavoro alla presenza del C.T.
di parte della difesa Sollecito
(dal Rep.32 al Rep.57)*

Ministero dell'Interno
DIPARTIMENTO DELLA PUBBLICA SICUREZZA
DIREZIONE CENTRALE ANTICRIMINE
DELLA POLIZIA DI STATO
SERVIZIO POLIZIA SCIENTIFICA
DIVISIONE III
Sezione Indagini di Genetica Forense

novembre

Si precisa che i reperti catalogati e sottoposti ad analisi sono stati indicati dal numero 32 al numero progressivo 57, che tutti i plichi risultavano perfettamente sigillati e contrassegnati, e che solo successivamente al termine degli accertamenti sui predetti reperti seguita la catalogazione e le analisi sui restanti reperti previa comunicazione alle parti.

Si dà atto che alle ore 11.20 l'Avv. Carlo Pacelli si allontanava non sollevando alcuna osservazione.

Si dà atto che alle ore 13.15 il Prof. Vincenzo Pascali si allontanava non sollevando alcuna osservazione.

Si dà atto che alle ore 13.25 l'Avv. Giancarlo Costa si allontanava non sollevando alcuna osservazione.

Si dà atto che alle ore 14.15 l'Avv. Luca Maori e la Dr.ssa Valentina Benigni si allontanavano non sollevando alcuna osservazione.

Si dà atto che alla presenza del Consulente Tecnico di Parte dott. Saverio POTENZA sono stati effettuate le campionature e le diagnosi generico/specifica sui reperti contrassegnati dai numeri 32, 33, 34, 35 e 36 e su esplicita richiesta, vengono inserite le seguenti dichiarazioni: "nulla da dichiarare".

Il presente verbale, chiuso alle ore 20.15 viene dalla scrivente e dal CTP presente dott. Saverio POTENZA, letto, confermato e sottoscritto in data e luogo di cui sopra, e redatto in nr.3 copie.

DTP dott.ssa Patrizia STEFANONI
CTP dott. Saverio POTENZA

Sede: via Tuscolana 1548 - 00173 Roma
1

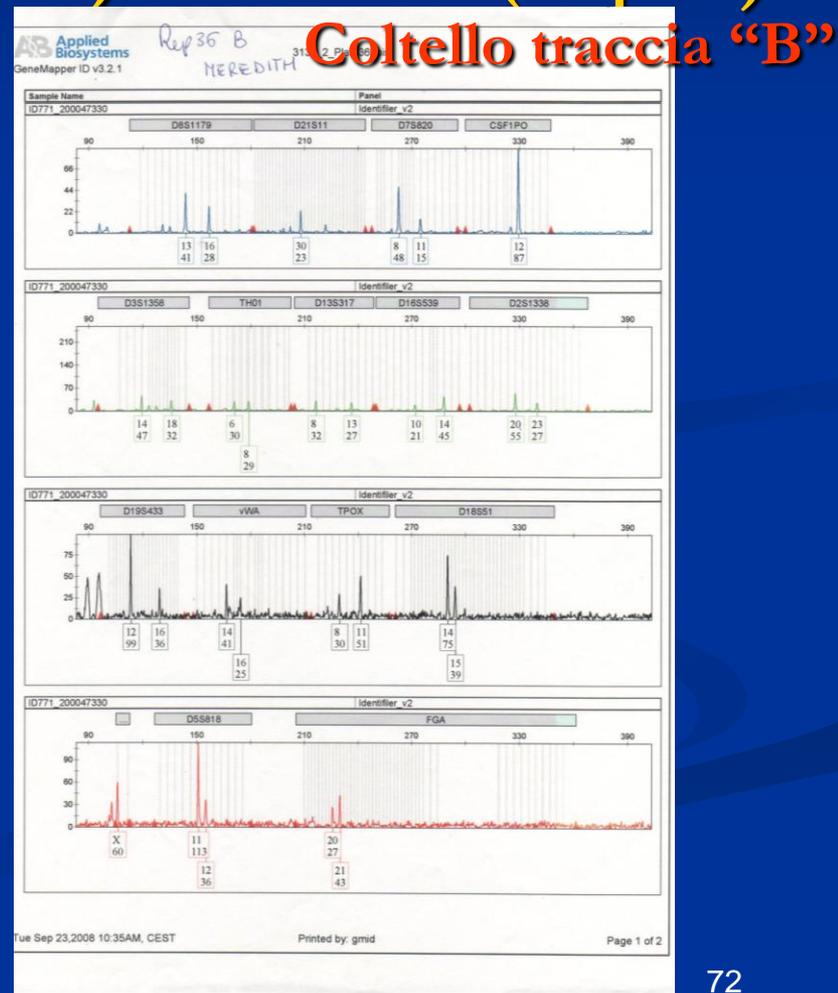
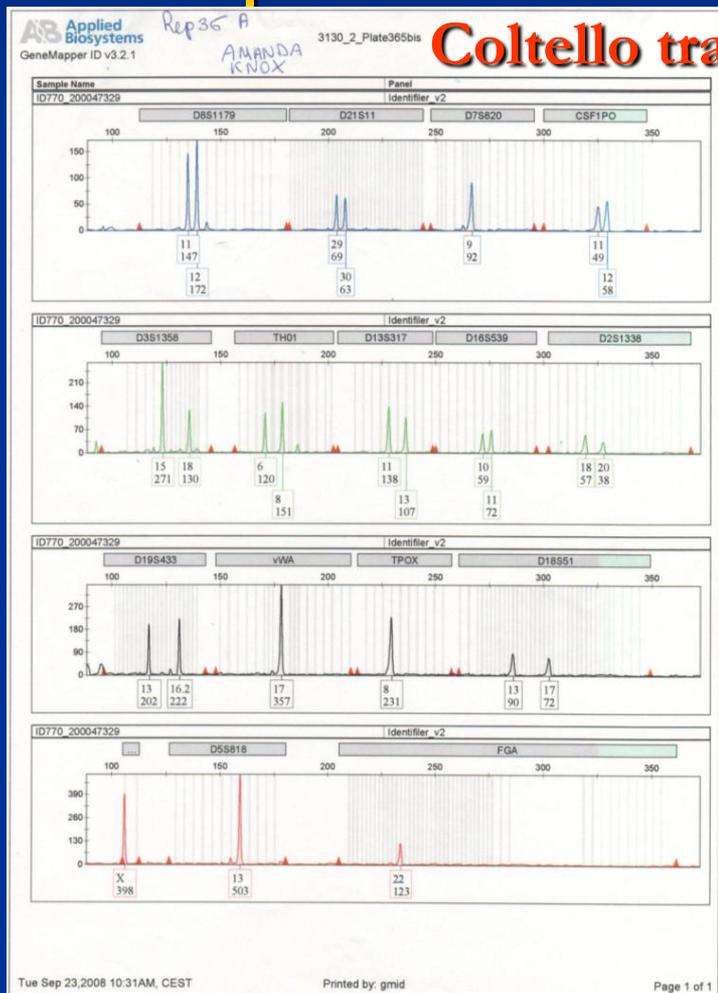
sollevando alcuna osservazione.

Si dà atto che alla presenza del Consulente Tecnico di Parte dott. Saverio POTENZA sono stati effettuate le campionature e le diagnosi generico/specifica sui reperti contrassegnati dai numeri 32, 33, 34, 35 e 36 e su esplicita richiesta, vengono inserite le seguenti dichiarazioni: "nulla da dichiarare".

Il presente verbale, chiuso alle ore 20.15 viene dalla scrivente e dal CTP presente dott. Saverio POTENZA, letto, confermato e sottoscritto in data e luogo di cui sopra, e redatto in nr.3 copie.

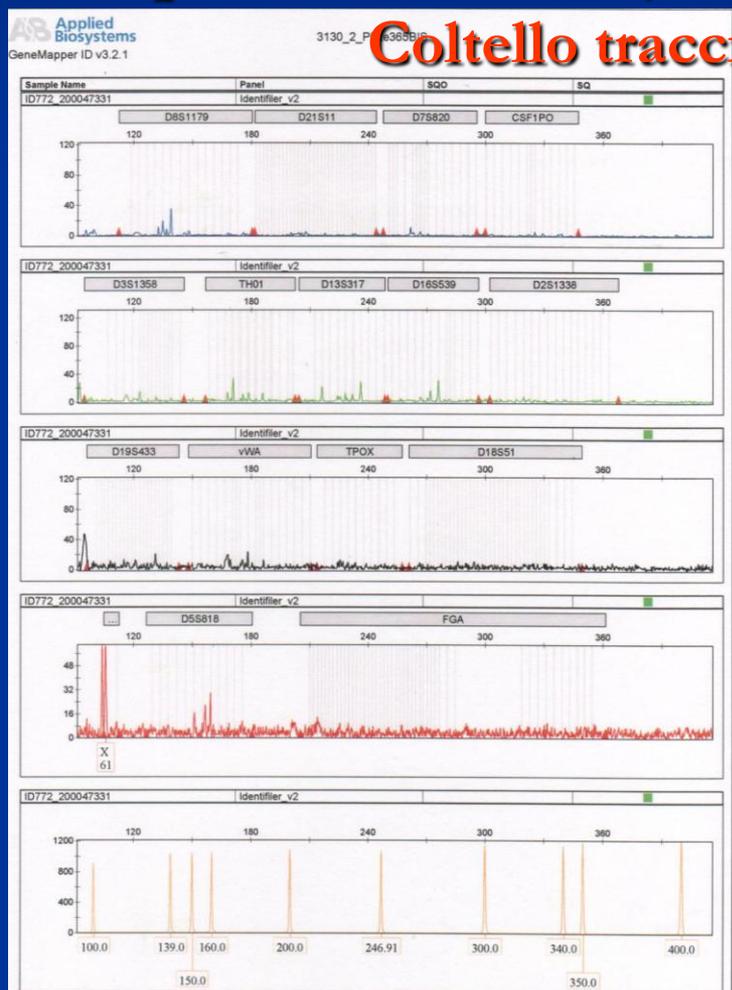
Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Risultati genetici inerenti le prime tre tracce analizzate contemporaneamente (12/11/2007) *sul coltello* (Rep.36)



Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

Risultati genetici inerenti le prime tre tracce analizzate contemporaneamente (12/11/2007) *sul coltello* (Rep.36)



Conclusione: alla luce di tutta la fase procedurale delle operazioni analitiche effettuate sul reperto **non c'è evidenza** di una possibile fonte di contaminazione da DNA della vittima sulla traccia "B".

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti elettroferogramma Rep.36/A perizia pag.67



In merito alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla **campionatura A**, da tutti gli elettroferogrammi si rileva che: a) sono presenti picchi che superano la soglia di 50 RFU (si sottolinea che 50 RFU è la soglia raccomandata dal manuale del kit e al di sotto della quale non è consigliato scendere) b) gli alleli sono bilanciati in quanto il rapporto tra i picchi è >0.60 Gill, P et al., 2006), in accordo con il presumibile quantitativo di DNA utilizzato per la reazione (0.8 ng).

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

Locus	Campionatura A	
	Altezza picchi	Bilanciamento degli eterozigoti $Hb = p_1/p_2$
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	-

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

CONCLUSIONI

1. Sulla lama del coltello (Rep.36) è stato rinvenuto il DNA della vittima (traccia “B”).
2. Tale profilo genetico, pur se in basse quantità è chiaramente ascrivibile a Meredith Kercher.
3. La quantificazione è stata effettuata con il fluorimetro che essendo uno strumento a bassa sensibilità, non ha misurato un valore numerico (ma ha dato una stima, *too low*) nell'aliquota di estratto utilizzata per questa analisi (1 μ l).

Valutazione delle analisi effettuate sul Reperto 36 (coltello) e relative conclusioni dei periti

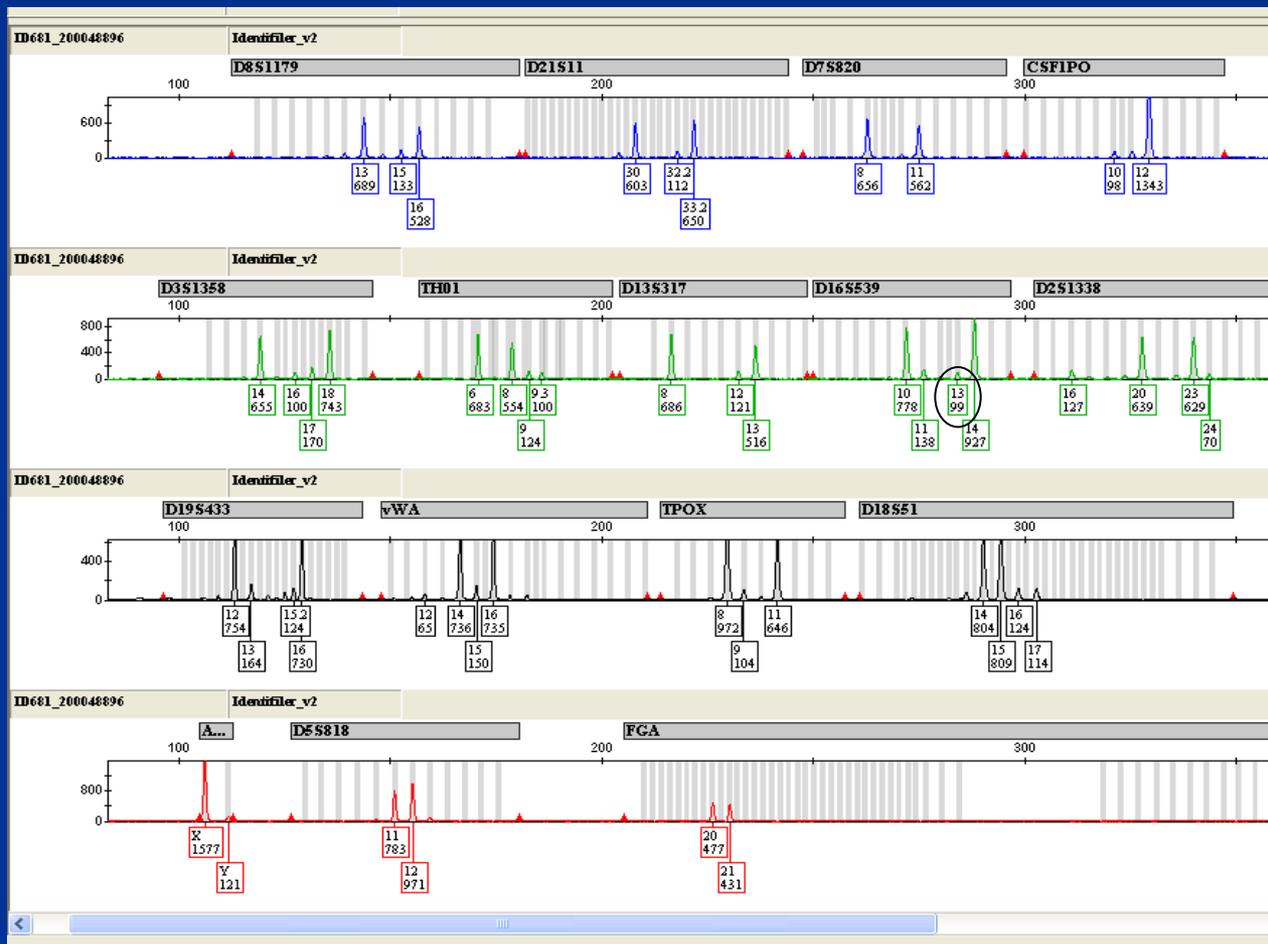
CONCLUSIONI

4. Tuttavia, non è corretto dedurre che tutto l'estratto non contenesse DNA (circa 22 μ l), dal momento che ne è stato tratto un profilo genetico completo.
5. Non c'è evidenza di una contaminazione di DNA esogeno, né riguardo al DNA della vittima né del DNA di qualsiasi altra persona, avendo ottenuto su un totale di 7 campionature solo 2 profili genetici completi diversi tra loro (Amanda KNOX – traccia A e Meredith KERCHER – traccia B)

**Valutazione delle analisi effettuate sulla
traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e
relative conclusioni dei periti**

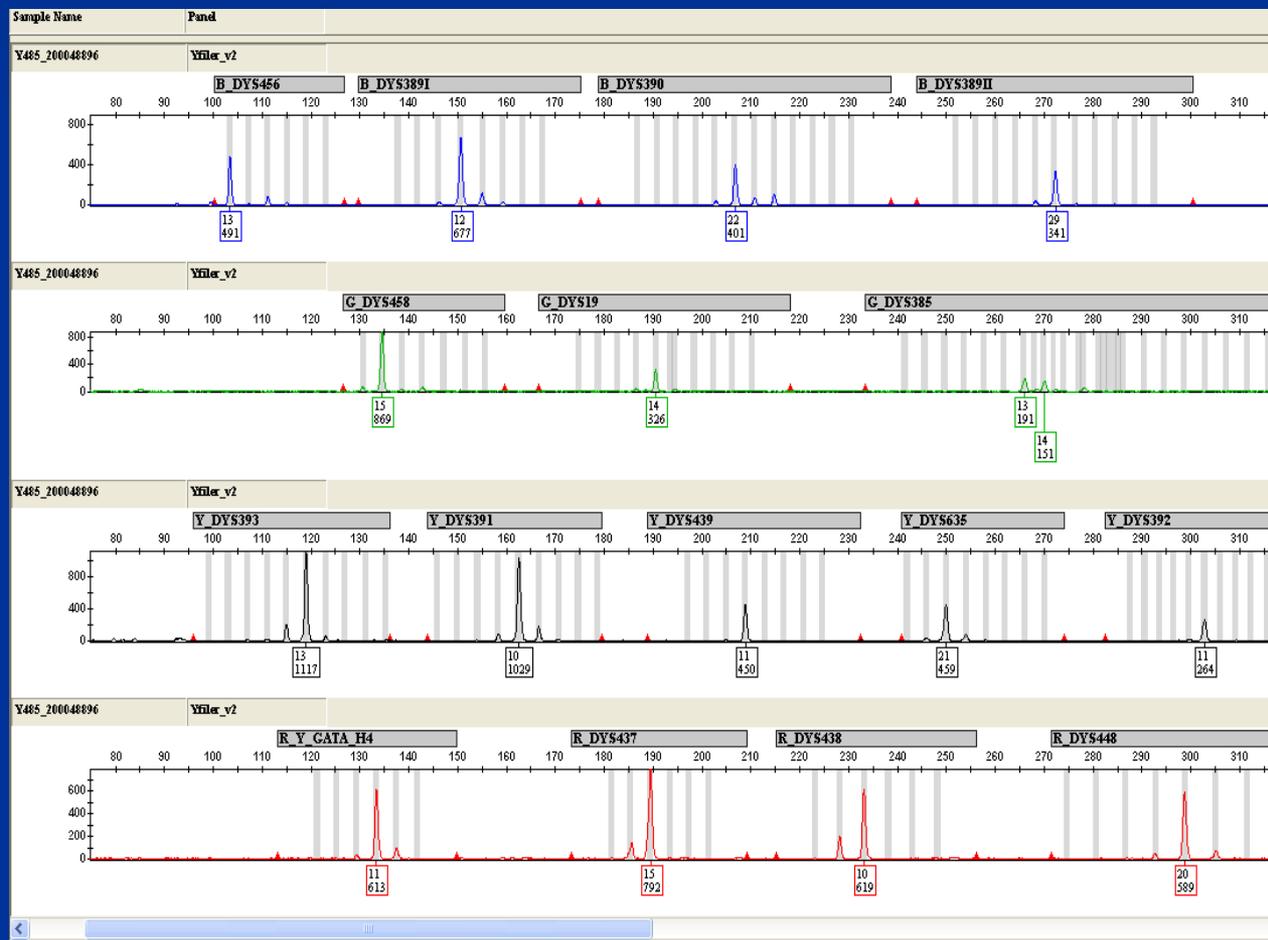
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

mistura Meredith Kercher + Sollecito Raffaele



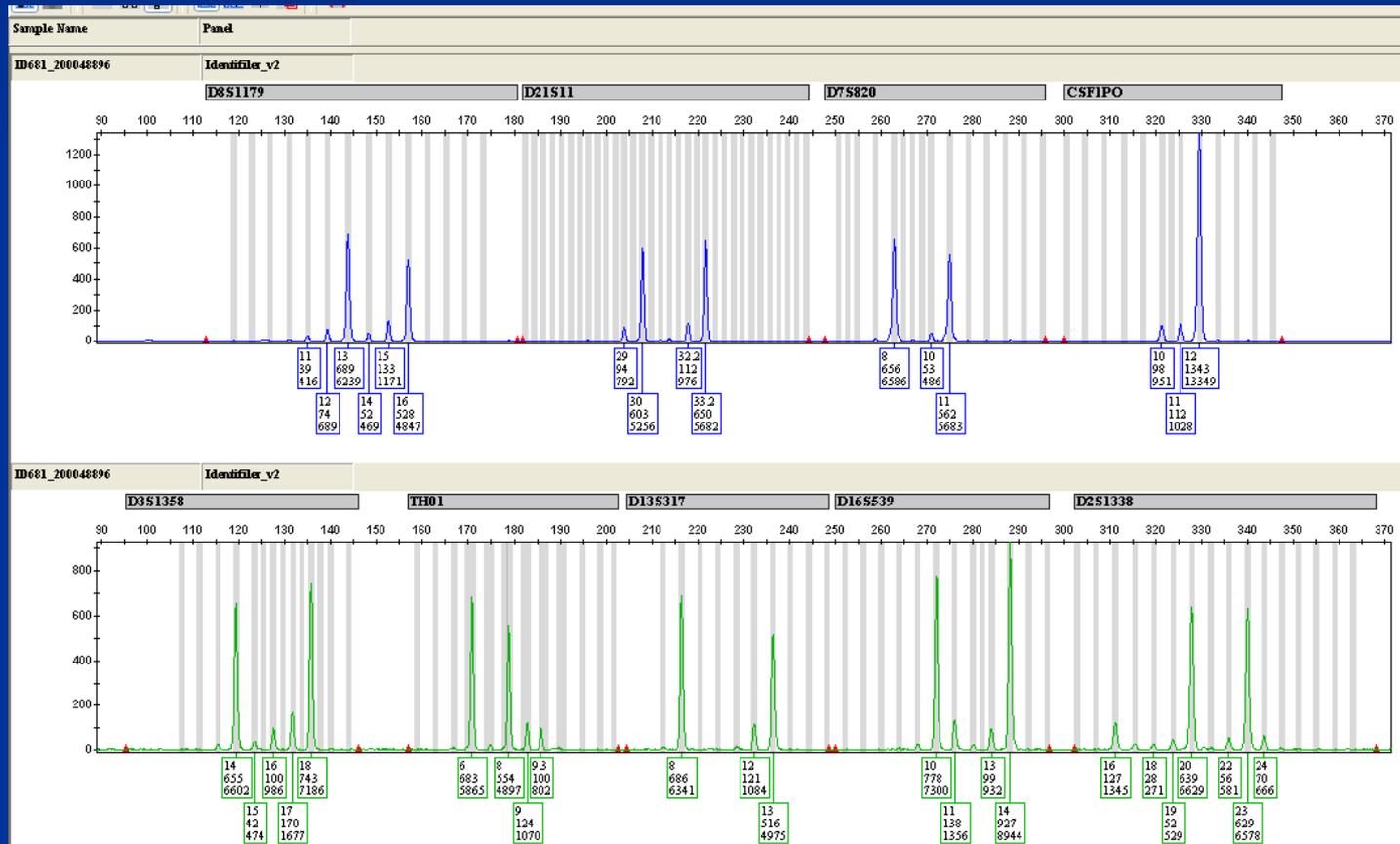
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

aplotipo Y uguale a quello appartenente a Sollecito Raffaele



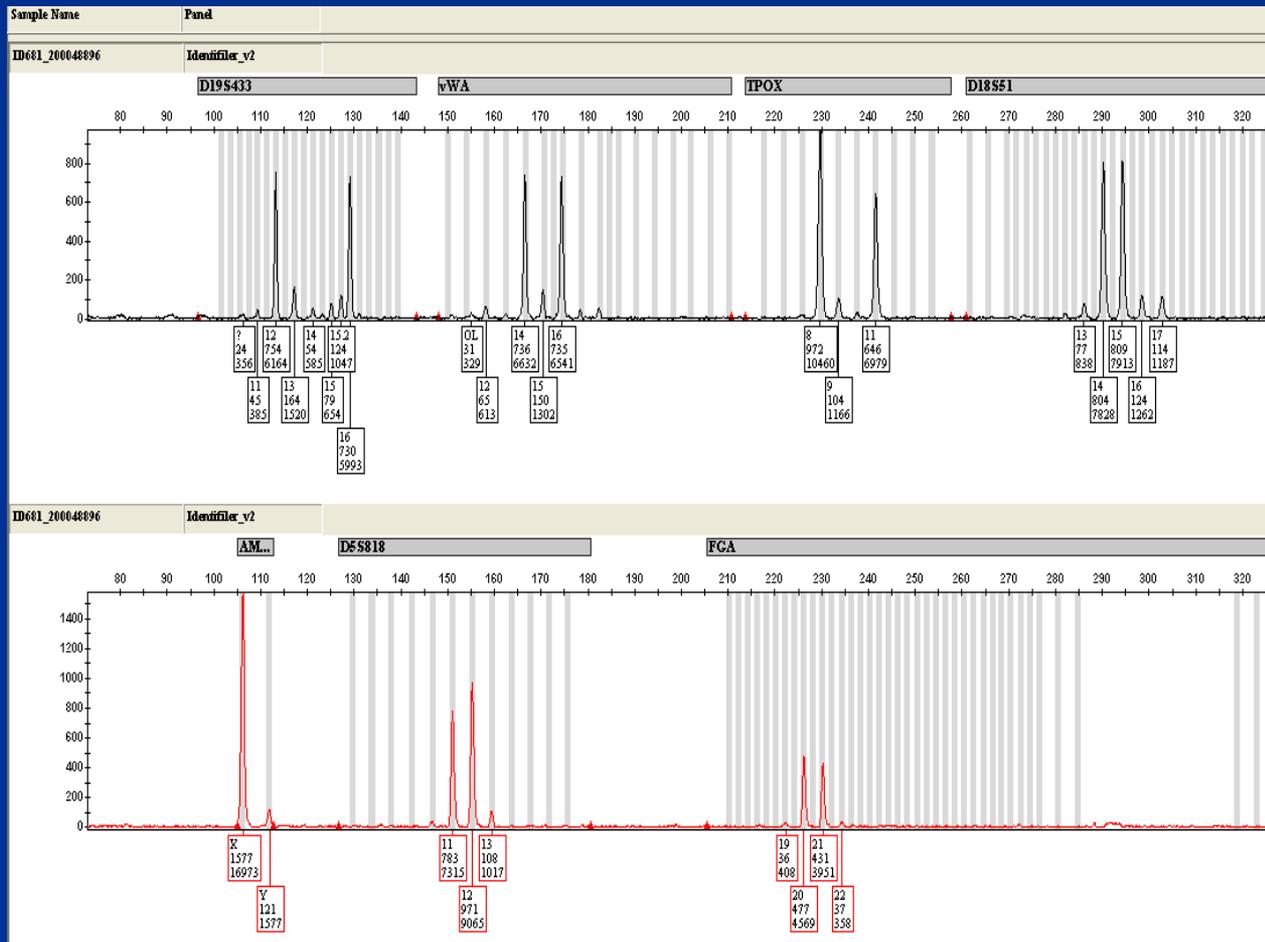
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

“versione” richiesta dai periti *senza valore-soglia*



Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

“versione” richiesta dai periti *senza* valore-soglia



Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

D.: Prof. Pascali

“Ci sono molti picchi cui non corrispondono né un nome né un numero di RFU.....”

Va rilevato che l'interpretazione degli alleli, così come riportato nel rapporto di consulenza tecnica, fu contestata dal CT Prof. Pascali nel corso dell'udienza GUP, in data 04.10.2008.

La contestazione riguardava la mancata interpretazione di alcuni picchi ritenuti alleli dal Prof Pascali e ritenuti stutter dalla Dr.ssa Stefanoni.

In particolare, a pag. 100 della trascrizione dell'interrogatorio, si legge quanto segue:

Domanda (Prof. Pascali) *“Ci sono molti picchi cui non corrispondono né un nome né un numero di R.S.U. siete in grado di darci il lot files con cui possiamo fare questa interpretazione?”*

Risposta (Dr.ssa Stefanoni) (pag. 100-101) *“Allora l'altezza che come giustamente dice lei anzi l'indicazione per meglio dire, come giustamente mi fa osservare, non è riportata per alcuni picchi che compaiono in questo elettroferogramma, è corretto ovviamente cioè lo vediamo che non ci sono, ma è per una semplice ragione perché avendo io interpretato questo misto ovviamente ho io assunto come mia responsabilità considerare questi alleli per così dire questi picchi non significativi perché dal mio punto di vista sono degli starter, sono degli artifici assolutamente descritti e misurati, quantificati sia in letteratura che nel kit che utilizzo”.*

A domanda del Giudice (pag. 101) *“Allora chiariamoci cosa intende lei per starter”.*

La CT (pag. 101) afferma *“... le starter sono degli extra picchi per così dire che si manifestano con una certa frequenza a seconda del punto genetico che andiamo ad analizzare nel momento in cui la P.C.R. ha corso...”.*

Più avanti (pag. 102) precisa *“(omissis) Nel fare questo errore ovviamente crea degli artifici che però hanno una caratteristica ben precisa sono sopra di un certo numero di unità che in questo caso è sempre quattro perché le unità che si ripetono sono quattro in questi picchi, è sempre di una unità più piccola del picco principale quindi noi sappiamo vedendo il picco principale e vedendo la proporzione che questo picco extra ha rispetto al picco principale noi possiamo affermare che questo picchetto, diciamo è un'aggiunta errata dovuta a questo insito meccanismo di errore operato dalla TAC”.*

perizia pag.114

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

semplicemente perché a me era stata fatta richiesta specifica di fornire l'altezza in R.S.U. quindi mi sembrava ridondante scrivere altezza in R.S.U., solo questo.

GIUDICE - Però la domanda è: esprime quindi l'altezza o le aree?

RISPOSTA - Solo altezze.

DOMANDA - Benissimo! Quindi le aree voi non ce l'avete ancora comunicate?

RISPOSTA - No, non le abbiamo ancora date perché non ci sono mai state chieste.

DOMANDA - No, no, non ci sono questioni! Un'altra domanda è: nella pagina 7597 io noto, e questo sarà oggetto di discussione nella terza parte della mia serie di domande spero di non essere molto lungo e di non annoiare...

GIUDICE - Lei faccia le domande senza programmare!

DOMANDA - Ci sono molti picchi cui non corrisponde né un nome, né un numero di R.S.U. siete in grado di darci il lot files con cui noi possiamo fare questa interpretazione?

VOCE - Ma non è una domanda?

GIUDICE - La domanda è una domanda, adesso chiariamo che significato hanno questi grafici?

RISPOSTA - No, mi scusi ma sono due cose completamente diverse.

GIUDICE - Allora prego cominciamo!

RISPOSTA - Allora l'altezza che come giustamente dice lei anzi l'indicazione per meglio dire, come giustamente mi fa osservare, non è riportata per alcuni picchi che compaiono in questo elettroferogramma, è corretto ovviamente cioè lo vediamo che non ci sono, ma è per una semplice ragione perché avendo io interpretato questo misto ovviamente ho io assunto come mia responsabilità considerare questi alleli per così dire questi picchi non significativi perché dal mio punto di vista sono degli starter, sono degli artifici assolutamente

R.: Dr.ssa Stefanoni

*“...avendo io interpretato questo misto....ho io assunto come mia responsabilità considerare questi picchi degli **stutter**, sono degli artifici....*

trascrizione pag.100 GUP

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

“...sono stati considerati **stutter picchi** la cui altezza era **oltre 50 RFU (D19S433): picco 14 (54 RFU)**”

Come sono definite in perizia le stutter?

(Lo stesso concetto viene ripetuto anche a pag.141 della perizia)

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.**

In merito alla valutazione delle stutter si ribadisce che la CT pur avendo affermato che ci sono “...**comunque delle raccomandazioni per l'interpretazione corretta quindi sono delle linee guida...**” (GUP 04.10.2008, pag.102), in pratica non ha applicato correttamente le raccomandazioni esplicitate nelle linee guida della ISFG.

Infatti nel paragrafo 6 “**Treatment of stutter**” (“*DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures*”, *For Sci Int*, 2006) è riportata la seguente raccomandazione:

“**Recommendation 6:** *If the crime profile is a major/minor mixture, where minor alleles are the same size (height or area) as stutter of major alleles, then the stutters and minor alleles are indistinguishable. Under these circumstances alleles in stutter position that do not support H_p should be included in the assessment*”.

“**Raccomandazione 6:** Se il profilo criminale è una mistura maggiore/minore, laddove gli alleli minori sono della stessa misura (altezza o area) della stutter dell'allele maggiore, allora le stutters e gli alleli minori sono indistinguibili. In queste circostanze gli alleli in posizione stutter che non supportano la tesi dell'accusa dovrebbero essere inclusi nella valutazione”.

Tale raccomandazione risulta essere stata del tutto disattesa dalla CT laddove afferma “Allora l'altezza che come giustamente dice lei anzi l'indicazione per meglio dire, come giustamente mi fa osservare, non è riportata per alcuni picchi che compaiono in questo elettroferogramma, è corretto ovviamente cioè lo vediamo che non ci sono, ma è per una semplice ragione perché avendo io interpretato questo misto ovviamente ho io assunto come mia responsabilità considerare questi alleli per così dire questi picchi non significativi perché dal mio punto di vista sono degli starter,

perizia pag.123

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Giudice "Quindi lei la individua sulla base di caratteristiche che legge dal diagramma sostanzialmente?".

Stefanoni "Si esatto dall'altezza che non deve superare secondo degli standard internazionali, appunto, riportati in questo lavoro che citava il Professore che sono comunque delle raccomandazioni per l'interpretazione corretta quindi sono delle linee guida, dall'altezza e dalla percentuale che questa altezza ha rispetto al picco principale, questa altezza, questa percentuale non deve mai superare il quindici per cento perché altrimenti si rischia di sbagliare nell'attribuire come starter un picco del genere".

Concordiamo con la Dr.ssa Stefanoni circa la definizione di stutter e ribadiamo che 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.

In breve 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).

Le stutter hanno infatti la stessa lunghezza di un vero allele e, pertanto, può risultare difficile stabilire se un picco sia effettivamente un allele proveniente da un contribuente minoritario o una stutter.

Il comportamento delle stutter è stato ampiamente studiato per i loci STR contenuti nei kit commerciali. Le ripetizioni di- e tri-nucleotidiche hanno una maggiore propensione alla formazione di stutter rispetto alle ripetizioni tetra e penta nucleotidiche e questa è una delle ragioni per cui gli STRs utilizzati in ambito forense hanno ripetizioni tetra- e penta-nucleotidiche.

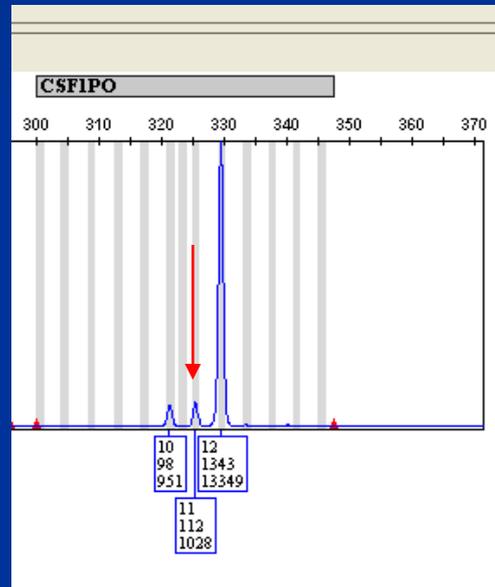
Inoltre tutti i loci mostrano la tendenza all'incremento della formazione di stutter per gli alleli a più alto peso molecolare.

La stutter viene identificata confrontando l'altezza del picco con quella dell'allele corrispondente. Questo rapporto, per i loci STRs utilizzati nelle indagini forensi, è generalmente inferiore al 15%.

perizia pag.115

115

Esempio di stutter



$$\frac{112}{1343} = 0,083 \times 100 = 8,3\%$$

Quindi la stutter ha un'altezza *relativa* al picco corrispondente, **NON assoluta**

La stutter viene identificata confrontando l'altezza del picco con quella dell'allele corrispondente. Questo rapporto, per i loci STRs utilizzati nelle indagini forensi, è generalmente inferiore al 15%.

Concetto ripetuto anche a pag.116

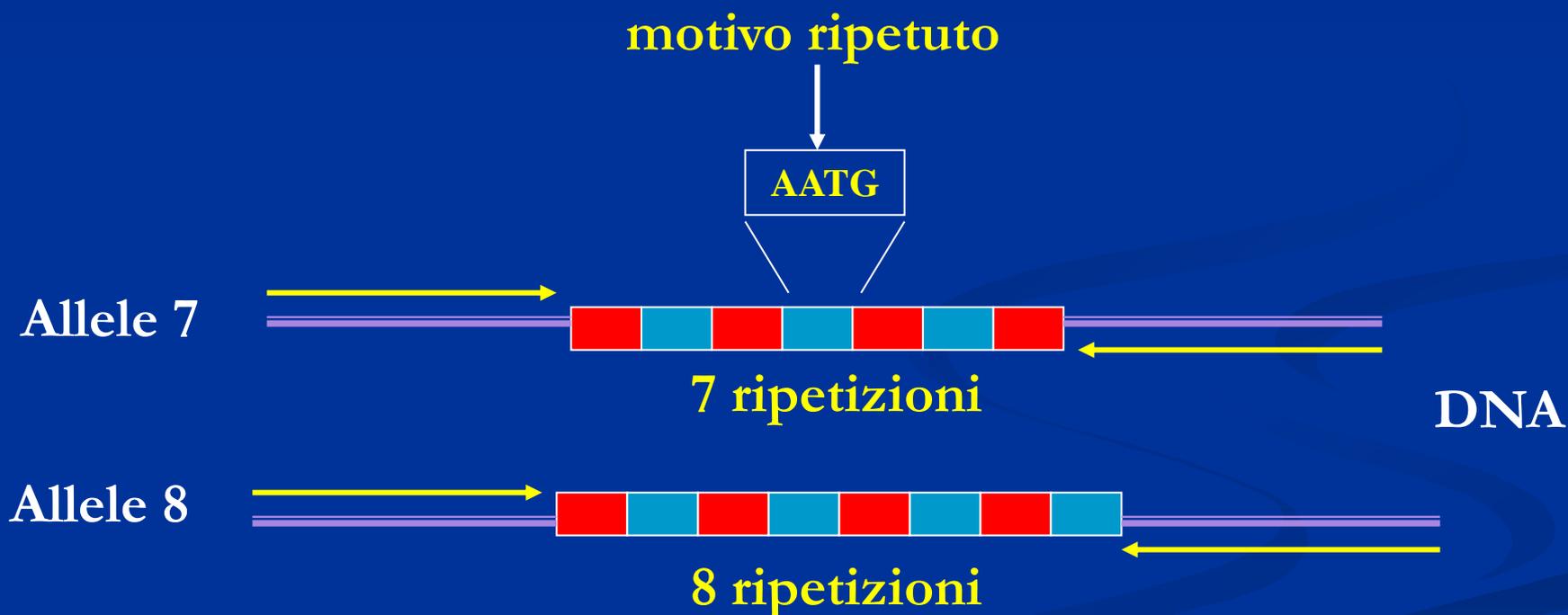
115

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

- Perché bisogna considerare la stutter come un artefatto e non un vero allele? Perché deriva da un errore che si verifica nel corso della PCR (cioè della *“fotocopiatura molecolare”* che avviene a livello del DNA che noi poi leggiamo come profilo genetico)

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

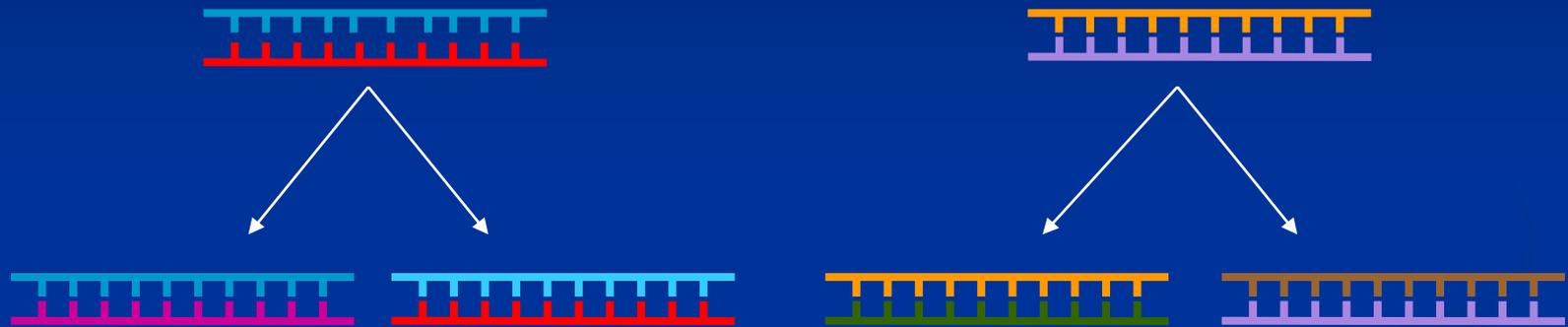
Meccanismo della PCR



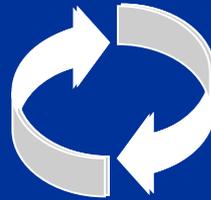
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Allele 7

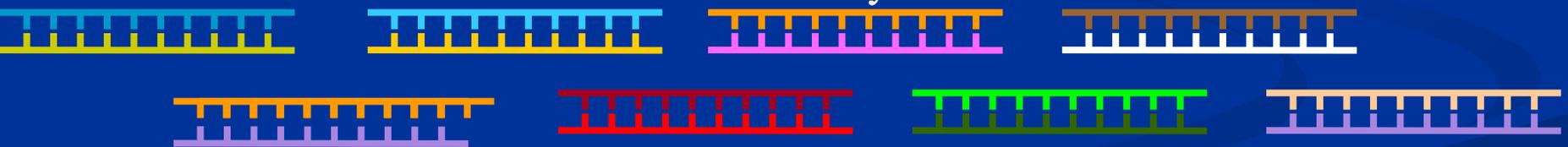
Allele 8



dopo 28 cicli di
amplificazione...



Thermal cycle

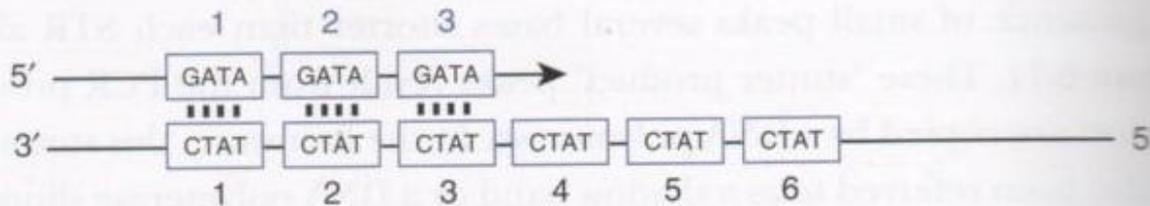


Aumento esponenziale del numero di copie di DNA al crescere del numero dei cicli

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggisenò) e relative conclusioni dei periti

Come si producono le *stutter*?

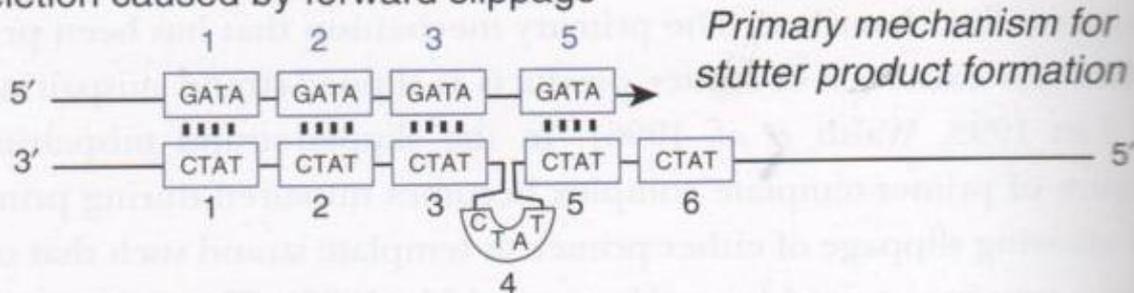
(a) Normal replication



Normale meccanismo di replicazione

Meccanismo di formazione delle *stutter*

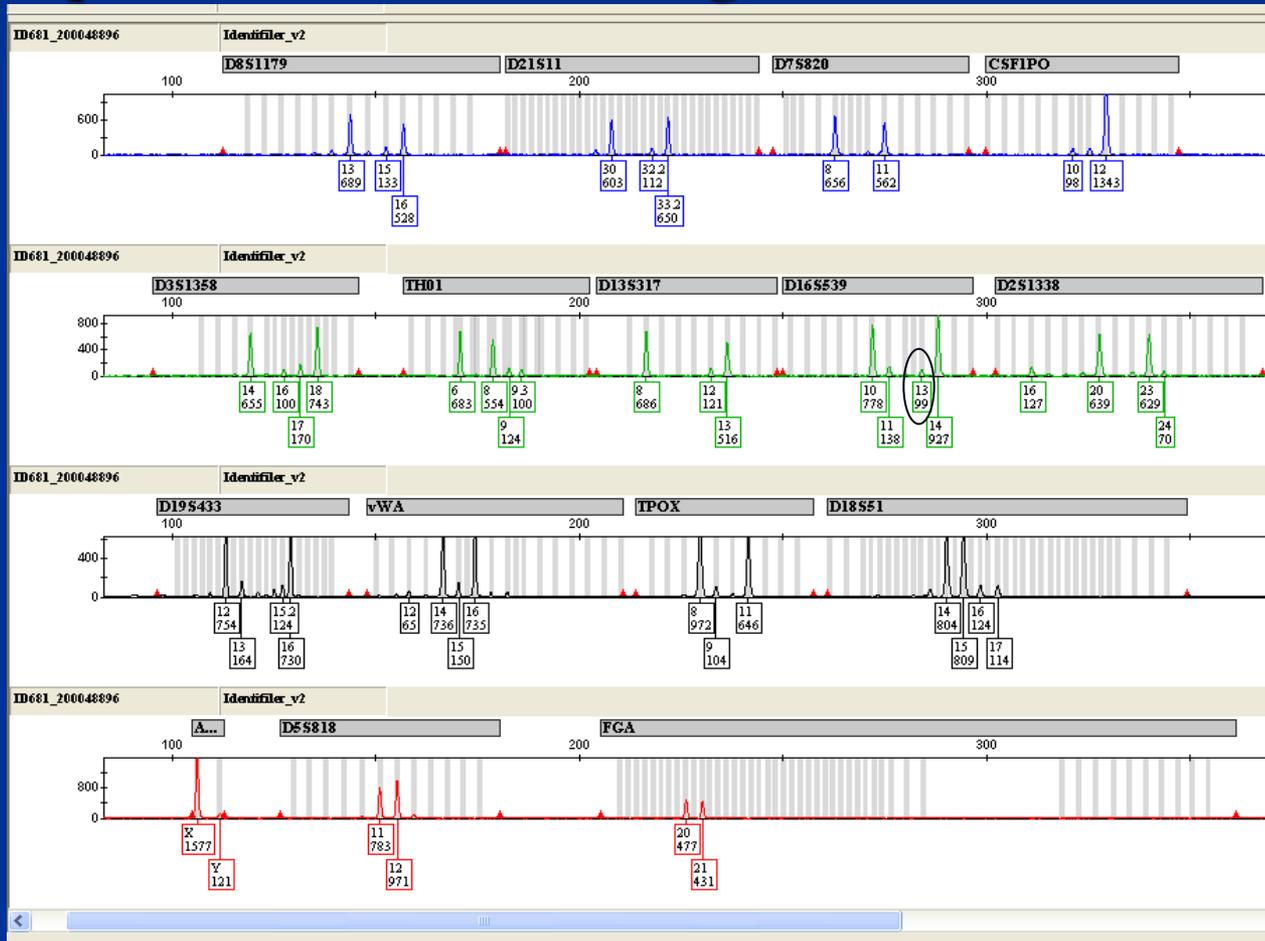
(c) Deletion caused by forward slippage



Il risultato è la formazione di un “*allele*” più corto di un’unità

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Depositato agli atti a fine settembre 2008 su disposizione del GUP, a seguito di istanza

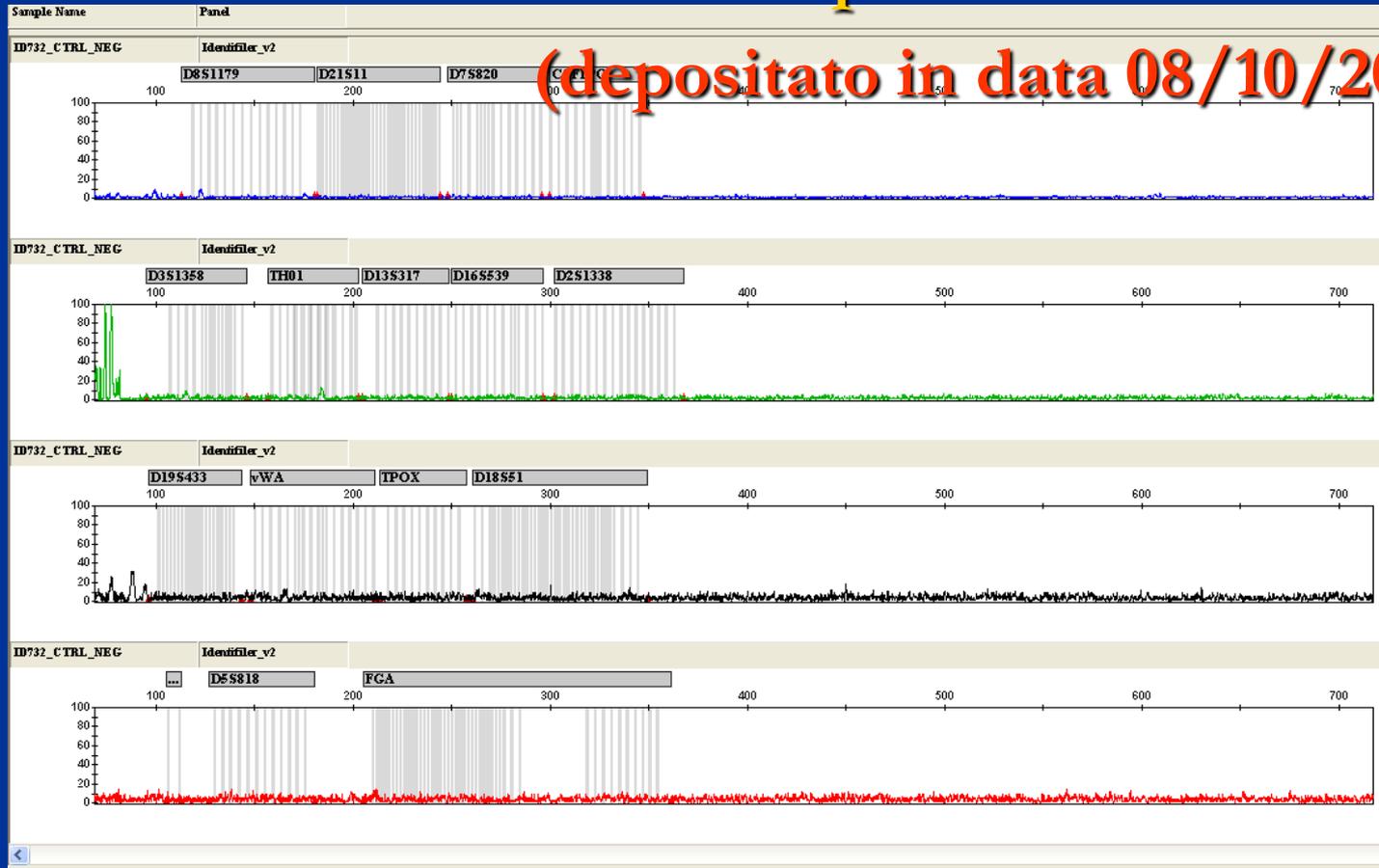


Questa è la stampata dell'elettroferogramma oggetto della discussione in sede di udienza GUP (04/10/2008)

SOLO CON L'ALTEZZA DEI PICCHI INTERPRETATI

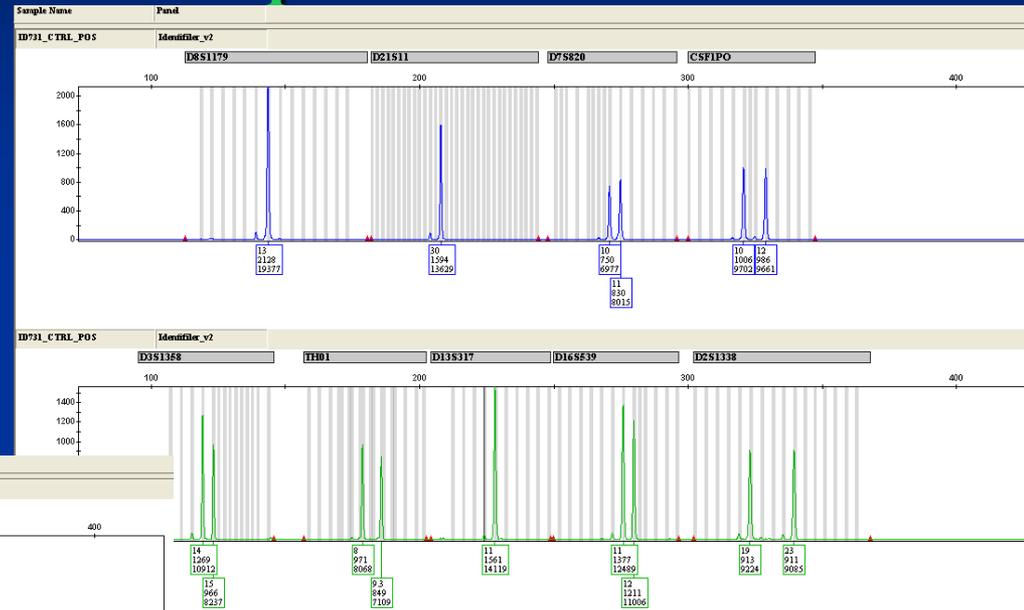
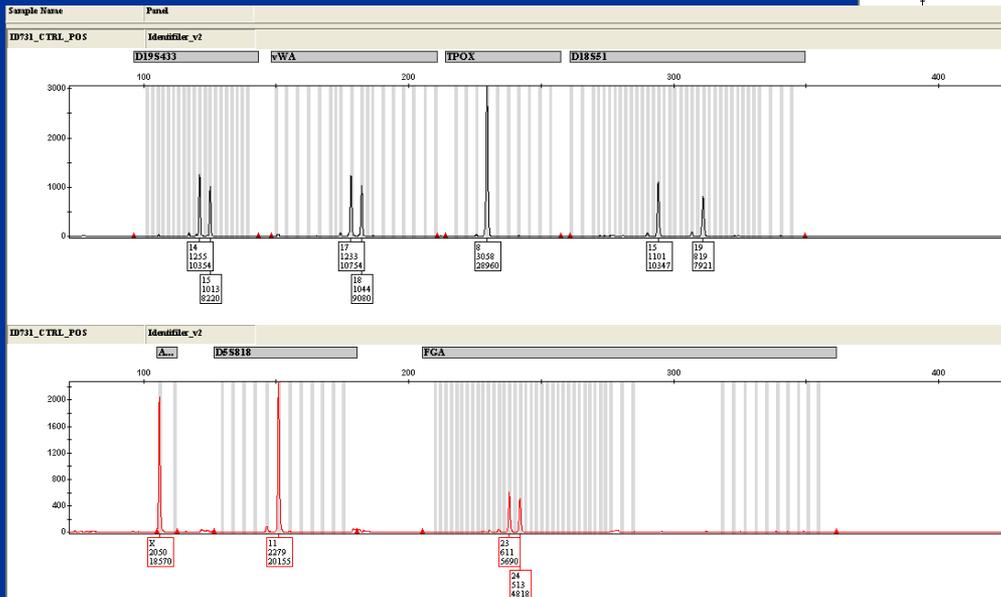
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Controllo negativo di amplificazione delle tracce "A" e "B" del reperto 165



Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Controllo positivo di amplificazione delle tracce "A" e "B" del reperto 165



(depositato in data
08/10/2008)

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

**D. prof. Pascali
R. dr.ssa Stefanoni**

**Riferisco sull'
esistenza dei
Ctrl. negativi
e positivi delle
tracce**

documentale non solamente il risultato positivo ma anche il risultato negativo cioè il fatto che correntemente quello che lei ha chiamato bianco di reazione, il bianco di reazione li avete fatti?

RISPOSTA - Sì.

DOMANDA - Perché non li avete allegati?

RISPOSTA - Perché non li abbiamo allegati perché va da sé..

DOMANDA - Potete allegarli?

RISPOSTA - Io li posso allegare, guardi ne ho proprio due qui riguardo la traccia del coltello per esempio, li ho portati perché normalmente non li allegiamo cioè io do per scontato che le persone che sono dei consulenti e comunque dei genetisti forensi come me operino nella più assoluta oggettività del dato, se io, come ho detto stamattina, ho una P.C.R. e quindi una analisi elettroforetica che mi evidenzia un controllo negativo inquinato io ripeto tutta l'analisi quindi per me è scontato la mia, come dire, buona fede ma lo sarebbe anche scontato nel caso in cui un'altra persona consulente mi facesse vedere dei dati tanto è vero che tante volte io sono chiamata, nominata consulente d'ufficio di Tribunale o di Giudici in generale e io non chiedo mai il controllo positivo o negativo perché do per scontato che siano ovviamente di buona qualità altrimenti non penso che una persona dia un risultato geneticamente rilevante sia positivo che negativo che sia, perché anche un risultato negativo... se non c'è il controllo positivo significa che quella reazione non è proprio avvenuta quindi anche un risultato negativo per me è negativo dando per scontato che il risultato positivo lo sia il controllo positivo, il risultato negativo sia veramente negativo ad ogni buon conto se si vuole prendere acquisizione di un controllo positivo o negativo casualmente che ho stampato e che fa parte della stessa corsa elettroforetica quindi nella stessa

sezione di lavoro perché i numeri sono consecutivi quindi è facile evidenziabile lo si può anche dare, fermo restando che poi chiunque poteva venire in laboratorio a vedere la corsa nel momento in cui sono state fatte le operazioni tecniche e valutare se il controllo positivo e negativo che c'era in ogni corsa e quindi in ogni sessione di amplificazione erano validi, io questo non l'ho mai avuta questa richiesta, non l'ho potuta negare, diciamo, non ho avuto proprio l'opportunità né di negarla, né di acconsentire ad essa.

DOMANDA - Va beh, quindi se ho capito bene nei vostri documenti noi possiamo rinvenire i controlli negativi dei reagenti ma non quelli dei campioni cioè è questo quello che mi sta dicendo?

RISPOSTA - Se per campione lei intende come ha detto prima un campione repertato cioè una traccia repertata sullo stesso oggetto, sullo stesso campione, no, noi non l'abbiamo.

DOMANDA - Va bene, io prendo atto di questo e però faccio un rilievo che mi sembra molto importante e cioè che questo è un grave errore.

GIUDICE - Sì, sì, questo l'ha già detto prima Professore!

DOMANDA - Vorrei adesso passare alla questione di quella che ho chiamato interpretazione della traccia 7597. Dottoressa lei ha in due parti della sua relazione consegnato...

RISPOSTA - Scusi Professore non ho capito i numeri che lei...

GIUDICE - Si riferisce?

DOMANDA - 164B...

GIUDICE - 5 forse?

RISPOSTA - 165 o 164?

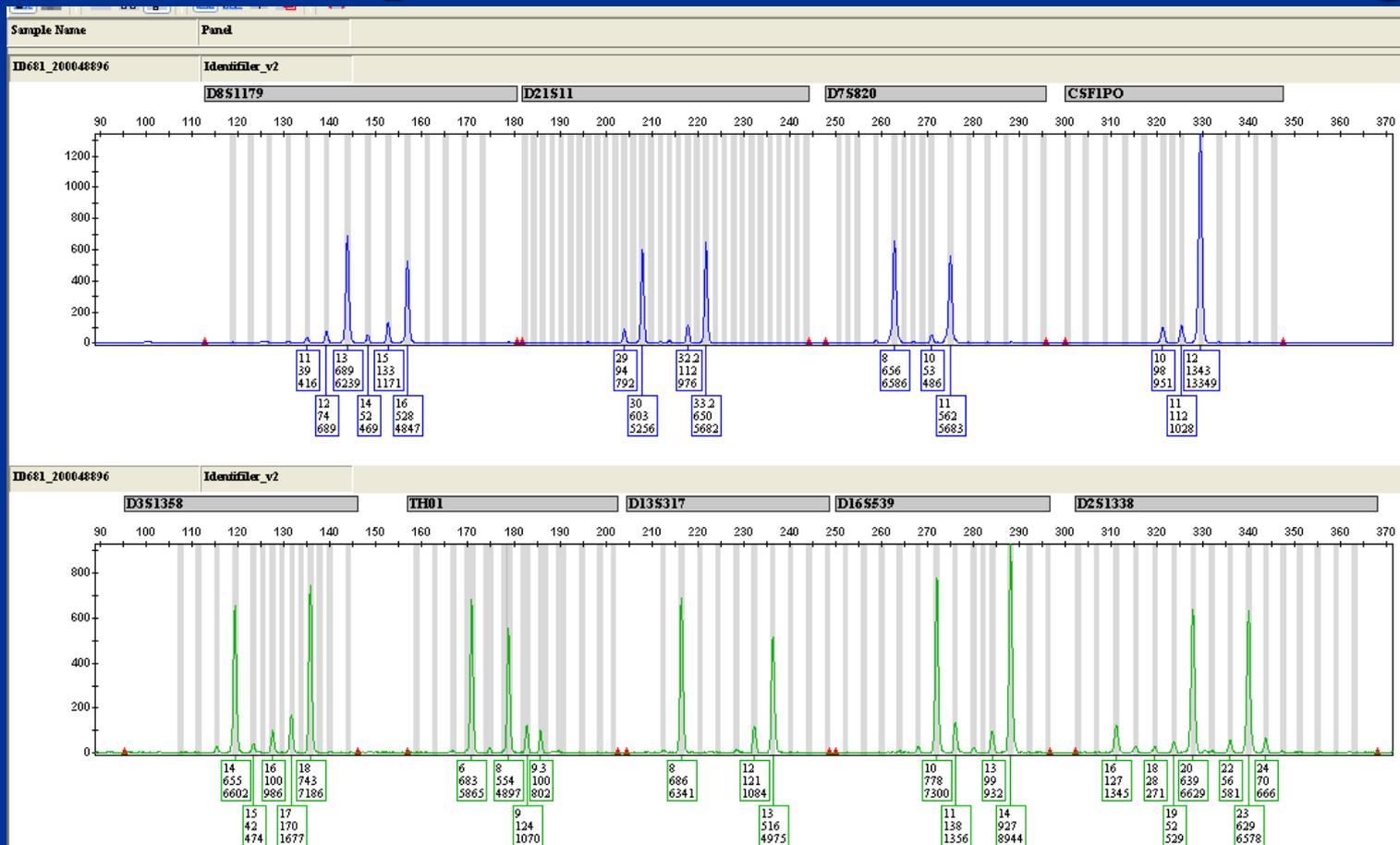
GIUDICE - 165 voglio sperare perché di quella stiamo parlando da un pezzo quindi!

DOMANDA - Sì.

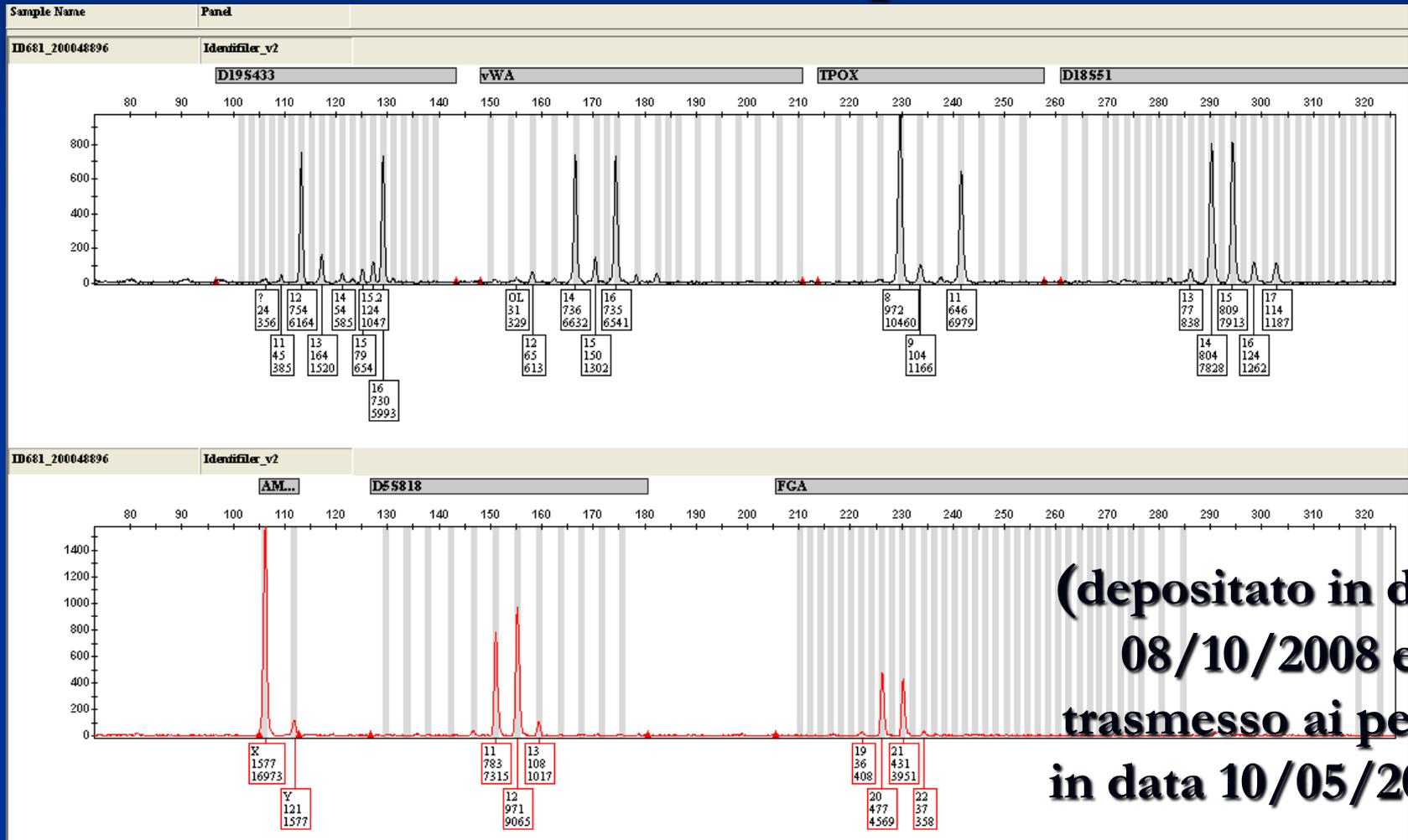
RISPOSTA - Sempre la B, ok, sempre la stessa, ok!

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggisenò) e relative conclusioni dei periti

Elettroferogramma traccia 165/B riportante l'altezza e l'area di ciascun picco evidenziato, senza valore-soglia



Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti



(depositato in data
08/10/2008 e
trasmesso ai periti
in data 10/05/2011)

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Rapporto medio di mistura : 1 a 6 cosa significa?

La componente maggiore di DNA è presente *quantitativamente* mediamente 6 volte in più rispetto all'altra componente di DNA che si individua quale contributore della mistura

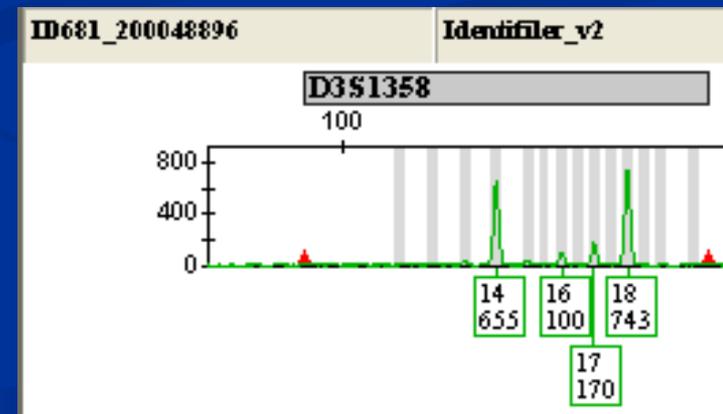
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Come si calcola?

Guardando l'altezza dei picchi della componente maggiore e della componente minore: si fa un rapporto.

Ad esempio: *locus D3*

$$\frac{655 + 743}{100 + 170} = 5,17$$



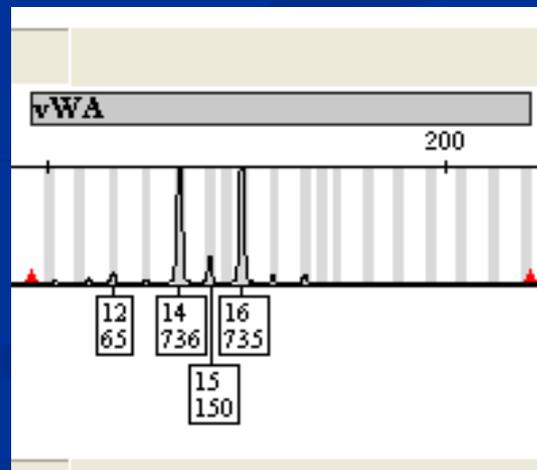
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Come si calcola?

Guardando l'altezza dei picchi della
componente maggiore e della componente
minore: si fa un rapporto.

Ad esempio: *locus vWA*

$$\frac{736 + 735}{65 + 150} = 6,84$$



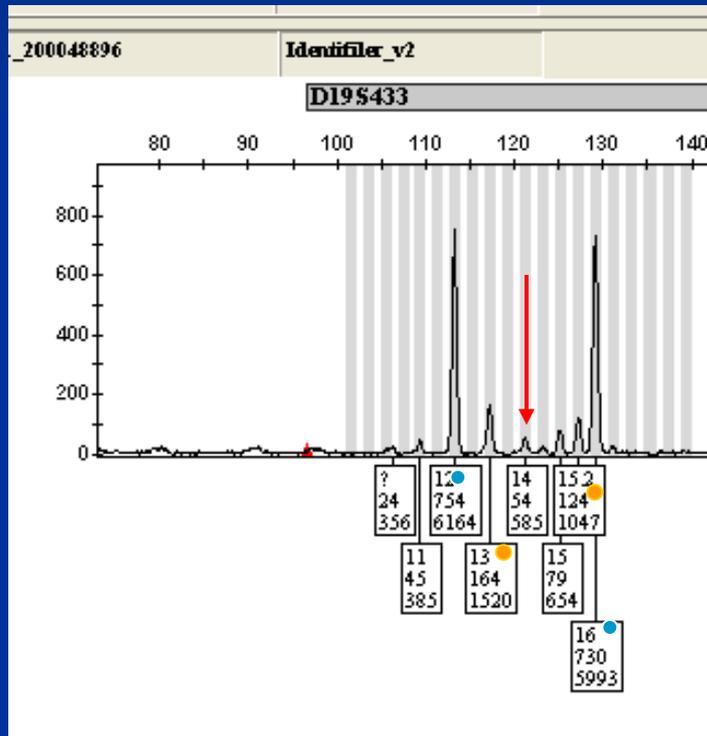
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Cosa accade se consideriamo oltre a queste due componenti di DNA una terza (o una quarta) componente che è ancora più minoritaria rispetto alla componente principale?

Accade che i picchi presi in esame risultano **ancora più sbilanciati** (con un rapporto medio superiore a 1 : 6), quindi notevolmente più bassi, rispetto alla componente principale, e ciò comporta **un'altissimo rischio di commettere errori di interpretazione**

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Esempio: allele 14 (54 RFU)



In che rapporto proporzionale è con la componente maggiore della mistura (alleli vittima)?

Calcoliamo:

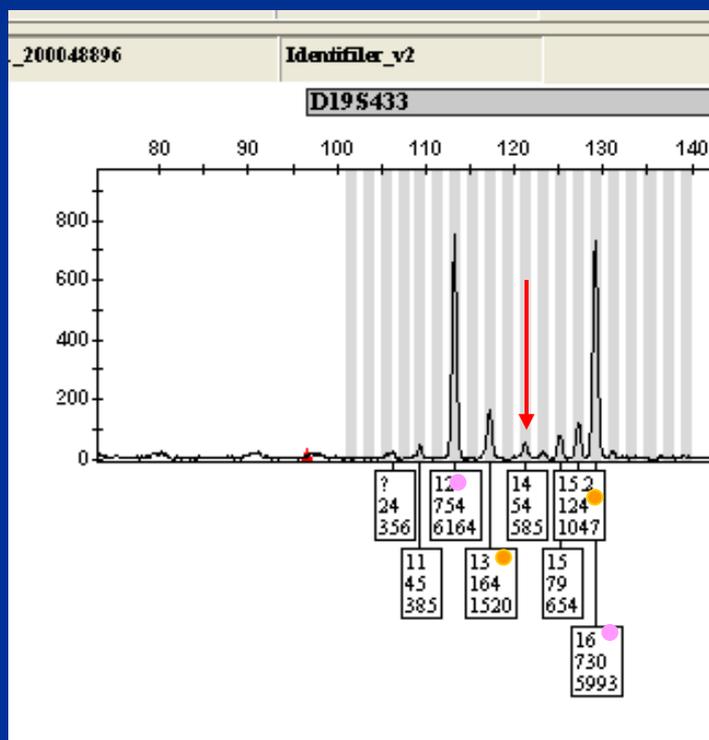
media altezza alleli vittima:

742 RFU

$$\frac{742}{54} = 13,7$$

Rapporto di mistura **1 : 13,7** → **SBILANCIATISSIMO**

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti



In che rapporto proporzionale è con la componente maggiore della mistura (alleli vittima) con gli alleli attribuiti a Sollecito?

Calcoliamo:

$$\text{alleli vittima: } \frac{754 + 730}{164 + 124} = 5,15$$

$$\text{alleli Sollecito: } 164 + 124$$

Rapporto di mistura **1 : 5,15** → **ACCETTABILE**

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Risultati : l'analisi della **traccia A** ha consentito di determinare il **profilo genetico della vittima KERCHER Meredith Susanna Cara**, già mostrato in tabella 12-I (riscontro effettuato con il profilo genetico riportato a pag.50 riferibile al Rep.21).

L'analisi della **traccia B** ha consentito l'estrapolazione 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. Il confronto effettuato tra il genotipo derivante dalla traccia B del Rep.165 con quelli appartenenti a SOLLECITO Raffaele e KERCHER Meredith Susanna Cara (riscontri effettuati, rispettivamente, con il profilo genetico

Sede: via Tuscolana 1548 – 00173 Roma
202

riportato a pag 63 Tabella 30-I, riferibile al Rep.30 e con il profilo genetico riportato a pag.50 riferibile al Rep.21, tabella 21) 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.**

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)

Allegato elettroferogrammi: ID682_48897 (traccia A); ID681_48896 (traccia B); Y485_48896 (traccia B)

Conclusioni
alle quali
portano i
risultati
delle analisi
della **traccia**
165/B
contenute
nella
Relazione
Tecnica del
Servizio
Polizia
Scientifica

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

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:

perizia pag.134

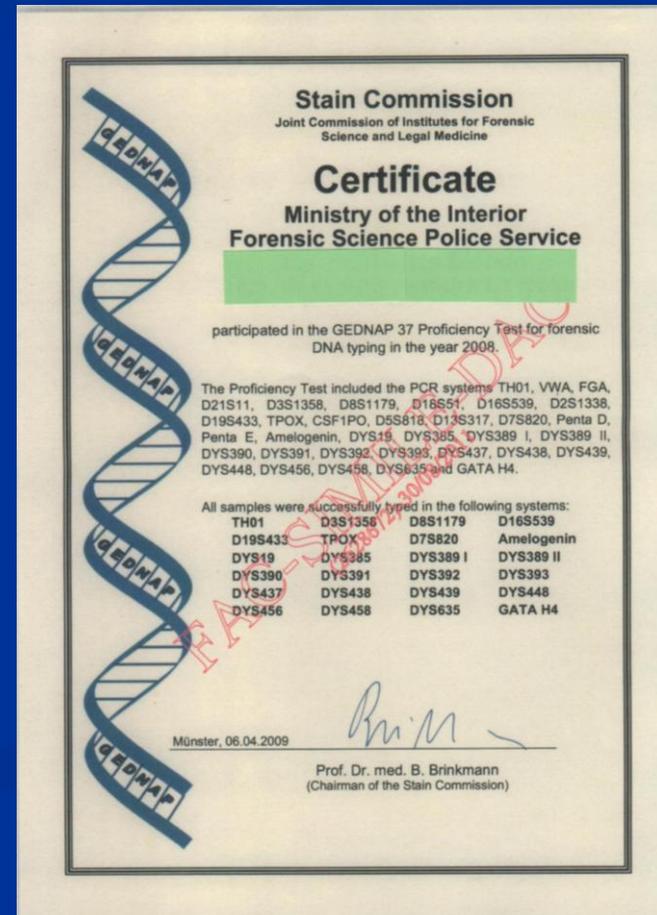
LOCUS	RTIGF	NS LETTURA	ALLELI NON LETTI
DYS456	13	13, 15	15 († 82)
DYS389I	12	12, 13	13 († 118)
DYS390	22	22, 23, 24	23 († 76), 24 († 107)
DYS389II	29	29	-----
DYS458	15	15, 17	17 († 63)
DYS19	14	14	-----
DYS385	13,14	13, 14, 16	16 († 59)
DYS393	13	12, 13, 14	12 (†212=18.97% allele 13) 14 († 65)
DYS391	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 C.I.

Quindi si concorda sull'affermazione della Dr.ssa Stefanoni circa "l'estrapolazione di un profilo genetico derivante da mistura di sostanze biologiche appartenenti ad almeno due individui dei quali almeno uno di sesso maschile" ma non sono condivisibili le conclusioni ove si afferma che "il profilo genetico è compatibile con l'ipotesi di mistura di sostanze biologiche (presumibilmente cellule di sfaldamento) appartenenti" solo "a Sollecito Raffaele e a Kercher Meredith Susanna Cara".

Stessa affermazione ripetuta a pag.142. Il **“solo”** è stato aggiunto dai periti non è presente nelle conclusioni alle quali si perviene nella relazione tecnica.

Questioni di carattere generale riguardanti alcuni argomenti trattati in perizia *Proficiency test (test di competenza)* del Laboratorio di Genetica Forense del Servizio Polizia Scientifica **ATTESTATO ESERCIZIO 2008**



Questioni di carattere generale riguardanti

alcuni argomenti trattati in perizia

Proficiency test (test di competenza) del Laboratorio di Genetica Forense del Servizio Polizia Scientifica

ATTESTATO ESERCIZIO 2009

Stain Commission
Joint Commission of Institutes for Forensic Science and Legal Medicine

Certificate

Ministry of the Interior
Public Security Department
Forensic Science Police Service

Rome

participated in the GEDNAP 38 and 39 Proficiency Tests and has characterized the eight forensic stains correctly.

Münster, 26.03.2010

Prof. Dr. med. B. Brinkmann
(Chairman of the Stain Commission)

Stain Commission
Joint Commission of Institutes for Forensic Science and Legal Medicine

Certificate

Ministry of the Interior
Public Security
Forensic Science Police Service

Rome

participated in the GEDNAP 39 Proficiency Test for forensic DNA typing in the year 2009.

The Proficiency Test included the DNA systems TH01, VWA, FGA, D21S11, ACTBP2, D3S1358, D8S1179, D18S51, D16S539, D2S1338, D19S433, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, Penta D, Penta E, Amelogenin, DYS19, DYS385, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 and GATA H4.

All samples were successfully typed in the following systems:

TH01	VWA	FGA	D21S11
ACTBP2	D3S1358	D8S1179	D18S51
D16S539	D2S1338	D19S433	TPOX
CSF1PO	D5S818	D13S317	D7S820
Penta D	Penta E	Amelogenin	DYS19
DYS385	DYS389 I	DYS389 II	DYS390
DYS391	DYS392	DYS393	DYS437
DYS438	DYS439	DYS448	DYS456
DYS458	DYS635	GATA H4	

Münster, 26.03.2010

Prof. Dr. med. B. Brinkmann
(Chairman of the Stain Commission)

Certificate

Ministry of the Interior
Public Security
Forensic Science Police Service

Rome

participated in the GEDNAP 38 and 39 Proficiency Tests for additional forensic DNA typing in the year 2009.

The Proficiency Tests included the DNA systems D12S391, D2S441, D10S1248, D22S1045 and D1S1656.

All samples were successfully typed in the following systems:

D12S391	D2S441	D10S1248
D22S1045	D1S1656	

Münster, 26.03.2010

Prof. Dr. med. B. Brinkmann
(Institut für Forensische Genetik Münster)

Questioni di carattere generale riguardanti

alcuni argomenti trattati in perizia

Proficiency test (test di competenza) del Laboratorio di Genetica Forense del Servizio Polizia Scientifica

ATTESTATO ESERCIZIO 2010

Stain Commission
Joint Commission of Institutes for Forensic Science and Legal Medicine

GEDNAP 2010

Certificate

Ministry of the Interior
Anticrime Central Directorate
Forensic Science Police Service
Roma

[Redacted Name]

participated in the GEDNAP 40 and 41 Proficiency Tests and has characterized seven of the eight forensic stains correctly.

Münster, 06.05.2011

Dr. Carsten Hohoff
(Executive Director of the GEDNAP Proficiency Tests)

Prof. Dr. Bernd Brinkmann
(Chairman of the GEDNAP Proficiency Testing Program)

Stain Commission
Joint Commission of Institutes for Forensic Science and Legal Medicine

Certificate

Ministry of the Interior
Anticrime Central Directorate
Forensic Science Police Service

[Redacted Name]

participated in the GEDNAP 41 Proficiency Test for forensic DNA typing in the year 2010.

The Proficiency Test included the DNA systems TH01, VWA, FGA, D21S11, ACTBP2, D3S1358, D8S1179, D18S51, D16S539, D2S1338, D19S433, D12S391, D2S441, D10S1248, D22S1045, D1S1656, Amelogenin, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, DYS19, DYS385, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 and GATA H4.

All samples were successfully typed in the following systems:

TH01	VWA	FGA	D21S11
ACTBP2	D3S1358	D8S1179	D18S51
D16S539	D2S1338	D19S433	D12S391
D2S441	D10S1248	D22S1045	D1S1656
Amelogenin	TPOX	CSF1PO	D5S818
D13S317	D7S820	DYS19	DYS385
DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391
DYS392	DYS393	DYS437	DYS438
DYS439	DYS448	DYS456	DYS458
DYS635	GATA H4		

Münster, 06.05.2011

Dr. Carsten Hohoff
(Executive Director of the GEDNAP Proficiency Tests)

Prof. Dr. Bernd Brinkmann
(Chairman of the GEDNAP Proficiency Testing Program)

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

APLOTIPO Y di Sollecito Raffaele: ricerca in

Banca-dati : www.yhrd.org

The screenshot shows the YHRD search interface with the following details:

- Search Parameters:** DYS19: 14, DYS389I: 12, DYS389II: 29, DYS390: 22, DYS391: 10, DYS392: 11, DYS393: 13, DYS385: 13,14, DYS438: 10, DYS439: 11, DYS437: 15, DYS448: 20, DYS456: 13, DYS458: 15, DYS633: 21, YGATAH4: 11.
- Search Results:** 0 matches found in 36447 haplotypes across 245 populations.
- Geographical projection:** A map showing the distribution of haplotypes across various regions, including North America, Europe, and Asia.

0 in 36447 aplotipi
di 245 popolazioni

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Concetto di compatibilità di un profilo genetico in una mistura

“Se tutti gli alleli del profilo di DNA di un sospettato sono rappresentati nella mistura di una traccia proveniente dalla scena del crimine, allora il sospettato *non può essere escluso* quale contributore della traccia presa dalla scena del crimine”

(*Forensic DNA Typing*, Second Edition, pag.166 – John M. BUTLER)

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

perizia pag.142

“l’extrapolazione di un profilo genetico derivante da mistura di sostanze biologiche appartenenti ad almeno due individui dei quali almeno uno di sesso maschile” ma non sono condivisibili le conclusioni ove si afferma che *“il profilo genetico è compatibile con l’ipotesi di mistura di sostanze biologiche (presumibilmente cellule di sfaldamento) appartenenti” solo “a Sollecito Raffaele e a Kercher Meredith Susanna Cara”* in quanto, da quanto precedentemente esposto, è presente una mistura nella quale sono presenti più contributori di sesso maschile (circostanza 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);

- Il reperto è stato recuperato 46 giorni dopo il crimine, in un contesto altamente suggestivo di contaminazione ambientale. Il rischio di interpretare non correttamente tali contaminanti ambientali da polvere avrebbe potuto 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, procedura che non è stata attuata;

-Tenuto conto di quanto esposto relativamente alle metodiche di sopralluogo, vista la documentazione in atti, ed in particolare il DVD del filmato indagini di sopralluogo, le foto ufficiali della Polizia Scientifica e le dichiarazioni rese in udienza, 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. Da ciò deriva che non si può escludere che i risultati ottenuti dal Rep.165B possano derivare da fenomeni di contaminazione verificatasi in una qualunque fase della repertazione e/o manipolazione di detto reperto.

Come si fa a sapere prima delle analisi che una superficie dalla quale si preleva polvere non ha su di se del DNA? Se si trova poi un profilo genetico lo si deve attribuire alla “polvere” o alla superficie toccata al di sotto di essa?

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti



Foto sopralluogo del
2-3-4 Novembre 2007

**pezzetto di stoffa con il gancetto
non deformato rivolto verso l'alto**

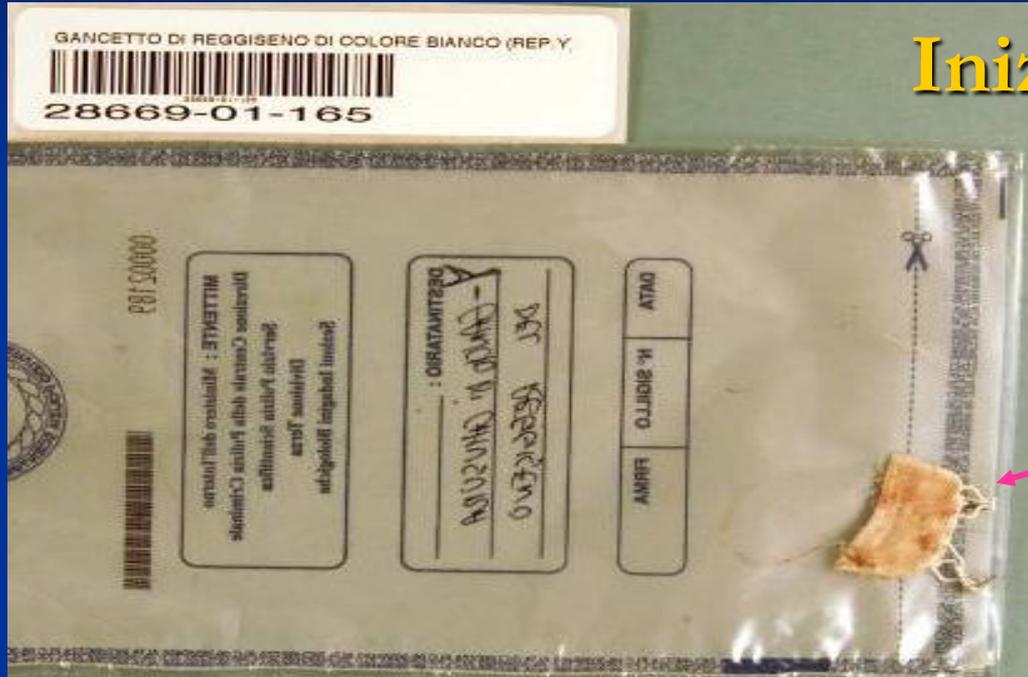
Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti



Foto sopralluogo del
18 Dicembre 2007

pezzetto di stoffa con il gancetto
non deformato rivolto verso l'alto

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti



Inizio operazioni tecniche
del 21/12/2007

Lato B



pezzetto di stoffa con il
gancetto *non* deformato
rivolto verso il basso

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Codice Reperto N. Tracce **Descrizione Reperto**
 28669-01-030 1 Nr.2 tamponi salivari prelevati a SOLLECITO Raffaele

Elenco Tracce

Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia	Quantità Estratt	Ubicazione Estratt									
28669-01-030-01	200047233	PRESUNTA SALIVA	presunta sostanza salivare di SOLLECITO Raffaele	100	260/L7									
<p><i>AMILASI</i> → <i>TIPOLOGIA REATTIVO 1</i> <i>PN / EXP DATE</i></p>														
Data 1 [^]	Data 2 [^]	Data 3 [^]	Data 1 [^]	Data 2 [^]	Data 3 [^]	Data 1 [^]	Kit	Data 2 [^]	Kit	Data 3 [^]	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run 3
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strumento
06-11-07												/	/	/
<p><i>AME D8S D21 D7S CSF D3S TH0 D13 D16 D2S D19 vWA TPO D18 D5S FGA PE PD DQa HV HVI HV2 HV3</i></p>														

tampone salivare

Stato Avanzamento Lavori (SAL)

Codice Reperto N. Tracce **Descrizione Reperto**
 28669-01-032 14 NR.1 PAIO DI SCARPE MARCA "NIKE"

Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia	Quantità Estratt	Ubicazione Estratt									
28669-01-032-09	200048641	PRESUNTA TRACCIA EMATICA	presunta sostanza ematica lett. I (sx)	50	269/L4									
<p><i>TETRAMETILBENZIDINA</i> <i>LUMINOL</i> <i>CROMATOGRAFIA GEL SILIC</i> <i>IMMUNOELETTROFORESIS</i> <i>METODICHE IMMUNOLOGICHE</i> <i>SPECIE ANIMALE</i></p> <p><i>NEGATIVO</i></p>														
Data 1 [^]	Data 2 [^]	Data 3 [^]	Data 1 [^]	Data 2 [^]	Data 3 [^]	Data 1 [^]	Kit	Data 2 [^]	Kit	Data 3 [^]	Kit	N. Run 1	N. Run 2	N. Run 3
Estraz.	Estraz.	Estraz.	Quantif.	Quantif.	Quantif.	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Amplif.	Commerciale	Strumento	Strumento	Strumento
17-12-07												/	/	/
<p><i>AME D8S D21 D7S CSF D3S TH0 D13 D16 D2S D19 vWA TPO D18 D5S FGA PE PD DQa HV HVI HV2 HV3</i></p>														

scarpe "NIKE"

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Rep. 165:
Pezzetto di
stoffa con
gancetti

Stato Avanzamento Lavori (SAL)

Codice Reperto	N. Tracce	Descrizione Reperto
28669-01-165	2	GANCETTO DI REGGISENO DI COLORE BIANCO (REP.Y)

Elenco Tracce

Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia	Quantità Estratt	Ubicazione Estratt																	
28669-01-165-01 AMILASI	200048896	PRESUNTA SALIVA TIPOLOGIA REATTIVO:1 PN / EXP DATE	Presunte cell. sfaldamento -B (ganci)-	50	271/F1																	
Data 1^a Estraz.	Data 2^a Estraz.	Data 3^a Estraz.	Data 1^a Quantif.	Data 2^a Quantif.	Data 3^a Quantif.	Data 1^a Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^a Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^a Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run 3 Strumento								
29-12-07												/	/	/								
AME	D8S	D21	D7S	CSF	D8S	TH0	D13	D16	D2S	D19	vWA	TP0	D18	D5S	FGA	PE	PD	DQa	HV	HVI	HV2	HV3
Codice Traccia	Codice Sample ID	Tipo di Traccia	Descrizione Traccia	Quantità Estratt	Ubicazione Estratt																	
28669-01-165-02 TETRAMETILBENZIDINA POSITIVO	200048897	PRESUNTA TRACCIA EMATICA LUMINOL CROMATOGRAFIA GEL SILIC IMMUNOELETTROFORESI METODICHE IMMUNOLOGICHE	Presunta sostanza ematica -A-	50	271/F2																	
Data 1^a Estraz.	Data 2^a Estraz.	Data 3^a Estraz.	Data 1^a Quantif.	Data 2^a Quantif.	Data 3^a Quantif.	Data 1^a Amplif.	Kit Commerciale	Data 2^a Amplif.	Kit Commerciale	Data 3^a Amplif.	Kit Commerciale	N. Run 1 Strumento	N. Run 2 Strumento	N. Run 3 Strumento								
29-12-07												/	/	/								
AME	D8S	D21	D7S	CSF	D8S	TH0	D13	D16	D2S	D19	vWA	TP0	D18	D5S	FGA	PE	PD	DQa	HV	HVI	HV2	HV3

Tra il 17/12/2007 ed il 29/12/2007 = **12 giorni**

Nel laboratorio sono state analizzate 255 tracce totali
(48896 - 48641)

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

perizia pag.142

Cosa vuol dire
”altamente suggestivo
di contaminazione
ambientale”?

Nulla è stato portato
dall'esterno all'interno
della stanza della vittima

“l'estrapolazione di un profilo genetico derivante da mistura di sostanze biologiche appartenenti ad almeno due individui dei quali almeno uno di sesso maschile” ma **non sono condivisibili le conclusioni** ove si afferma che “il profilo genetico è compatibile con l'ipotesi di mistura di sostanze biologiche (presumibilmente cellule di sfaldamento) appartenenti” solo “a Sollecito Raffaele e a Kercher Meredith Susanna Cara” in quanto, da quanto precedentemente esposto, è presente una mistura nella quale sono presenti più contributori di sesso maschile (circostanza 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);

- Il reperto è stato recuperato 46 giorni dopo il crimine, in un contesto altamente suggestivo di contaminazione ambientale. Il rischio di interpretare non correttamente tali contaminanti ambientali da polvere avrebbe potuto 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, procedura che non è stata attuata;

-Tenuto conto di quanto esposto relativamente alle metodiche di sopralluogo, vista la documentazione in atti, ed in particolare il DVD del filmato indagini di sopralluogo, le foto ufficiali della Polizia Scientifica e le dichiarazioni rese in udienza, 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. Da ciò deriva che non si può escludere che i risultati ottenuti dal Rep.165B possano derivare da fenomeni di contaminazione verificatasi in una qualunque fase della repertazione e/o manipolazione di detto reperto.

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Cosa si intende per “ambiente”? Dati riferiti alle tracce analizzate in casa della vittima

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 ul 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.

perizia pag.142

AMBIENTE CASA	NR. TRACCE
stanza vittima	89
stanza bagno piccolo	12
stanza bagno grande	6
stanza Knox	5
stanza Romanelli	3
soggiorno-angolo cottura	12
corridoio	6
TOTALE	133 ¹¹⁶

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Quante tracce della casa della vittima hanno fornito il profilo genetico di Raffaele Sollecito (oltre alla traccia 165/B)?

1 sola traccia

Rep.145/A: mozzicone di sigaretta nel posacenere del soggiorno-angolo cottura (profilo genetico misto: KNOX-SOLLECITO)

Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

Risultati genetici delle tracce sui mozziconi

1. 3 mozziconi individuo maschile (**UOMO#7**)
2. 2 mozziconi individuo femminile (**DONNA#3**)
3. 1 mozzicone miscela genetica

KNOX/SOLLECITO



Valutazione delle analisi effettuate sulla traccia 165/B (gancetti di reggiseno) e relative conclusioni dei periti

CONCLUSIONI

1. La mistura genetica riferibile alla traccia 165/B (gancetti di reggiseno della vittima) è compatibile sia con il DNA di Meredith KERCHER sia con il DNA di Sollecito Raffaele. Tale risultato è confortato dall'analisi del cromosoma Y uguale a quello appartenente a Sollecito. Quindi non vi è evidenza di una erronea interpretazione dei picchi allelici assegnati
2. L'ipotesi avanzata dai periti di una eventuale contaminazione della traccia 165/B è priva di qualsiasi fondamento oggettivo, non essendo suffragata da alcuna evidenza documentata e/o circostanziale dalla quale poter desumere il verificarsi di tale ipotesi