

INCARICO

Il giorno 22 gennaio 2011 i sottoscritti Prof. Stefano Conti e Prof.ssa Carla Vecchiotti, Specialisti in Medicina Legale, in servizio presso il Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico-legali e dell'apparato locomotore – Sez. di Medicina Legale, dell'Università di Roma "Sapienza", venivano incaricati dal Dr. Claudio Pratillo Hellmann, Presidente della Corte di Assise di Appello di Perugia, Sez. Penale, di eseguire indagini di laboratorio relative al proc. pen. n° 10/2010 R.G. onde poter rispondere ai seguenti quesiti:

“Esaminati gli atti di causa e svolte le indagini tecniche ritenute necessarie accerti il Collegio di periti:

- se è possibile, mediante nuovo accertamento tecnico, l'attribuzione ed il grado di attendibilità dell'eventuale attribuzione del DNA presente sui reperti 165b (gancetto del reggiseno) e 36 (coltello);*
- se non è possibile procedere a nuovo accertamento tecnico, valuti, in base agli atti, il grado di attendibilità degli accertamenti genetici eseguiti dalla Polizia scientifica sui reperti suddetti, con riferimento anche ad eventuali contaminazioni”.*

Per la necessità di effettuare indagini fuori della presenza dell'Ufficio ci furono concessi giorni 90, successivamente prorogati, per il deposito della relazione peritale.

OPERAZIONI PERITALI

Le operazioni peritali hanno avuto inizio il giorno 09 febbraio 2011, alle ore 11,15, presso il Laboratorio di Genetica Forense della Sezione di Medicina Legale dell'Università "Sapienza" di Roma, V.le Regina Elena 336.

In tale data erano presenti i seguenti consulenti delle parti:

- Dr.ssa Patrizia Stefanoni, consulente per la Procura Generale;
- Prof. Giuseppe Novelli, consulente per la Procura Generale;
- Dott. Emiliano Giardina, consulente per la Procura Generale;
- Prof.ssa Francesca Torricelli, consulente per la parte civile;
- Prof. Adriano Tagliabracci, consulente per Raffaele Sollecito;
- Dott. Valerio Onofri, consulente per Raffaele Sollecito;
- Prof. Carlo Torre, consulente per Amanda M. Knox;
- Dr.ssa Sarah Gino, consulente per Amanda M. Knox;
- Dr. Walter Patumi, consulente per Amanda M. Knox.

Nel verbale redatto in tale sede si dava atto "che i reperti denominati Rep.36 e Rep.165/b sono stati regolarmente consegnati in data 8/2/2011, come disposto dall'Ill.mo Signor Presidente Dott. Helmann, e come attestato dal verbale di consegna datato 8/2/2011. Si fa presente che al momento della consegna entrambi i reperti risultavano essere regolarmente sigillati in involucro singolo ed in particolare il Rep.36 nr 00015662 bloccato in scatola di cartone mediante sigillo di sicurezza di colore rosso con nr. 0000179 e Rep.165/b nr 00012877 contenuto in una provetta con tappo di colore rosso, come anche evidenziato dalla documentazione iconografica eseguita sia da parte dei periti nominati che dall'Agente Scelto della Polizia di Stato (Ugo Arcuri)".

Nel verbale i consulenti delle parti esprimevano, per iscritto, le loro richieste che si riportano di seguito:

1. Dott.ssa Sarah Gino: "Quantificazione con Real Time";
2. Prof. Tagliabracci e Dott. Onofri: "Chiede che periti eseguano, se vi è materiale a disposizione, di ripetere l'esame del DNA sull'estratto del reperto 165B a disposizione eventuale della polizia scientifica";

3. Dr.ssa Stefanoni, Prof. Novelli, Dott. Giardina, Prof.ssa Torricelli: “utilizzare la tecniche più sensibili in parallelo ed in modo comparativo con quelle utilizzate nel precedente esperimento”;

4. Dott.ssa Gino, Prof. Torre: “Si richiede che in occasione dell’apertura dei reperti, eventuali tracce (strisciature ecc) presenti sul coltello siano confrontate con immagini fotografiche relative alle prime indagini (sopralluogo, indagini di laboratorio ecc.)”;

5. Prof. Tagliabracci: “si associa”;

6. Dr. Onofri: “si associa”;

7. Prof. Novelli, Dott. Giardina: “Nulla da dichiarare a riguardo”;

8. Prof. Torricelli: “Nulla da dichiarare in riferimento al reperto coltello”;

9. Dr.ssa Stefanoni: “Nulla da dichiarare riguardo alla visione dei reperti”.

I periti nominati preso atto delle considerazioni presentate dalle parti comunicano agli stessi che verranno riconvocati nei modi di legge per il prosieguo delle operazioni peritali. Ore 12,30 Roma 9/2/2011”.

Le operazioni peritali riprendevano il giorno 22/03/2011, alle ore 09,45, presso il Laboratorio di Genetica Forense del Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico-legale e dell’apparato locomotore–Sezione di Medicina Legale, dell’Università “Sapienza” di Roma.

In tale data erano presenti i seguenti consulenti delle parti:

-Dr.ssa Patrizia Stefanoni, consulente per la Procura Generale;

-Prof. Giuseppe Novelli, consulente per la Procura Generale;

-Prof.ssa Francesca Torricelli, consulente per la parte civile;

-Prof. Adriano Tagliabracci, consulente per Raffaele Sollecito;

-Dott. Valerio Onofri, consulente per Raffaele Sollecito;

-Prof. Carlo Torre, consulente per Amanda M. Knox;

-Dr.ssa Sarah Gino, consulente per Amanda M. Knox;

-Dr. Walter Patumi, consulente per Amanda M. Knox.

In tale sede i periti esponevano il *piano di lavoro*, che, in conformità con la metodologia medico-legale, prevedeva di effettuare le indagini di laboratorio sui Rep.36 e Rep.165B secondo le modalità di seguito riportate:

- 1) diagnosi generica di sangue, con l'impiego di test colorimetrici;
- 2) diagnosi specifica di sangue;
- 3) ricerca di cellule mediante colorazione specifica e osservazione al microscopio;
- 4) estrazione del DNA da ogni singolo reperto;
- 5) quantificazione del DNA mediante Real Time PCR, come richiesto e concordato con tutti i consulenti.

Nel verbale redatto in tale sede si annotava quanto segue “Si dà atto, da parte di tutti i presenti, che entrambi i reperti denominati Rep.36 e Rep.165/b risultano essere regolarmente sigillati in involucro singolo ed in particolare il Rep.36 nr 00015662 bloccato in scatola di cartone mediante sigillo di sicurezza di colore rosso con nr. 0000179 e Rep.165/b nr 00012877 contenuto in una provetta con tappo di colore rosso, come evidenziato dalla documentazione iconografica eseguita da parte dei periti nominati. Si prende atto che il Prof. Giuseppe Novelli si allontana dalla sede peritale alle ore 10,15. Alle ore 14,45 si allontanano anche il Prof. Carlo Torre ed il Dott. Patumi, il Prof. Tagliabracci, il Dott. Onofri. Si interrompono le operazioni peritali alle ore 18,05 e si concorda la prosecuzione per il giorno successivo 23/3/2011 alle ore 9,45”.

In data 22/3/2011 si procedeva all'apertura dapprima della scatola contenente il Rep.36 (coltello) e, successivamente, all'apertura della busta contenente la provetta all'interno della quale erano posti i gancetti (Rep.165B).

DESCRIZIONE DEL REP.36 (COLTELLO)

Il reperto 36 (coltello) si presentava alla nostra osservazione chiuso all'interno di una busta di plastica trasparente della Polizia di Stato sigillata con laccio in plastica rigida di colore rosso. Da una prima osservazione eseguita con l'oggetto all'interno della busta sigillata si sono evidenziate alcune fini striature sul lato dx che a partenza dal filo della lama proseguivano fino a circa la metà mediale della lama stessa. Si è quindi proceduto ad aprire la suddetta busta con l'ausilio di forbici sterili.

Il coltello risulta essere di tipo monotagliante con indicazione marca "*Marietti Stainless – Inox – Italy*" apposto sul lato sin.; la lama è inserita, in lavorazione pressofusa, in un manico plastificato di colore nero. Le caratteristiche merceologiche dei coltelli della Marca Marietti, così come risulta dalla scheda della Casa costruttrice, risultano essere "Lame Acciaio Inox AISI 420, stampate e lucidate a specchio".

Il manico, con forma a quadrilatero, ha dimensioni di cm 3 x 6,6, con al centro inserita la lama che risulta essere "a tenuta"; la lunghezza di tale lama è di cm.17,5 lungo il dorso e cm.18 lungo il tagliente, con altezza di cm.3 e spessore del bordo di circa mm.1,5.

Sul lato dx si conferma la presenza visiva di sottili striature, alcune delle quali di tipo curvilineo, che dalla punta si estendono sino a circa a metà della lama e su tutta la superficie dell'altezza; è presente, a livello del bordo di attacco della lama con il manico, un'area di colore più chiaro su quasi tutta l'altezza della lama, per uno spessore di circa cm.0,5 (corrispondente al becco di flauto). Sempre sul lato dx, esattamente a livello del bordo di attacco della lama sul manico, risulta la presenza di materiale di colore scuro esteso su tutta l'altezza per circa uno spessore di mm.1 e a livello del becco di flauto per circa mm.2. Sempre sul lato dx a livello del dorso a circa cm.1,5 dalla punta sono presenti piccole striature poste diagonalmente che si estendono verso il centro per una lunghezza di circa cm.6. Il bordo superiore, dorso lama, non presenta alterazioni.

Sul lato sin. si evidenziano sottili striature a partenza dalla punta che si estendono sino a circa metà della lama. A livello del bordo di attacco della lama con il manico, sempre sul lato sin., è presente un'area di colore più scuro che si estende per l'altezza della lama con una dimensione massima di circa cm.0,6 e per quasi cm.1 a livello inferiore in corrispondenza del becco di flauto. E' rilevabile, sempre a livello del bordo di attacco della lama con il manico, materiale di colorito scuro esteso su tutta l'altezza

della lama per circa uno spessore di mm.1. Il bordo superiore, dorso lama, non presenta alterazioni; lungo il tagliente sono presenti numerosi elementi di discontinuità, inferiori al mm. che si estendono per una lunghezza di circa cm.11.

ANALISI DI LABORATORIO SUL REP.36

Dopo l'ispezione del reperto ed i rilievi fotografici dello stesso si è proceduto alle analisi di laboratorio come di seguito riportate.

Va sottolineato che i banconi di lavoro, il piano di appoggio nonché tutte le apparecchiature presenti nel laboratorio ove sono stati visionati i reperti erano stati preliminarmente trattati con soluzione di ipoclorito di sodio al 10%, lavati con acqua ed infine con etanolo al 70%, così come da unanime raccomandazione e consuetudine nei laboratori di biologia molecolare (*Hayatsu H. et al., 1971; Prince A.M., Andrus L., 1992; Schmidt T. et al., 1995; Whiteman M. et al., 1997; Ohnishi S. et al., 2002; Whiteman M. et al., 2002; Kemp B. M., Glenn Smith D., 2005; Frégeau, C.J., 2008; Caragine T. et al., 2008; Toothman M.H. et al., 2008*).

Si dà atto che durante lo svolgimento delle operazioni peritali tutti i presenti indossavano mascherine, camici monouso e guanti monouso.

Tutte le operazioni manuali (dall'apertura dei reperti, alle indagini estemporanee, ai prelievi) sono state eseguite da uno dei periti (Prof. Carla Vecchiotti), con l'ausilio di un collaboratore tecnico, come da autorizzazione della Corte d'Assise e si precisa che durante ogni singola fase si è proceduto alla sostituzione dei guanti monouso.

Sulla base del confronto fotografico con le immagini riportate nella RTIGF e su specifiche indicazioni della Dr.ssa Stefanoni, sono state individuate sul reperto le aree dalla stessa precedentemente esaminate ove eseguire nuove campionature.

Le aree di interesse sono state indicate con le stesse lettere assegnate a suo tempo dalla Dr.ssa Stefanoni.

Pertanto, le aree sull'***impugnatura del coltello*** sono state indicate con le ***lettere A-D-F***, mentre le aree di interesse sulla ***lama*** sono state indicate con le lettere ***B-C-E-G***.

Con l'accordo delle parti sono state eseguite due ulteriori campionature nel ***punto di contatto tra la lama e l'impugnatura***, sui versanti opposti del coltello, ed i prelievi effettuati sono stati indicati con le lettere ***H-I***.

Su ogni singola area di interesse si è proceduto all'esecuzione del test per la **diagnosi generica di sangue.**

L'esame è stato condotto mediante strisce reattive impregnate di dimetil-diidro-perossiesano e di un indicatore colorimetrico (tetrametilbenzidina,) che, in presenza di emoglobina, assumono una colorazione verde-blu ("**Combur Test® E**" Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania; codice prodotto 11896857191, lotto n. 20212701).

L'esecuzione del test prevede che la zona reattiva della striscia venga preliminarmente inumidita con acqua distillata e poi posta a contatto con la superficie da testare effettuando un leggero sfregamento. Entro 60 secondi, in caso di positività, la zona reattiva della striscia assumerà una colorazione verde-blu, mentre eventuali variazioni di colore evidenziate a distanza di due minuti dal test sono prive di significato.

Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Diagnosi generica di sangue:

Traccia **A** = **reazione negativa**

Traccia **B** = **reazione negativa**

Traccia **C** = **reazione negativa**

Traccia **D** = **reazione negativa**

Traccia **E** = **reazione negativa**

Traccia **F** = **reazione negativa**

Traccia **G** = **reazione negativa**

Traccia **H** = **reazione negativa**

Traccia **I** = **reazione negativa**

I risultati ottenuti sono stati rilevati fotograficamente.

Sulle medesime aree venivano, quindi, eseguite campionature mediante tamponi sterili (in confezione singola sigillata ed aperta al momento stesso della campionatura) inumiditi con acqua bidistillata sterile.

Sono state eseguite nove campionature, delle quali sette in corrispondenza delle zone già esaminate dalla Dr.ssa Stefanoni (lettere A-B-C-D-E-F-G) e due in

corrispondenza del punto di contatto - non analizzato dalla Dr.ssa Stefanoni - tra la lama e l'impugnatura del coltello (lettere H-I).

Ogni singolo tampone è stato immediatamente inserito nella rispettiva provetta, sulla quale era apposta la lettera corrispondente alla sede del prelievo.

Si precisa, ancora una volta, che le suddette operazioni sono state eseguite indossando mascherine, camici monouso e guanti monouso i quali venivano regolarmente sostituiti tra una campionatura e l'altra.

Terminate le operazioni di prelievo il coltello veniva avvolto in un foglio di carta bibula, inserito in una busta di carta e collocato all'interno della scatola di cartone originaria nella quale veniva posta, separatamente, la busta di plastica nella quale era originariamente sigillato il reperto. La scatola veniva chiusa mediante nastro adesivo di colore marrone sul quale venivano apposte le firme dei consulenti delle parti e dei periti.

Si procedeva quindi all'ispezione ed alla successiva apertura del Rep.165B.

DESCRIZIONE DEL REP.165B (GANCETTI DI REGGISENO)

Il reperto in esame si presentava alla nostra osservazione chiuso all'interno di una provetta trasparente con tappo rosso, a sua volta contenuta in una bustina sigillata, in plastica trasparente, della Polizia di Stato.

Si sottolinea, inoltre, come da rilievo fotografico, la presenza di molteplici componenti di colorito rosso-scuro sparse all'interno della provetta sia sul fondo che in prossimità del tappo di chiusura.

I gancetti risultano due, entrambi senza l'occhiello di tenuta della controparte, con parti estese di colore rosso-brunastro, altre di colore rossiccio e parzialmente sono evidenziabili elementi biancastri.

Per un gancetto risulta ancora riconoscibile la forma originale, con il caratteristico quadrato su cui viene eseguita la cucitura di tenuta, con la controparte a forma di gancio con bordo finale tondo; l'altro gancetto non presenta più alcun elemento di forma, in quanto completamente deformato tanto da essersi inserito nel primo con cui collassa parzialmente a causa dei processi di ruggine presenti; la separazione dei due elementi comporta la frammentazione di alcune componenti rugginose.

ANALISI DI LABORATORIO SUL REP.165B

Dopo aver effettuato i rilievi fotografici, si procedeva all'apertura della provetta, all'estrazione dei gancetti e all'esecuzione del test per la **diagnosi generica di sangue** su due punti distinti dei reperti indicati, rispettivamente, con le **lettere L e M**.

Il test è stato condotto mediante “**Combur Test[®] E**” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania; codice prodotto 11896857191, lotto n. 20212701), con le modalità precedentemente descritte.

Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Diagnosi generica di sangue:

Traccia **L** = **reazione negativa**

Traccia **M** = **reazione negativa**

I risultati ottenuti sono stati rilevati fotograficamente.

Sulle medesime aree venivano, quindi, eseguite campionature mediante tamponi sterili (in confezione singola sigillata ed aperta al momento stesso della campionatura) inumiditi con acqua bidistillata sterile.

Ogni singolo tampone è stato immediatamente inserito nella rispettiva provetta, sulla quale era apposta la lettera corrispondente alla sede del prelievo.

Le suddette operazioni sono state eseguite indossando mascherine, camici monouso e guanti monouso i quali venivano regolarmente sostituiti tra una campionatura e l'altra.

Terminate le operazioni di prelievo, i gancetti venivano avvolti in un foglio di carta bibula e, unitamente alla provetta trasparente e alla busta di plastica ove erano originariamente sigillati, venivano inseriti in una busta di carta bianca sulla quale è apposta la seguente intestazione "Dipartimento di Medicina Legale-Sapienza Università di Roma". La busta veniva chiusa, da un lato, mediante nastro adesivo di colore marrone sul quale venivano apposte le firme dei consulenti delle parti e dei periti.

Al termine della procedura di campionamento sui reperti, è stato allestito un controllo negativo (denominato "C.N.") mediante un tampone sterile (in confezione singola sigillata ed aperta al momento stesso della campionatura) inumidito con la medesima acqua bidistillata sterile utilizzata per i singoli prelievi sui reperti predetti.

ESTRAZIONE DEL DNA DAL REP.36 (COLTELLO) E DAL REP.165B (GANCETTI DI REGGISENO)

L' estrazione del DNA dai reperti in esame è avvenuta, nella stessa giornata del 22/3/2011, in altro laboratorio adibito alle fasi di estrazione del DNA, fisicamente separato dalle aree di preparazione ed amplificazione di campioni forensi.

Il bancone di lavoro nonché tutte le apparecchiature e lo strumentario di laboratorio erano stati preliminarmente trattati con soluzione di ipoclorito di sodio al 10%, lavati con acqua ed infine con etanolo al 70%, così come da unanime raccomandazione e consuetudine nei laboratori di biologia molecolare.

Venivano preliminarmente preparate, previo trattamento in autoclave, n.ro quattro confezioni sigillate contenenti ciascuna due forbicine e due pinzette in metallo; venivano, altresì, allestiti due contenitori Becker contenenti rispettivamente il primo una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per la disinfezione dello strumentario in uso, e nel secondo acqua bidistillata sterile per il risciacquo dello strumentario prima del successivo uso.

Tutte le operazioni sono state svolte indossando mascherine, camici monouso e guanti monouso i quali venivano regolarmente sostituiti tra una campionatura e l'altra.

Su ogni singolo tampone (n. 12 tamponi totali incluso il negativo di estrazione, denominati con le lettere da A ad M per quanto riguarda i prelievi sui reperti e con la dicitura "C.N." per il controllo negativo) si è proceduto al prelievo di un frammento di tessuto, delle dimensioni di mm. 2x2 circa, per le successive analisi citologiche.

I frammenti di tampone prelevati ai fini delle analisi citologiche sono stati inseriti, separatamente, all'interno di provette da 1,5 mL (ognuna delle quali denominata sul tappo con la lettera corrispondente al relativo campione).

Le provette suddette sono state poste all'interno di una scatola di cartone che veniva chiusa mediante nastro adesivo di colore marrone sul quale erano apposte le firme dei consulenti delle parti e dei periti. La predetta scatola è stata conservata in frigorifero a +4°C fino al momento delle successive indagini di laboratorio.

I tamponi residui sono stati asportati mediante forbicine e pinzette sterili, inseriti, singolarmente, all'interno di provette da 1,5 mL (sul tappo delle quali è stata apposta la lettera corrispondente al relativo campione) e quindi sottoposti alla procedura di estrazione del DNA mediante il kit commerciale denominato *DNA IQ™ System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), progettato specificamente per i laboratori

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.

Alla fine della procedura di estrazione, le 12 provette da 1,5 mL (ognuna delle quali denominata sul tappo con la lettera corrispondente al relativo campione) venivano poste all'interno di una scatola di cartone adeguatamente identificata, sigillata con nastro adesivo di colore marrone sul quale sono state apposte le firme dei consulenti delle parti e dei periti e conservata in frigorifero a +4°C in attesa della procedura di quantificazione del DNA estratto.

Alle ore 18,05 si interrompevano le operazioni peritali che riprendevano il giorno successivo 23/3/2011 alle ore 10,00 come da verbale che si riporta di seguito :

“Il giorno successivo 23/03/2011 alle ore 10,00 erano presenti Dott.ssa Stefanoni, Dott.ssa Gino, Dott. Onofri nonché i periti nominati Prof.ssa Vecchiotti e Prof. Conti; dopo la verifica dell'integrità del nastro adesivo del contenitore degli estratti eseguiti il 22/3/2011, si sono tutti recati presso la sezione di istologia del Dipartimento di afferenza dei Periti nominati. Alla presenza delle parti si è proceduto all'allestimento per una reazione di quantificazione mediante PCR Realtime 7500; al termine della quantificazione si procedeva alla visione dei risultati, che venivano stampati e dati in copia ai consulenti presenti. La dr.ssa Stefanoni fa presente che la reazione di Real Time PCR è stata allestita sul banco di lavoro senza utilizzare cappa aspirante per garantire assenza di contaminazione. La dott.ssa Gino non ha nulla da rilevare. Il dott. Onofri non ha nulla da rilevare. Alle ore 14,15 si chiude il presente verbale”.

QUANTIFICAZIONE DEL DNA PER TECNICA PCR QUANTITATIVA O "REAL-TIME PCR"

Per l'amplificazione dei campioni di DNA e' stata utilizzata la tecnica di PCR quantitativa o "Real-Time PCR" avvalendosi del sistema *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR*. A differenza di una PCR convenzionale dove il prodotto amplificato, o amplicone, viene rilevato dopo che la reazione è terminata mediante osservazione della relativa banda di DNA amplificato su un gel di agarosio, con la tecnica di "Real-Time PCR" e' possibile la misurazione del DNA amplificato man mano che la reazione procede. Questo permette di determinare la quantità di DNA iniziale presente nel campione in esame in modo molto più accurato e con una sensibilità molto alta. La quantizzazione viene effettuata utilizzando una sonda fluorescente che viene impiegata per ottenere una valutazione della quantità di prodotto di PCR presente ad ogni ciclo della reazione. In pratica, l'intensità di segnale fluorescente misurata durante la fase esponenziale della reazione di PCR consente di determinare la quantità di materiale genetico presente all'inizio della reazione. Per l'analisi dei campioni di DNA e' stato utilizzato il prodotto "*Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit*", (prodotto numero 4387746, lotto numero 1101024), acquistato dalla ditta *Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)*. Tale kit permette di identificare simultaneamente la quantità totale di DNA umano e umano maschile in una campione. I risultati ottenuti mediante l'uso di tale kit permettono di valutare se il campione contiene quantità sufficienti per procedere con l'analisi STR (Short Tandem Repeat), e può essere utilizzato per determinare la quantità relativa di DNA maschile e femminile presenti nel campione in esame. Infine, il kit utilizzato in questa analisi contiene uno specifico controllo interno (IPC) che permette di valutare la presenza di eventuali inibitori in grado di compromettere l'esito della PCR stessa. L'IPC si basa sull'impiego di una sequenza di DNA sintetica non presente in natura. Il "*Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit*" e' disegnato e ottimizzato per essere utilizzato con il sistema *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR* equipaggiato con il software *SDS*, in dotazione presso la sezione di Istologia ed Embriologia Medica dell' Università "Sapienza" di Roma. I geni analizzati sono i seguenti: Ribonucleasi P RNA Component H1 (RPPH1), e il gene SRY, rispettivamente utilizzati per amplificare DNA umano e umano maschile.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER REAL-TIME PCR

Prima di procedere all'analisi dei campioni tutte le superfici di lavoro sono state trattate con soluzioni disinfettanti ed antifungine lasciate agire per circa 30 minuti prima di procedere alla pulizia. Inoltre, per limitare al massimo eventuali contaminazioni, è stato utilizzato un apposito supporto (*MicroAmp® Splash Free 96-Well Base, Applied Biosystems*) per impedire il contatto tra la piastra contenente i campioni e le superfici di lavoro.

Il "*Quantifiler Duo DNA Quantification Kit*" utilizzato per l'amplificazione dei campioni di DNA precedentemente estratti include i reagenti necessari per l'amplificazione, identificazione e quantificazione di uno specifico DNA umano e di uno specifico DNA umano maschile, come riportato in precedenza. Tutti i reagenti presenti nel kit sono ottimizzati per essere utilizzati con l'apparecchio Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System dotata di software SDS.

Per ogni campione di DNA e per ogni punto della curva standard è stata preparata una miscela di reazione secondo il seguente schema:

Componente (fornito con il kit)	Quantita' in microlitri (μl)
Quantifiler Duo Primer Mix	10.5
Quantifiler Duo PCR Reaction Mix	12.5
Totale	23.00

Le quantità necessarie di componenti sono state preparate in appositi tubi di polipropilene sterili e 23 μ l di reazione sono stati dispensati in ogni pozzetto di una piastra da 96 per Real-Time (*MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Part number N801-0560, Applied Biosystems*). Successivamente 2 μ l di DNA standard, 2 μ l di DNA da analizzare e 2 μ l di controllo (NTC) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto per ottenere un volume finale di reazione di 25 μ l/campione.

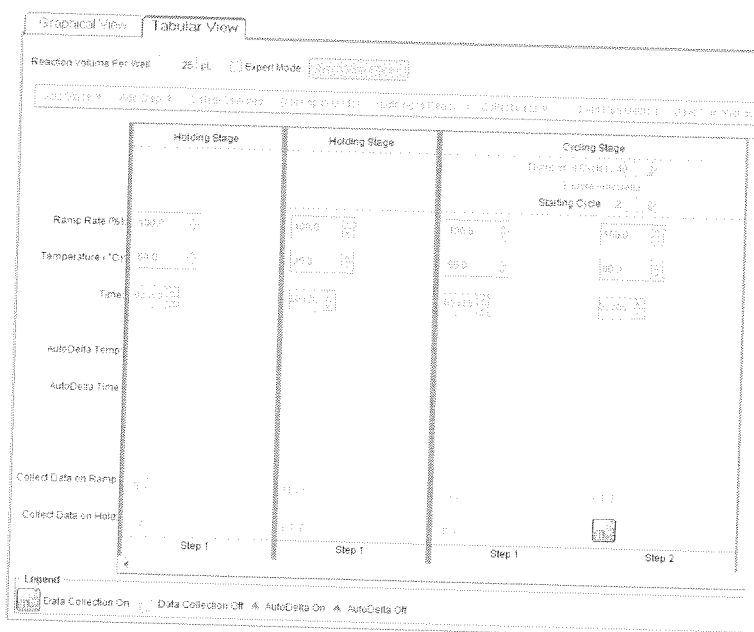
Prima di essere processata la piastra e' stata centrifugata a 300 rpm per circa 30 secondi al fine di rimuovere eventuali bolle d'aria nei pozzetti.

I campioni, caricati sulla piastra da 96 pozzetti, sono stati analizzati secondo il seguente schema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
B	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
C	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
D	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
E	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
F	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
G	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
H	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
I	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
L	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			
M	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard			

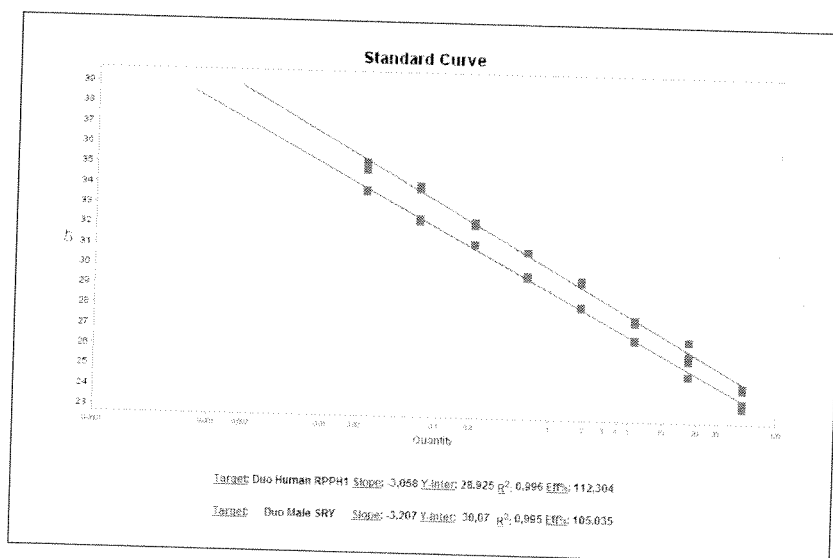
Dove: **S** sta per standard e **U** Unknown. Tutti i campioni di DNA sono stati analizzati in triplicato utilizzando 2 µl di volume per ogni reazione (totale 25 µl) e sono indicati con le lettere da A, B, C, D, E, F, G, H, I, L ed M. NC si riferisce ad un campione di controllo negativo mentre NTC identifica il Non Template Control, cioè il campione di PCR privo di DNA amplificabile. La curva standard e' stata analizzata in duplicato.

I parametri relativi alla PCR sono i seguenti:



Curva standard

La curva standard e' stata costruita mediante 8 concentrazioni note di DNA (fornito con il kit). Le concentrazioni usate vanno da 50 ng/μl (punto 1) fino a 0,023 ng/μl (punto 8). E' stato utilizzato un duplicato per ogni punto di standard.



L'analisi alla fine della corsa, effettuata mediante il software SDS, ha fornito i risultati di seguito riportati.

ANALISI DEI SINGOLI ESTRATTI DI DNA (CAMPIONI A-M)

Per quanto riguarda i campioni A-M l'analisi per real-time PCR rivela una quantità di DNA iniziale molto bassa con una concentrazione di DNA massima misurabile pari a 0,005 ng/μl (5 pg/μl) nel campione "I". Lo schema seguente riporta le misurazioni relative ai singoli campioni esaminati in triplicato. Da notare che dall'analisi condotta sul controllo interno (IPC) non si evidenziano elementi che possono far pensare ad una inibizione della reazione di PCR. Infatti, il valore di Ct relativo all'IPC risulta sempre compreso nell'intervallo tra 28-31, in linea con quanto atteso. In altre parole, dall'analisi effettuata si può escludere la presenza di inibitori della reazione di PCR in grado di compromettere l'amplificazione DNA nei singoli campioni analizzati. **La concentrazione di DNA nella maggior parte dei campioni esaminati è risultata indeterminabile (Undetermined).**

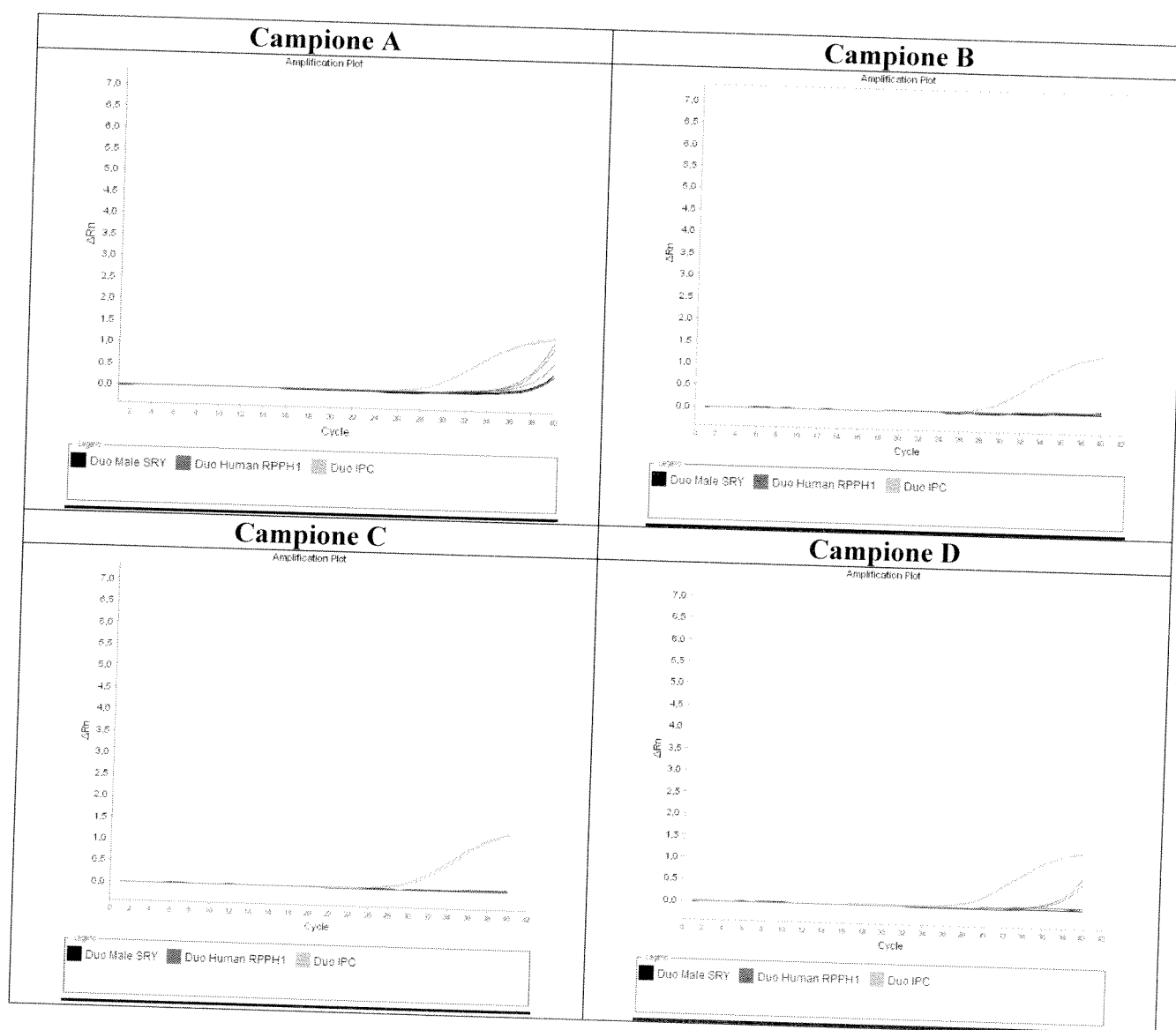
Well	Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity (ng/ul)	Quantity Mean
A1	STANDARD	Duo Human RPPH1	23,610	23,499	0,157	50,00	
A1	STANDARD	Duo IPC	30,108	30,018	0,127		
A1	STANDARD	Duo Male SRY	24,424	24,362	0,088	50,00	
A2	STANDARD	Duo Human RPPH1	23,387	23,499	0,157	50,00	
A2	STANDARD	Duo IPC	29,928	30,018	0,127		
A2	STANDARD	Duo Male SRY	24,299	24,362	0,088	50,00	
B1	STANDARD	Duo Human RPPH1	24,928	25,296	0,520	16,70	
B1	STANDARD	Duo IPC	29,961	29,868	0,131		
B1	STANDARD	Duo Male SRY	25,904	26,258	0,500	16,70	
B2	STANDARD	Duo Human RPPH1	25,663	25,296	0,520	16,70	
B2	STANDARD	Duo IPC	29,775	29,868	0,131		
B2	STANDARD	Duo Male SRY	26,611	26,258	0,500	16,70	
C1	STANDARD	Duo Human RPPH1	26,645	26,627	0,025	5,560	
C1	STANDARD	Duo IPC	29,943	29,931	0,016		
C1	STANDARD	Duo Male SRY	27,653	27,590	0,088	5,560	
C2	STANDARD	Duo Human RPPH1	26,609	26,627	0,025	5,560	
C2	STANDARD	Duo IPC	29,920	29,931	0,016		
C2	STANDARD	Duo Male SRY	27,528	27,590	0,088	5,560	
D1	STANDARD	Duo Human RPPH1	28,236	28,211	0,036	1,850	
D1	STANDARD	Duo IPC	29,733	29,756	0,033		
D1	STANDARD	Duo Male SRY	29,524	29,480	0,063	1,850	
D2	STANDARD	Duo Human RPPH1	28,185	28,211	0,036	1,850	
D2	STANDARD	Duo IPC	29,779	29,756	0,033		
D2	STANDARD	Duo Male SRY	29,435	29,480	0,063	1,850	
E1	STANDARD	Duo Human RPPH1	29,691	29,648	0,061	0,620	

E1	STANDARD	Duo IPC	29,753	29,765	0,017		
E1	STANDARD	Duo Male SRY	30,859	30,861	0,002	0,620	
E2	STANDARD	Duo Human RPPH1	29,604	29,648	0,061	0,620	
E2	STANDARD	Duo IPC	29,777	29,765	0,017		
E2	STANDARD	Duo Male SRY	30,862	30,861	0,002	0,620	
F1	STANDARD	Duo Human RPPH1	31,231	31,233	0,003	0,210	
F1	STANDARD	Duo IPC	29,715	29,721	0,007		
F1	STANDARD	Duo Male SRY	32,178	32,244	0,094	0,210	
F2	STANDARD	Duo Human RPPH1	31,236	31,233	0,003	0,210	
F2	STANDARD	Duo IPC	29,726	29,721	0,007		
F2	STANDARD	Duo Male SRY	32,310	32,244	0,094	0,210	
G1	STANDARD	Duo Human RPPH1	32,437	32,379	0,082	0,068	
G1	STANDARD	Duo IPC	29,669	29,740	0,100		
G1	STANDARD	Duo Male SRY	33,934	33,989	0,078	0,068	
G2	STANDARD	Duo Human RPPH1	32,321	32,379	0,082	0,068	
G2	STANDARD	Duo IPC	29,811	29,740	0,100		
G2	STANDARD	Duo Male SRY	34,044	33,989	0,078	0,068	
H1	STANDARD	Duo Human RPPH1	33,744	33,762	0,026	0,023	
H1	STANDARD	Duo IPC	29,622	29,673	0,073		
H1	STANDARD	Duo Male SRY	34,822	34,997	0,248	0,023	
H2	STANDARD	Duo Human RPPH1	33,781	33,762	0,026	0,023	
H2	STANDARD	Duo IPC	29,725	29,673	0,073		
H2	STANDARD	Duo Male SRY	35,173	34,997	0,248	0,023	
Well	Sample Name	Target Name	Cr	Cr Mean	Cr SD	Quantity (ng/ul)	Quantity Mean
A3	A	Duo Human RPPH1	37,367	36,720	0,588	0,002	0,003
A3	A	Duo IPC	29,716	29,735	0,038		
A3	A	Duo Male SRY	38,885	38,616	0,239	0,002	0,002
A4	A	Duo Human RPPH1	36,219	36,720	0,588	0,004	0,003
A4	A	Duo IPC	29,711	29,735	0,038		
A4	A	Duo Male SRY	38,427	38,616	0,239	0,002	0,002
A5	A	Duo Human RPPH1	36,573	36,720	0,588	0,003	0,003
A5	A	Duo IPC	29,779	29,735	0,038		
A5	A	Duo Male SRY	38,537	38,616	0,239	0,002	0,002
B3	B	Duo Human RPPH1	Undetermined				
B3	B	Duo IPC	29,830	29,767	0,055		
B3	B	Duo Male SRY	Undetermined				
B4	B	Duo Human RPPH1	Undetermined				
B4	B	Duo IPC	29,724	29,767	0,055		
B4	B	Duo Male SRY	Undetermined				
B5	B	Duo Human RPPH1	Undetermined				
B5	B	Duo IPC	29,748	29,767	0,055		
B5	B	Duo Male SRY	Undetermined				
C3	C	Duo Human RPPH1	Undetermined				
C3	C	Duo IPC	31,141	30,790	0,311		

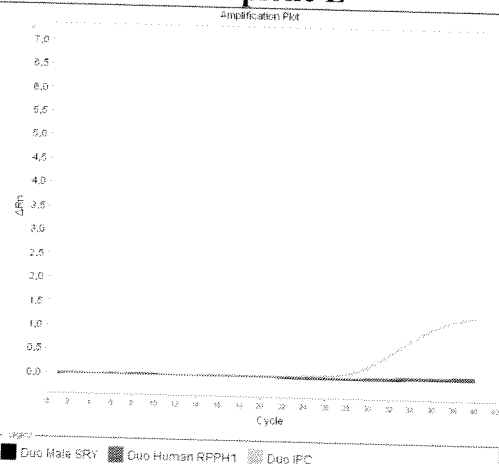
C3	C	Duo Male SRY	Undetermined				
C4	C	Duo Human RPPH1	Undetermined				
C4	C	Duo IPC	30,546	30,790	0,311		
C4	C	Duo Male SRY	Undetermined				
C5	C	Duo Human RPPH1	Undetermined				
C5	C	Duo IPC	30,683	30,790	0,311		
C5	C	Duo Male SRY	Undetermined				
D3	D	Duo Human RPPH1	37,911	37,701	0,298	0,001	0,001
D3	D	Duo IPC	29,867	29,730	0,130		
D3	D	Duo Male SRY	Undetermined				
D4	D	Duo Human RPPH1	Undetermined	37,701	0,298		
D4	D	Duo IPC	29,716	29,730	0,130		
D4	D	Duo Male SRY	Undetermined				
D5	D	Duo Human RPPH1	37,490	37,701	0,298	0,002	0,001
D5	D	Duo IPC	29,607	29,730	0,130		
D5	D	Duo Male SRY	Undetermined				
E3	E	Duo Human RPPH1	Undetermined				
E3	E	Duo IPC	29,822	29,661	0,214		
E3	E	Duo Male SRY	Undetermined				
E4	E	Duo Human RPPH1	Undetermined				
E4	E	Duo IPC	29,743	29,661	0,214		
E4	E	Duo Male SRY	Undetermined				
E5	E	Duo Human RPPH1	Undetermined				
E5	E	Duo IPC	29,419	29,661	0,214		
E5	E	Duo Male SRY	Undetermined				
F3	F	Duo Human RPPH1	Undetermined				
F3	F	Duo IPC	29,741	29,637	0,111		
F3	F	Duo Male SRY	Undetermined				
F4	F	Duo Human RPPH1	Undetermined				
F4	F	Duo IPC	29,520	29,637	0,111		
F4	F	Duo Male SRY	Undetermined				
F5	F	Duo Human RPPH1	Undetermined				
F5	F	Duo IPC	29,649	29,637	0,111		
F5	F	Duo Male SRY	Undetermined				
G3	G	Duo Human RPPH1	Undetermined				
G3	G	Duo IPC	29,644	29,752	0,126		
G3	G	Duo Male SRY	Undetermined				
G4	G	Duo Human RPPH1	Undetermined				
G4	G	Duo IPC	29,890	29,752	0,126		
G4	G	Duo Male SRY	Undetermined				
G5	G	Duo Human RPPH1	Undetermined				
G5	G	Duo IPC	29,723	29,752	0,126		
G5	G	Duo Male SRY	Undetermined				
H3	H	Duo Human RPPH1	37,727	37,727		0,001	0,001

H3	H	Duo IPC	29,775	29,778	0,013		
H3	H	Duo Male SRY	Undetermined				
H4	H	Duo Human RPPH1	Undetermined	37,727			
H4	H	Duo IPC	29,793	29,778	0,013		
H4	H	Duo Male SRY	Undetermined				
H5	H	Duo Human RPPH1	Undetermined	37,727			
H5	H	Duo IPC	29,767	29,778	0,013		
H5	H	Duo Male SRY	Undetermined				
A6	I	Duo Human RPPH1	35,112	36,645	1,784	0,009	0,005
A6	I	Duo IPC	29,810	29,800	0,053		
A6	I	Duo Male SRY	Undetermined	38,616			
A7	I	Duo Human RPPH1	38,603	36,645	1,784	0,001	0,005
A7	I	Duo IPC	29,847	29,800	0,053		
A7	I	Duo Male SRY	Undetermined	38,616			
A8	I	Duo Human RPPH1	36,221	36,645	1,784	0,004	0,005
A8	I	Duo IPC	29,743	29,800	0,053		
A8	I	Duo Male SRY	38,616	38,616		0,002	0,002
B6	L	Duo Human RPPH1	Undetermined				
B6	L	Duo IPC	29,697	29,705	0,043		
B6	L	Duo Male SRY	Undetermined				
B7	L	Duo Human RPPH1	Undetermined				
B7	L	Duo IPC	29,752	29,705	0,043		
B7	L	Duo Male SRY	Undetermined				
B8	L	Duo Human RPPH1	Undetermined				
B8	L	Duo IPC	29,666	29,705	0,043		
B8	L	Duo Male SRY	Undetermined				
C6	M	Duo Human RPPH1	Undetermined				
C6	M	Duo IPC	30,345	30,408	0,056		
C6	M	Duo Male SRY	Undetermined				
C7	M	Duo Human RPPH1	Undetermined				
C7	M	Duo IPC	30,451	30,408	0,056		
C7	M	Duo Male SRY	Undetermined				
C8	M	Duo Human RPPH1	Undetermined				
C8	M	Duo IPC	30,428	30,408	0,056		
C8	M	Duo Male SRY	Undetermined				
D6	CN	Duo Human RPPH1	Undetermined				
D6	CN	Duo IPC	29,456	29,529	0,083		
D6	CN	Duo Male SRY	Undetermined				
D7	CN	Duo Human RPPH1	Undetermined				
D7	CN	Duo IPC	29,511	29,529	0,083		
D7	CN	Duo Male SRY	Undetermined				
D8	CN	Duo Human RPPH1	Undetermined				
D8	CN	Duo IPC	29,620	29,529	0,083		
D8	CN	Duo Male SRY	Undetermined				

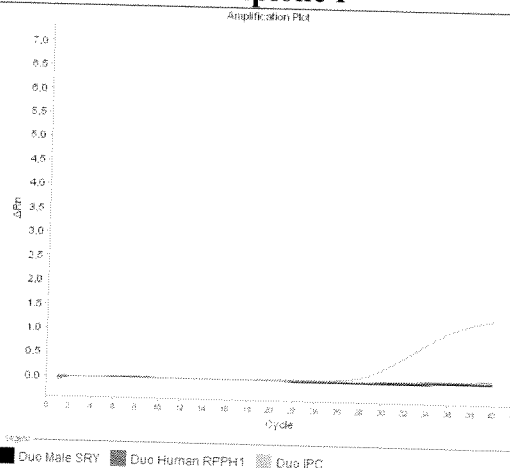
Infine, per ogni campione di DNA (A, B, C, D, E, F G, H, I, L, M, CN ed NTC) si riporta di seguito il tracciato relativo alla reazione di PCR. Ogni tracciato (Male SRY, Human RPPH1 e IPC) consiste di tre curve (triplicato), ognuna delle quali e' stata evidenziata con tre diversi colori come indicato dalle tabelle riportate per ogni tracciato:



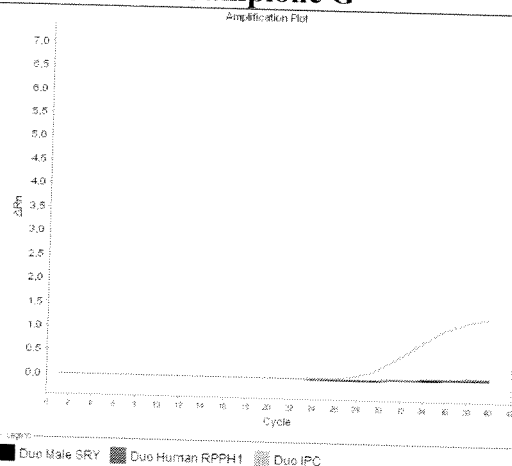
Campione E



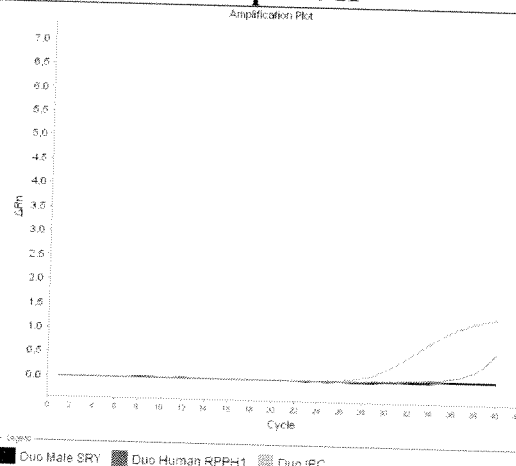
Campione F



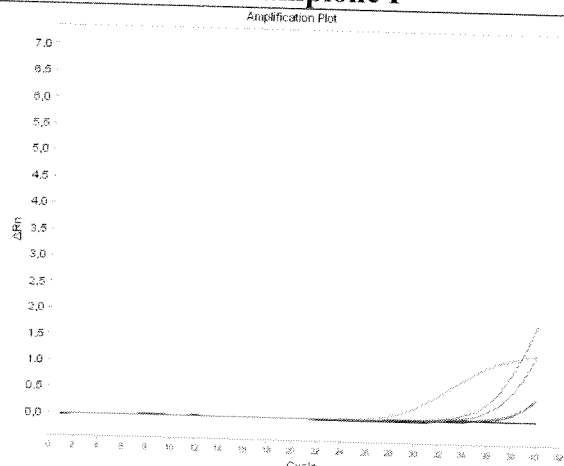
Campione G



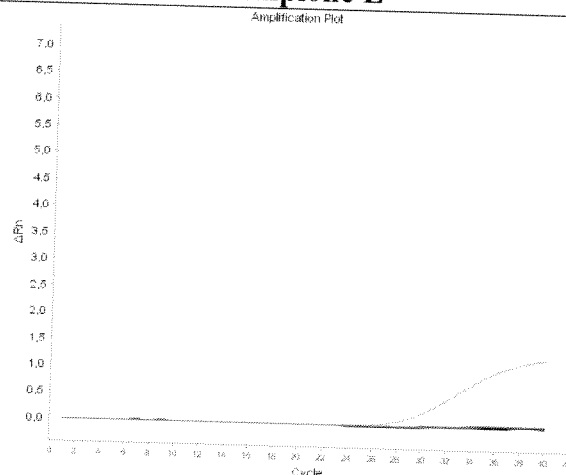
Campione H



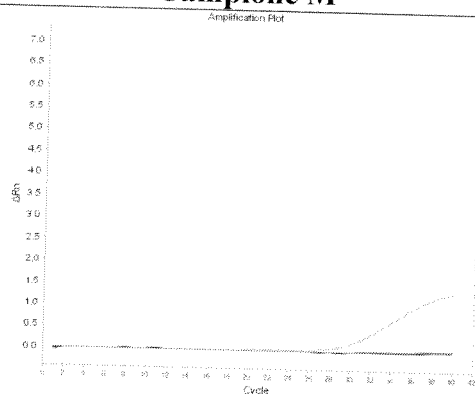
Campione I



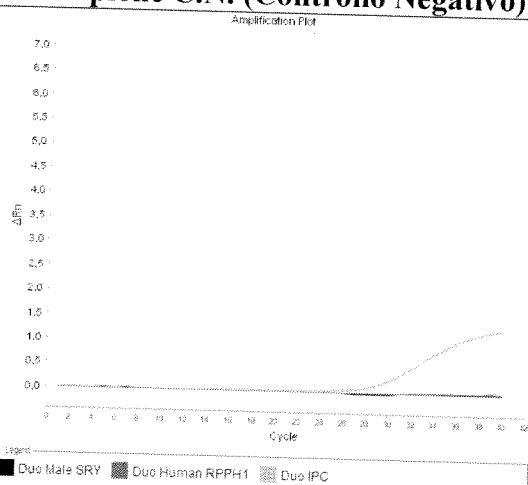
Campione L



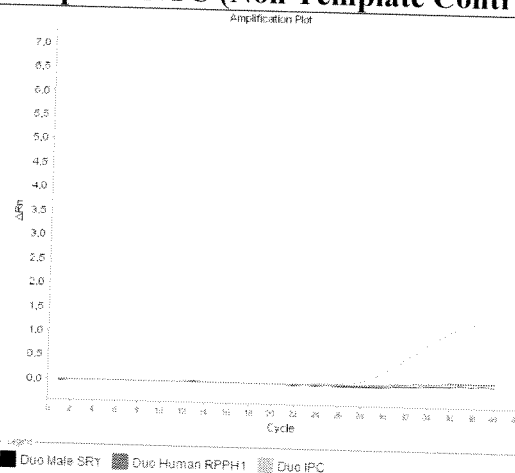
Campione M



Campione C.N. (Controllo Negativo)



Campione NTC (Non Template Control)



ANALISI CITOLOGICHE

Le analisi citologiche sui frammenti di cotone prelevati dalle tamponature eseguite in data 22/03/2011, sono state effettuate, previo avviso alle parti, in data 05/04/2011 presso il Dipartimento di Scienze anatomiche, Istologiche, medico-legali e dell'apparato locomotore–Sezione di Istologia ed Embriologia Medica, dell'Università "Sapienza" di Roma alla presenza dei consulenti delle parti.

In data 5 aprile 2011, venne redatto il seguente verbale:

“Addì 5/4/2011 alle ore 10,10 si è dato inizio alla prosecuzione, presso il Dipartimento di Medicina Legale dell'Università “La Sapienza” di Roma – Viale Regina Elena 336 - Laboratorio di Genetica Forense, così come disposto nell'udienza del 22/1/2011, delle operazioni peritali da parte dei Periti nominati Prof.ssa Carla Vecchiotti e Prof. Stefano Conti, alla presenza dei seguenti Consulenti di parte nominati:

- Dr.ssa Patrizia Stefanoni, consulente per la Procura Generale;
- Prof. Giuseppe Novelli, consulente per la Procura Generale;
- Dr. Emiliano Giardina, consulente per la Procura Generale;
- Prof.ssa Francesca Torricelli, consulente per la parte civile;
- Prof. Adriano Tagliabracci, consulente per Raffaele Sollecito;
- Dott. Valerio Onofri, consulente per Raffaele Sollecito;
- Avv. Donatella Donati, legale di Sollecito Raffaele, che allegava delega dell'Avv. Luca Maori;
- Prof. Carlo Torre, consulente per Amanda M. Knox;
- Dr.ssa Sarah Gino, consulente per Amanda M. Knox;
- Dr. Walter Patumi, consulente per Amanda M. Knox.

Si dà atto che il Prof. Novelli si allontana alle 10,35; successivamente i Periti nominati e i CTP si recano presso la sezione di Istologia del Dipartimento di afferenza dei Periti nominati ove vengono allestiti ed esaminati i vetrini relativi ai reperti del 36 (coltello) e 165b (gancetti). I Periti e i CTP esaminano i risultati al microscopio e concordano di eseguire rilievo fotografico sul reperto contrassegnato con la lettera H (bordo attacco manico-lama). Il Prof. Tagliabracci e il Dott. Onofri chiedono che i periti procedano a richiedere i raw data (files elettronici generati dallo strumento) relativi alla quantizzazione e all'analisi elettroforetica relativamente ai reperti 165B (gancetto) e 36

(coltello). Anche la dott.ssa Gino, il dott. Patumi e il Prof Torre si associano alla richiesta. Si chiude il presente verbale alle ore 13,50”.

CITOCENTRIFUGAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DI ELEMENTI CELLULARI

Constatata l'integrità del nastro adesivo, posto intorno alla scatola contenente le provette nelle quali erano stati inseriti i frammenti delle tamponature eseguite in data 22/03/2011, si procedeva alle ulteriori indagini di laboratorio.

Le analisi per la determinazione di elementi cellulari sono state effettuate mediante la tecnica di citocentrifugazione per mezzo dell'apparecchiatura *Cytospin 3* prodotta dalla ditta *Shandon*. La citocentrifuga è uno strumento che impiega la forza centrifuga per isolare e preparare un monostrato cellulare su appositi vetrini e, allo stesso tempo, è in grado di preservare l'integrità cellulare. Da ciascuna campionatura destinata all'estrazione del DNA era stato prelevato un piccolo frammento di cotone sul quale sono state eseguite analisi al fine di determinare l'eventuale presenza di elementi cellulari.

Prima di procedere all'analisi dei campioni tutte le superfici di lavoro sono state trattate con soluzioni disinfettanti ed antifungine lasciate agire per circa 30 minuti prima di procedere alla pulizia. Inoltre, per limitare al massimo eventuali contaminazioni, è stato utilizzato un apposito supporto per impedire il contatto tra la piastra contenente i campioni con le superfici di lavoro.

Tutte le operazioni sono state eseguite utilizzando guanti monouso i quali venivano regolarmente sostituiti tra una campionatura e l'altra.

Ogni campione è stato lavato mediante ripetute pipettature in un volume di 90 µl di tampone di estrazione. L'intero volume è stato quindi caricato su porta campioni ad imbuto monouso, sterile, da citocentrifuga e sottoposto a sedimentazione utilizzando i seguenti parametri: tempo 5 minuti, velocità 800 giri minuto (rpm), accelerazione media. L'intera operazione è stata condotta a temperatura ambiente.

Dopo la citocentrifugazione i campioni sono stati osservati immediatamente al microscopio ottico per valutare la presenza di materiale depositato sul vetrino.

In data 30 maggio 2011, alle ore 11,30, previo avviso alle parti, presso la Sezione di Istologia ed Embriologia Medica dell'Università "Sapienza" di Roma, si procedeva alla colorazione dei vetrini dei citocentrifugati, ottenuti in data 5 aprile 2011, ed all'acquisizione delle immagini dei vetrini stessi.

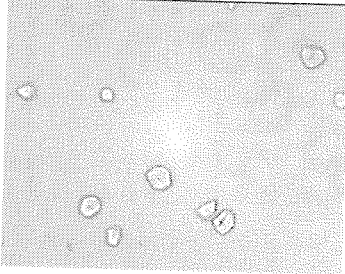
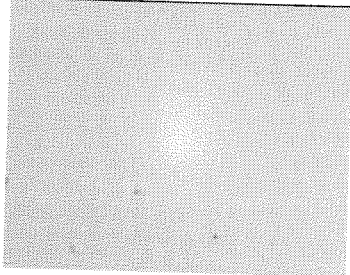
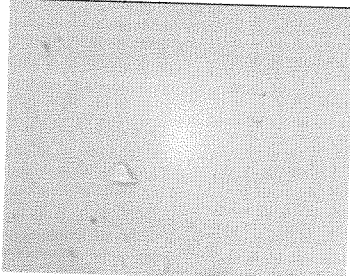
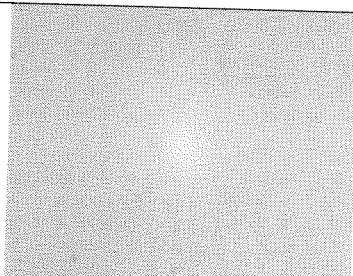
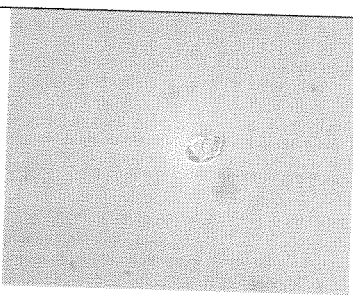
In tale data non era presente alcun consulente di parte.

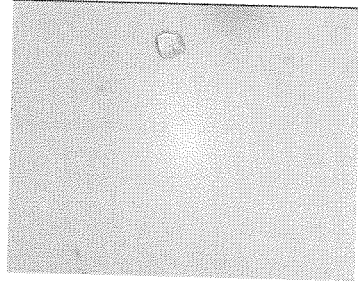
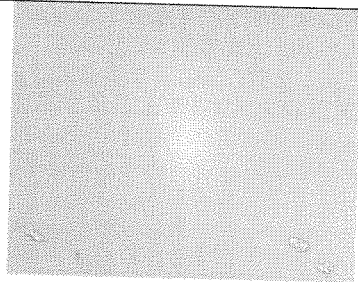
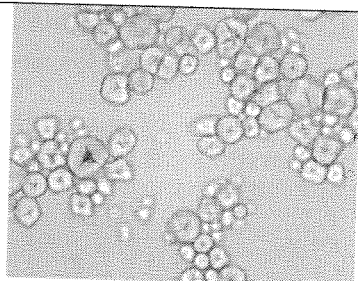
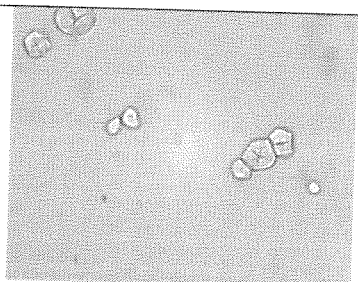
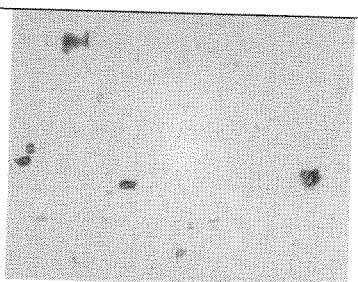
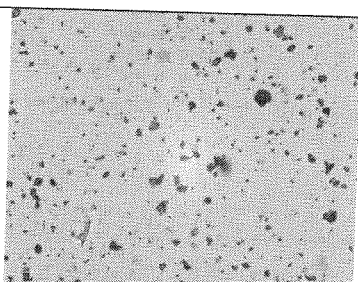
Veniva redatto il seguente verbale: " Si dà atto che nessuno dei CTP nominati, e regolarmente informati della prosecuzione operazioni peritali, risulta essere presente, conseguentemente i Periti nominati hanno espletato quanto comunicato (rilievi fotografici sui citocentrifugati). Il presente verbale viene chiuso alle ore 13,30".

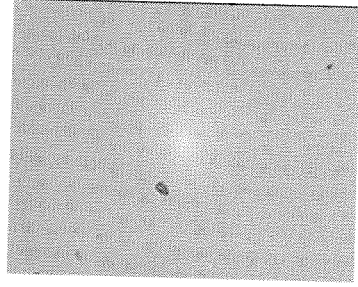
Al fine di determinare la presenza di eventuali elementi cellulari, ogni campione è stato sottoposto a colorazione con ematossilina (*Hematoxylin, Vector Laboratories, CA. Cat. H-3401*). L'ematossilina è un comune colorante basico generalmente utilizzato per mettere in risalto strutture cellulari acide come il reticolo endoplasmatico e gli acidi nucleici contenuti nel nucleo cellulare. Le strutture colorate con ematossilina risultano di colore blu.

L'eccesso di colorante è stato rimosso con acqua e ogni campione è stato analizzato al microscopio ottico con un ingrandimento 20X. A questo scopo è stato utilizzato un microscopio *ZEISS Axioskop 2 plus* ed i vetrini sono stati fotografati singolarmente.

Nella tabella successiva sono riportate la descrizione e le immagini del materiale presente nei singoli vetrini.

Campione	Osservazioni	
A	Il campione presenta diversi detriti di natura inorganica. Sono evidenti granuli con morfologia circolare/esagonale con una struttura centrale a raggiera e/o lineare. Non sono presenti elementi di natura cellulare.	
B	Il campione presenta detriti di natura inorganica. Non risultano presenti elementi di natura cellulare.	
C	Il campione presenta diversi detriti di natura inorganica. Non sono presenti elementi di natura cellulare.	
D	Il campione presenta diversi detriti di natura inorganica. Non sono presenti elementi di natura cellulare.	
E	Il campione presenta qualche detrito e cristalli inorganici. Sono presenti rarissimi granuli con morfologia circolare/esagonale e struttura centrale lineare. Non risultano evidenti elementi cellulari.	

F	Il campione presenta detriti e rarissimi granuli con morfologia circolare/esagonale con struttura centrale a raggiera. Non sono presenti elementi cellulari.	
G	Il campione presenta detriti di natura inorganica. Non sono presenti elementi cellulari.	
H	Il campione presenta all'osservazione numerosi granuli con morfologia circolare/esagonale con struttura centrale a raggiera identiche a quelle già osservate in altri campioni. Il campione H mostra però un numero decisamente più elevato di queste strutture rispetto ai campioni già osservati. Non sono presenti elementi cellulari.	
I	Il campione presenta diversi detriti di natura inorganica. Sono presenti alcuni granuli con struttura centrale a raggiera identiche a quelle già osservate nei precedenti campioni. Non sono presenti elementi cellulari.	
L	Il campione presenta alcuni precipitati di colore intenso ma di natura certamente non cellulare. Probabili precipitati ossidati.	
M	Il campione M risulta all'osservazione molto simile al campione L. La densità dei frammenti risulta decisamente più alta. Non sono evidenti granuli. Non sono presenti elementi cellulari.	

C.N.	Il campione presenta rari detriti di natura inorganica.	
------	---	--

L'esame fotografico e l'analisi di varie immagini presenti in letteratura hanno permesso di stabilire che le strutture presenti in alcuni vetrini (granuli con morfologia circolare/esagonale con struttura centrale a raggiera) presentano una morfologia riconducibile a quella di granuli di amido, un carboidrato polisaccaridico di natura vegetale. Il campione che presenta la concentrazione maggiore di queste strutture è il campione H. Mediante l'analisi microscopica e' stato, inoltre, possibile determinare che le dimensioni dei singoli granuli sono comprese tra 3-10 μm circa.

CONCLUSIONI

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.

Prima di affrontare la seconda parte del quesito postoci riteniamo opportuno riportare alcuni cenni relativi alla metodologia medico-legale applicata a fini investigativi, metodologia che si compendia nei seguenti passaggi: 1) definire la scena del crimine 2) ricostruire le modalità del fatto 3) raccogliere gli elementi utili ai fini identificativi 4) invio dei reperti in laboratorio per le analisi di competenza.

CENNI SULLE TECNICHE DI SOPRALLUOGO E DI REPERTAZIONE

Si ritiene opportuno, innanzitutto, premettere quanto viene riportato nelle Tecniche Investigative della Scena del Crimine di Barry Fischer (*Techniques of Crime Scene Investigation*, Barry Fischer – CRC ed. 2003) relativamente al corretto approccio alla scena di un delitto da parte del personale generico non qualificato (*Golden Rules*) su cosa fare e cosa non fare sulla scena del crimine (*Crime scene Do and Don'ts*), al fine di evitare errori grossolani e ridurre il rischio di contaminazione.

Il punto di partenza è sempre il *Principio di Locard* secondo cui due corpi che entrano in contatto scambiano reciprocamente del materiale sotto forme diverse.

Parallelamente lo stesso principio sostiene scientificamente la possibilità di contaminazioni e di alterazioni da parte di chiunque altro, investigatori compresi, entri in contatto con la scena.

COSA FARE

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

COSA NON FARE

- Permettere o effettuare un accesso indiscriminato soprattutto senza verbalizzare;
- Modificare lo stato dei luoghi;
- Muoversi senza precauzioni (DPI e procedure di spostamento);
- Non documentare gli accessi;

- Confidare che altri annoteranno le condizioni originarie.

Si sottolinea come sia di enorme importanza la figura del Coordinatore (*Crime Scene Manager*) che ha il compito di assicurare, specie nei delitti complessi, il corretto svolgimento delle operazioni di rilievo e di documentazione da parte dei vari componenti la squadra ed è in grado di gestire la situazione emergenziale attraverso un corretto flusso di procedure prestabilite (*Crime Scene Management: scene specific methods*, R. Sutton Wile, ed. 2009).

In questa ottica si inseriscono, quindi, anche le corrette procedure di delimitazione della scena del crimine adottando, conseguentemente, diversi livelli di contenimento al fine di evitare possibili condizioni che possano comportare alterazioni delle prove, ivi compresa la contaminazione.

Determinante quindi delimitare un'area più esterna, intesa come perimetro di contenimento, cui si succedono, all'interno, un'area di contenimento secondario e poi primario, sino al luogo della scena del crimine (*Crime Scene*) (*Increasing Crime Scene Integrity by Creating Multiple Security Levels*, Greg Dagnan, *Criminal Justice Missouri Southern State*, 2006).

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 (*Protecting the Crime Scene*, G. Schiro – *Louisiana State Police Crime Laboratory*).

Estremamente dirimenti risultano le Linee Guida dell' U.S. *Department of Justice* – *Office of Justice Programs*, *Crime Scene Investigation – A guide for Law Enforcement*, January 2000:

2. Controllo della contaminazione:

- Il controllo della contaminazione e la prevenzione della cross-contaminazione in un'unica o in molteplici scene è essenziale per mantenere la sicurezza del personale e l'integrità delle prove;
- Limitare gli accessi alla scena;
- Seguire le vie stabilite di entrata ed uscita dalla scena;

- Designare un'area di sicurezza per rifiuti e le apparecchiature;
- Usare equipaggiamento protettivo personale (PPE) per prevenire la contaminazione del personale e per minimizzare la contaminazione della scena;
- Pulire/Sterilizzare o gettare strumenti/apparecchiature ed equipaggiamento protettivo personale tra la repertazione delle prove e/o tra i vari ambienti delle scene;
- Utilizzare equipaggiamento mono-uso quando si sta procedendo direttamente alla repertazione di campioni biologici;
- Mantenere la sicurezza dei luoghi durante tutta la procedura fino all'allontanamento definitivo dalla scena del crimine;
- Chiudere i reperti al fine di evitare contaminazione e cross-contaminazione;
- Mantenere le prove sulla scena in modo appropriato al fine di evitarne la degradazione o perdita.

Ed ancora, l'aggiornamento delle suddette *Linee Guida dell' U.S. Department of Justice, Crime Scene Investigation: a Reference for Law Enforcement Training, June 2004*, evidenzia protocolli/procedure ancor più restrittive:

- Designare area/aree separate per i rifiuti prodotti nel corso dell'investigazione sulla scena;
- Stabilire area/aree come ubicazione per le apparecchiature;
- Nominare un responsabile per la rimozione dei rifiuti;
- Utilizzare PPE (equipaggiamento protettivo personale) specifico;
- Eliminare il PPE nei contenitori specifici per il rischio biologico;
- Utilizzare attrezzature/equipaggiamento pulite o monouso;
- Gettare attrezzature/equipaggiamento monouso nei contenitori per il rischio biologico o nel contenitore specifico dopo l'uso;
- Pulire lo strumentario riusabile prima della repertazione di ciascuna nuova traccia.

Il manuale *Handbook of Forensic Services* per il *Laboratory Division del Federal Bureau of Investigation (2007)* riporta quanto segue, relativamente ai protocolli di repertazione, chiusura e conservazione delle tracce di DNA:

- Se la prova del DNA non è adeguatamente documentata, la sua origine può essere contestata;

- Se la traccia non è adeguatamente repertata può essere persa l'attività biologica;
- Se non correttamente sigillata può verificarsi contaminazione;
- Se non correttamente conservata possono verificarsi decomposizione e deterioramento.

Sangue su superfici

- Assorbire la sospetta traccia ematica su un tampone di cotone pulito. Asciugare il tampone e sigillare in carta pulita o in una busta con angoli sigillati. Non usare contenitori di plastica.

Tracce di sangue

- Asciugare gli indumenti con le sospette tracce di sangue. Avvolgere gli indumenti con le tracce di sangue asciugate in carta pulita. Non mettere indumenti umidi o asciutti in plastica o contenitori ermetici. Porre tutti i detriti o i residui degli indumenti in carta pulita o in una busta con angoli sigillati;
- Assorbire le tracce di sangue asciutte presenti su oggetti non amovibili su tampone di cotone inumidito con acqua distillata. Asciugare il tampone e chiuderlo in carta pulita o in una busta con angoli sigillati. Non usare contenitori di plastica.

Conservazione tracce di DNA

- Conservare in frigorifero, congelatore (se asciutto), a temperatura ambiente, lontano da luce e umidità.

Queste raccomandazioni su procedure e protocolli relative all'attività di repertazione sono assunte e chiaramente riportate in tutti i manuali investigativi:

- ***Evidence Field Manual***, *Office of Forensic Sciences, New Jersey State Police*, Rel 1/08:... "Tracce biologiche ... Sangue Asciugare scrupolosamente le tracce e chiudere in un contenitore di carta sigillato, busta di carta o avvolgerlo in carta pulita ... Non usare contenitori di plastica e graffette... Coltelli con tracce di sangue (idem)... tracce di saliva ... (idem) ... Tamponi sottoungueali ... inumidire il tampone con acqua distillata e tamponare sotto le unghie (un tampone per ciascuna mano). Asciugare all'aria, sigillare, etichettare ed inviare al laboratorio.

- *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 repertazione, 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 repertate 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 repertati 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

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 Criminali di Stato (7th Edition):

- "... bisogna assicurarsi che la traccia non sia alterata o contaminata tra il tempo della repertazione e il tempo dell'esame...
- tracce per l'esame del DNA devono ***sempre essere chiuse in carta*** o in un cartone, anche se appaiono asciutte..."

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

testa del tampone... *tracce asciutte.....*: usare il tampone leggermente inumidito per prelevare il materiale per il DNA concentrando la traccia nella più piccola area possibile.... In tutte le circostanze, è rilevante anche prendere un campione di controllo ... Se in qualsiasi fase durante il campionamento il campione è caduto o entrato in contatto con qualsiasi superficie, idealmente la procedura deve essere fermata e utilizzato un nuovo kit DNA usa e getta... raccogliere indumenti e guanti e gettarli nei contenitori appositi...

Linee-guida anticontaminazione:

- A causa della sensibilità delle attuali tecniche per il DNA estrema cautela, come indossare una mascherina, deve essere adottata se la persona che sta effettuando il campionamento ha una condizione medica che causa la perdita di fluidi corporei o particelle come nel caso di raffreddore, tosse o influenza. Altre condizioni come l'eczema possono richiedere l'adozione di indumenti aggiuntivi;
- tutti i contenitori usati per il trasporto devono essere puliti prima e dopo l'uso o, se possibile, non riutilizzati;
- l'area di lavoro degli addetti alla scena del crimine deve essere pulita regolarmente con salviette contenenti chlorohexadine;
- ovunque sia possibile la presenza di DNA, deve essere usato materiale usa e getta;
- guanti usa e getta devono essere sempre indossati sopra il polsino e devono essere cambiati per ciascun reperto /campione. E' necessario cambiare i guanti durante il prelievo di differenti reperti ...;
- ove possibile, avvicinare il contenitore verso il reperto e non il reperto verso il contenitore....;
- il contatto tra la vittima ed i campioni sospetti dovrebbe essere evitato in qualunque momento;
- la manipolazione degli oggetti deve essere ridotta al minimo possibile, e gli oggetti non dovrebbero essere riaperti neppure a fini di interrogatorio
- assicurarsi che ogni persona sulla scena del crimine non abbia contatti con il sospettato e con i suoi indumenti
- molteplici sospettati, la vittima ed i loro indumenti devono essere tenuti separati in ogni momento e non dovrebbero venire in contatto con gli stessi oggetti ”.

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).

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".

Ed ancora, sempre dall'*ENFSI*, nel documento *European Crime Scene Management Good Practice Manual*, di cui fanno parte il Servizio Polizia Scientifica di Roma ed i Carabinieri di Roma, si evidenziano precise indicazioni operative, ed in particolare:

- "...è essenziale che tutti gli agenti siano consci dell'importanza della preservazione della scena;
- evitare la tentazione di esaminare. Considerare e registrare tutti i rischi di contaminazione. Prendere nota dei nomi di tutte le persone sulla scena;
- proteggere la scena: identificare l'estensione della scena e delimitarla. Prevenire l'accesso di altre persone;
- migliorare le delimitazioni più appropriate. E' meglio che i cordoni delimitino un'area più ampia piuttosto che ristretta - potranno sempre essere ridotti più tardi;
- proteggere la scena;
- stabilire un punto di rendezvous all'esterno delle delimitazioni;
- concreti ed efficienti canali di comunicazione tra gli esaminatori della scena e il team di investigazione sono essenziali in ogni caso;
- Crime Scene Manager: Assicurarsi che tutte le persone che entrano nella scena indossino abiti protettivi, sovrascarpe, maschere e guanti;
- fornire consigli e assicurazioni sulla qualità su tutte le questioni scientifiche inclusa la conservazione e la repertazione delle prove e l'abbandono della scena;
- Contaminazione: È essenziale che vengano seguiti tutti gli step per assicurare che non ci sia contaminazione delle prove raccolte. Nel caso venga riscontrata contaminazione, i risultati di qualunque analisi scientifica potrebbero essere invalidati. La protezione dalla contaminazione dovrebbe sempre iniziare sulla scena del crimine e continuare fino a che il campione non venga depositato presso il Laboratorio di Scienze Forensi;
- è essenziale che ciascuna azione eseguita per la raccolta delle prove sia documentata.

CENNI SULLE INDAGINI DI LABORATORIO A FINI FORENSI

Una volta giunte in laboratorio le tracce repertate in sede di sopralluogo vengono sottoposte ad una serie di indagini secondo un protocollo standardizzato nei laboratori forensi e che può compendiarsi nei passaggi di seguito illustrati.

- Al fine di stabilire la presunta natura biologica di tracce prelevate in sede di sopralluogo o presenti sui reperti in esame vengono eseguiti *test orientativi*, che consentono di formulare una **diagnosi generica** del presunto materiale biologico (ad es. sangue, liquido seminale, saliva, ecc.), test che tuttavia devono essere confermati da altre metodiche, dette di certezza, atte a stabilire la natura del materiale in esame. Le reazioni di orientamento per la **diagnosi generica di sangue** si basano sulle proprietà che hanno alcune sostanze incolori allo stato ridotto (leucobasi) di assumere un determinato colore, per ossidazione, in presenza di un perossido (ad es. H_2O_2) e di una perossidasi (ad es. emoglobina). Di uso corrente la *reazione di Adler* che consiste nel saggiare la traccia in esame con una soluzione satura di benzidina in acido acetico ed alla successiva aggiunta di gocce di H_2O_2 . In presenza di sangue si verifica un rapido viraggio della soluzione verso il blu. Recentemente sono state introdotte nella pratica di laboratorio delle strisce reattive (*Combur Test*[®]) impregnate di idroperossido organico e di tetrametilbenzidina come indicatore colorimetrico che, in presenza di emoglobina che ne determina l'ossidazione, vira dal giallo al verde-blu. Il test è di rapida e facile esecuzione e la sensibilità varia, a seconda degli Autori da 1:300.000 a 1:500.000. Sono note false positività dovute alla presenza di ossidanti (metalli tipo rame, ferro), perossidasi vegetali o animali ecc. e false negatività causate dall'inibizione dell'azione dell'emoglobina da parte di forti sostanze riducenti (cianuri).

Qualora le tracce non siano evidenti ad occhio nudo (ad es. se presenti su substrato scuro) si può utilizzare il test al *Luminol* (composto da una soluzione alcalina di luminol, sodio carbonato e sodio perborato) La soluzione viene nebulizzata sul substrato e la reazione con l'emoglobina produce una chemiluminescenza visibile per pochi secondi. Anche con tale test si possono avere risultati falsamente positivi se sono presenti perossidasi non ematiche.

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

reattiva sulla quale sono immobilizzati anticorpi anti-emoglobina umana: se è presente sangue umano il complesso emoglobina-anticorpo concentrerà le particelle di cromogeno su una linea che apparirà di colore blu. La presenza di un controllo positivo permetterà di verificare la correttezza della reazione.

Per la diagnosi di **liquido seminale** ci si avvale di sorgenti luminose che consentono la visualizzazione di una luce bianco-azzurra (cosiddetta lunare) in presenza di liquido seminale.

Tra i più diffusi test per la **diagnosi generica e di specie** di liquido seminale ricordiamo i metodi immunocromatografici di rapida e facile esecuzione che consentono di rilevare la presenza di due dei maggiori componenti dello sperma umano: l'Antigene Prostatico Specifico (*PSA*) e la Semenogelina (*Sg*). A questi si aggiunge, ovviamente, l'osservazione al microscopio degli spermatozoi se presenti, previa idonea colorazione degli stessi.

Per la diagnosi di **saliva** si utilizzano test immunocromatografici con anticorpi monoclonali anti alfa-amilasi umana, enzima presente in grande quantità nella saliva

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

A tal fine le indagini sono rivolte alla ricerca del profilo genetico mediante lo studio del DNA.

- **Diagnosi individuale** mediante studio del **DNA**: Le cellule del corpo umano possiedono una struttura costituita da una membrana, il citoplasma con gli organelli ad esso associati, ed il nucleo. All'interno del nucleo è localizzato il materiale genetico della cellula (DNA), complessato con proteine e organizzato in strutture lineari chiamate cromosomi. Il genoma umano è quindi costituito da due tipologie di materiale genetico: il DNA nucleare (rappresentato da 23 coppie di cromosomi, di cui 22 coppie di autosomi e 1 coppia di cromosomi sessuali) e il DNA mitocondriale. Il DNA nucleare (*deoxyribonucleic acid*) contiene tutte le informazioni necessarie per costruire, far funzionare e mantenere un organismo, oltre che a trasmettere la vita da una generazione all'altra. Esso è rappresentato da una macromolecola costituita da sub unità dette nucleotidi, ognuna delle quali è costituita da uno zucchero a cinque atomi di carbonio, il desossiribosio, cui sono legati una base azotata (adenina, guanina, timina, citosina) ed un gruppo fosfato. Le caratteristiche di un individuo trasmesse da una generazione

all'altra sono sotto il controllo di tratti di DNA chiamati *geni*. La costituzione genetica di un organismo è definita *genotipo*, mentre il *fenotipo* è la manifestazione fisica dei caratteri genetici. La posizione sul cromosoma di un particolare gene viene definita *locus*. I geni possono esistere in forme alternative, chiamate *alleli*, che possono dare luogo all'espressione di caratteristiche diverse. L'organismo che ha ereditato due alleli identici dai genitori (per ogni specifico locus viene ereditato un allele di provenienza paterna ed uno di provenienza materna) è definito *omozigote*, mentre quello che possiede due alleli diversi l'uno dall'altro è definito *eterozigote*. Si ritiene che il genoma umano contenga solo 20.000-25.000 geni e solo l'1,5% del genoma è direttamente coinvolto nella codifica delle proteine. Il 75% circa del genoma è definito extragenico e più del 50% di questo è composto da DNA ripetitivo, di cui il 45% è costituito da sequenze ripetute sparse e il resto da sequenze di DNA ripetute in tandem (Lander et al., 2001; Li, 2001): sono queste ultime, rappresentate dai *satelliti*, *minisatelliti* e *microsatelliti*, a rappresentare le regioni del genoma più utilizzate nell'identificazione personale. Alla fine degli anni '80, nello stesso periodo in cui venivano scoperti i minisatelliti, venivano descritti i microsatelliti – meglio conosciuti come *Short Tandem Repeats* o STRs, i quali hanno una sequenza ripetuta da 2 a 7 bp e rappresentano ad oggi la tecnica più usata in ambito forense. Ripetizioni tetrameriche (unità ripetute di quattro basi) sono state combinate nei cosiddetti *multiplex* fino ad ottenere un numero di sedici loci amplificati simultaneamente in una singola reazione di PCR. Le regioni STR sono altamente polimorfiche e quindi in grado di fornire un elevatissimo potere di discriminazione (Butler, 2005). Nel 1997, il laboratorio del Federal Bureau of Investigation (FBI) ha proposto di stabilire un gruppo di loci STR da usare nell'ambito di un database del DNA a livello nazionale noto come *CODIS* (Combined DNA Index System) (Budowle, 1999). I tredici loci CODIS comprendono: *CSF1PO*, *FGA*, *TH01*, *TPOX*, *VWA*, *D3S1358*, *D5S818*, *D7S820*, *D8S1179*, *D13S317*, *D16S539*, *D18S51* e *D21S11*. Un profilo del DNA ottenuto con l'analisi dei tredici loci STR fornisce una *random match probability* media pari a circa uno su un trilione nell'ambito di individui scelti a caso nella popolazione (Butler, 2005). Questi loci sono riconosciuti a livello statunitense come lo standard ai fini dell'identificazione umana.

Per quanto riguarda l'Europa invece, nell'*Official Journal of the European Union* del 5.12.2009 viene stabilito che nell'ambito dell'analisi forense del DNA, gli Stati Membri dell'Unione Europea sono invitati ad utilizzare almeno i markers indicati nel relativo allegato, i quali formano l'*European Standard Set (ESS)*, al fine di facilitare lo scambio dei risultati delle analisi del DNA tra i laboratori degli Stati Membri. L'*European Standard Set* comprende i seguenti markers: *D3S1358*, *VWA*, *D8S1179*, *D21S11*, *D18S51*, *HUMTH01*, *FGA*, *D1S1656*, *D2S441*, *D10S1248*, *D12S391* e *D22S1045*.

- **Estrazione del DNA:** un campione biologico (ad esempio sangue, saliva, liquido seminale, ecc.) prelevato dalla scena del crimine, così come anche un prelievo di sangue o di saliva eseguito nei confronti di un sospettato o per un caso di paternità, contiene molte sostanze oltre al DNA che, quindi, dovrà essere separato dal restante materiale cellulare prima di poter essere esaminato. Le proteine cellulari che circondano e proteggono il DNA nell'ambiente cellulare possono, infatti, inibire la capacità di analizzare il DNA. Sono state sviluppate numerose tecniche di estrazione al fine di purificare le molecole di DNA dalle proteine e da altri materiali cellulari ma i principi fondamentali di tali tecniche possono essere riassunti in tre fasi principali: 1) frammentazione e lisi delle membrane cellulari per permettere la liberazione degli acidi nucleici; 2) denaturazione delle proteine; 3) separazione del DNA dalle proteine e rimozione dei contaminanti.

La specifica metodica di estrazione applicata caso per caso dipende dal tipo di campione biologico da esaminare; ad esempio, il sangue intero deve essere trattato diversamente rispetto ad una traccia ematica o ad un frammento osseo. L'estrazione organica in *fenolo-cloroformio* è stata la metodica di estrazione maggiormente usata in passato ed è caratterizzata dall'utilizzo, attraverso passaggi successivi, di diverse sostanze chimiche. Se è vero che questa metodica funziona bene per DNA ad alto peso molecolare, richiede però tempi lunghi e l'utilizzo di sostanze chimiche tossiche, nonché la necessità di trasferire il campione attraverso diverse provette aumentando quindi il rischio di errore e di contaminazione. L'estrazione con resina **Chelex[®]100** ha la caratteristica di essere molto più rapida rispetto alla tecnica organica, prevede solo pochi passaggi all'interno di una sola provetta e, pertanto, offre minori possibilità di contaminazione all'interno del laboratorio. Introdotta nella comunità forense del DNA nel 1991, il Chelex[®]100 (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*) è una resina a scambio ionico che viene aggiunta come sospensione (solitamente al 5%) ai campioni da

esaminare (Walsh et al., 1991). I campioni vengono, quindi, sottoposti a bollitura per alcuni minuti al fine di rompere le cellule e rilasciare il DNA. Il Chelex[®] denatura il DNA a doppio filamento liberando quindi DNA a singolo filamento. **Metodiche di estrazione del DNA in fase solida** sono state sviluppate negli ultimi anni al fine di consentire estrazioni di DNA ad alta resa. Una tecnica molto diffusa é quella delle spin-columns, nella quale gli acidi nucleici si adsorbono selettivamente su un supporto di silice (ad esempio sotto forma di piccole sfere) in presenza di elevate concentrazioni di sali caotropici che distruggono i legami idrogeno in acqua, denaturando le proteine. In soluzione a pH inferiore a 7.5, l'adsorbimento del DNA alla silice é intorno al 95% e le impurità possono quindi essere eliminate con il lavaggio. Successivamente, in condizioni di alcalinità e basse concentrazioni di sali, il DNA verrà facilmente eluito dal materiale di silice. Questa metodica può essere eseguita con l'ausilio di centrifuga o aspiratore. Un ulteriore approccio estrattivo in fase solida utilizza una resina paramagnetica rivestita di silice (Tereba et al., 2004) e l'isolamento del DNA può avvenire in una singola provetta semplicemente aggiungendo e rimuovendo soluzioni. Le molecole di DNA si legano reversibilmente alle particelle magnetiche e viene utilizzato un magnete al fine di isolare su un lato della provetta tali particelle e mantenere così le impurità (proteine, detriti cellulari) in soluzione per poi eliminarle tramite successivi lavaggi ed infine il DNA verrà rilasciato dalle particelle magnetiche tramite una fase di riscaldamento di pochi minuti. La **carta FTA[™]** contiene sostanze chimiche in grado di proteggere il DNA dalla degradazione ad opera delle nucleasi e dalla crescita batterica (Burgoyne, 1996), pertanto il DNA si mantiene stabile a temperatura ambiente per un periodo di diversi anni. L'uso della carta FTA comporta semplicemente l'aggiunta di una goccia di sangue sulla carta e la sua asciugatura. Le cellule vengono lisate al contatto con la carta e il DNA contenuto nei globuli bianchi viene intrappolato nella matrice della carta. Un piccolo frammento di carta viene ritagliato nel punto della macchia e posto all'interno di una provetta per i successivi lavaggi con solventi in grado di rimuovere l'eme ed altri inibitori dalla reazione di PCR. Sono state altresì sviluppate metodiche speciali per l'isolamento del DNA maschile (teste degli spermatozoi) dalle cellule epiteliali femminili (Gill et al., 1985) in casi di violenza sessuale, facilitando quindi l'interpretazione dei dati grazie alla rimozione della maggior parte del contributo femminile al profilo risultante. Tale procedimento, noto come **estrazione differenziale**, può essere effettuato tramite la selettiva digestione delle cellule epiteliali seguita dall'isolamento delle teste degli spermatozoi, non digerite,

attraverso la centrifugazione. La frazione spermatica viene quindi ulteriormente digerita e poi estratta usando ditiotreitolo (DTT). **Automatizzazione del processo di estrazione del DNA:** numerose e diverse apparecchiature sono state prodotte con differenti proprietà e capacità di processare un maggiore o minore numero di campioni ma il meccanismo fondamentale, le procedure di esecuzione e la semplicità d'uso sono simili. Il metodo più diffuso nelle apparecchiature automatiche è quello delle particelle magnetiche. Queste procedure permettono l'estrazione simultanea del DNA da un grande numero di campioni (fino a 96) con la garanzia della massima riproducibilità, qualità e produttività.

- **Quantificazione del DNA:** la determinazione della quantità di DNA presente in un campione é fondamentale per la maggior parte delle analisi basate sulla PCR perché una quantità eccessiva può provocare la comparsa di picchi aggiuntivi o fuori scala per la tecnica di misurazione, mentre una quantità scarsa di template può provocare fenomeni di drop-out allelico in quanto la reazione di PCR viene inficiata dai fenomeni stocastici. L'amplificazione PCR può anche fallire a causa della presenza di inibitori estratti insieme al DNA del campione, della degradazione del DNA, della insufficiente quantità di DNA, o della combinazione di tutti questi fattori. Numerose metodiche sono state sviluppate a fini di quantificazione del DNA, inclusa la procedura slot-blot e le analisi di fluorescenza con piastra microtiter. Una metodica innovativa relativamente recente nel campo della tipizzazione forense del DNA è la **PCR quantitativa (qPCR)**, nota anche come **Real-Time PCR**. Questa tecnica prevede l'utilizzo di un'apparecchiatura in grado di misurare la concentrazione del DNA durante le fasi di PCR mentre il template viene amplificato. La PCR quantitativa comprende le stesse fasi della PCR tradizionale (denaturazione, annealing ed estensione); tuttavia un marker fluorescente sensibile alla formazione di dsDNA viene introdotto nella reazione e permette così la misura dell'accumulo dei prodotti di amplificazione. I vantaggi principali della quantificazione da qPCR comprendono un vasto range dinamico, capacità di alto rendimento, alta sensibilità e quantificazione target-specifica (Butler, 2005). Ad oggi viene diffusamente utilizzata in ambito forense ed in commercio sono disponibili kit in grado di consentire la valutazione simultanea della quantità di DNA umano totale e di quello maschile tramite una sequenza primer specifica per una determinata regione del cromosoma Y. La Real Time PCR analizza, ciclo per ciclo, le variazioni nel segnale di fluorescenza proveniente dall'amplificazione di una sequenza bersaglio durante la PCR. Esistono tre diverse fasi che definiscono il processo PCR: 1)

amplificazione geometrica o esponenziale, 2) amplificazione lineare 3) fase di plateau. Il punto migliore per la misura della fluorescenza (tramite il confronto con campioni a concentrazione nota) in rapporto al numero di cicli è la fase esponenziale della PCR nella quale il rapporto tra quantità di prodotto e DNA di partenza è più affidabile. Gli strumenti per qPCR usano la cosiddetta soglia di cicli (cycle threshold, Ct) per i calcoli. Il valore Ct è il punto nel quale la fluorescenza del segnale supera un livello di soglia arbitraria; meno cicli occorrono per superare tale soglia e maggiore è la quantità di molecole di DNA template poste nella reazione. Un altro metodo di quantificazione del DNA, meno sensibile rispetto alla qPCR e non specifico per la specie umana, è rappresentato dal **Fluorimetro Qubit® 2.0**, il quale utilizza una tecnologia fluorimetrica basata su marcatori detti *Molecular Probes®* i quali emettono segnali fluorescenti solamente quando si trovano legati a specifiche molecole bersaglio, anche in presenza di nucleotidi liberi o acidi nucleici degradati. Con tale metodica, campioni con concentrazioni che possono scendere fino a 10pg/μL di DNA possono essere quantificati (il range di analisi del kit Qubit® dsDNA HS Assay è pari a 0,2-100 ng, corrispondente ad un range di concentrazione di partenza del campione pari a 10pg/μL-100ng/μL).

- **Amplificazione del DNA:** lo sviluppo della Reazione a Catena della Polimerasi (**PCR**) nel 1985 da parte di Kary Mullis ha dato un grande impulso al progresso in ambito scientifico nel campo dell'analisi del DNA, in particolare nella comunità forense. Questa applicazione permette la produzione di molteplici copie di una sequenza di acido nucleico *in vitro* (Mullis, 1990). Durante la reazione di PCR, il DNA a doppio filamento (dsDNA) viene sottoposto ad un processo di tre fasi: denaturazione, annealing ed estensione. I filamenti di ogni molecola di template sono denaturati tramite riscaldamento (~95°C) e successivo raffreddamento (~55°C), consentendo ai primers (piccole sequenze oligonucleotidiche) di legarsi ai singoli filamenti. La temperatura viene quindi nuovamente innalzata (~72°C) ed un enzima DNA polimerasi enzyme estende i primers incorporando i dinucleotidi trifosfati (dNTPs). In questo modo, la sintesi di sequenze bersaglio di dsDNA avviene in un rapido processo ciclico. Ad ogni ciclo, la PCR genera un incremento 2ⁿ del DNA bersaglio (la quantità di DNA in teoria raddoppia). La PCR richiede una mix di reagenti e parametri di amplificazione che deve essere ottimizzata per produrre sufficienti prodotti di amplificazione. I maggiori componenti inclusi nella “master mix”, che deve essere aliquotata in ogni provetta da PCR, sono i seguenti: buffer, dNTPs, polimerasi, primers e magnesio. La PCR è

divenuta un importante strumento analitico in ambito forense per la sua sensibilità, specificità, rapidità di analisi e facilità di automatizzazione. La tecnica di amplificazione PCR consente l'analisi di campioni forensi con bassa quantità (<1ng) di DNA estratto nonché un valido ed affidabile approccio per l'analisi di reperti biologici recuperati dalla scena del crimine.

- **Elettroforesi capillare:** i kit PCR comunemente impiegati nella pratica forense consentono l'amplificazione simultanea di numerosi frammenti di DNA, i quali, trattandosi di STRs, sono costituiti da un numero differente di unità ripetute, quindi alleli diversi presentano differenti lunghezze degli ampliconi generati. Di conseguenza per la loro analisi devono essere separati mediante un'opportuna tecnica che abbia una capacità di risoluzione tale da consentire di distinguere fra alleli che differiscono fra loro anche di una singola base e in un range che va dalle 100 alle 500 bp; il metodo utilizzato deve essere, inoltre, riproducibile per consentire il confronto dei risultati fra laboratori diversi. Per ottenere questa separazione fra le varie molecole presenti nella miscela di ampliconi prodotti dalla reazione di PCR si sfrutta la proprietà del DNA di possedere una carica negativa sui gruppi fosfato dello scheletro di cui è costituito: in presenza di un campo elettrico gli ioni vengono attirati dal polo di carica opposta, quindi nel caso degli acidi nucleici, dal polo positivo. Questo processo prende il nome di elettroforesi e si riferisce alla migrazione di cariche elettriche in un mezzo di separazione alle cui estremità è applicata una differenza di potenziale. La tecnica dell'elettroforesi capillare (CE) fu introdotta nei primi anni '80 e dal successivo sviluppo della strumentazione ha guadagnato in breve popolarità nel campo della biologia molecolare e in quello forense. Questa strumentazione è completamente automatizzata e consente di esaminare più lunghezze d'onda simultaneamente e quindi un elevato numero di loci che si sovrappongono in lunghezza, con un minimo consumo di campione da sottoporre alla corsa. Il segnale emesso dai fluorocromi, eccitati da un laser in prossimità dell'estremità anodica, viene registrato da un rivelatore costituito da un dispositivo ad accoppiamento di carica (*Charged-Coupled Device*, CCD): maggiore sarà il numero di fotoni che colpisce la superficie della matrice di silicio, maggiore sarà l'accumulo di elettroni e di conseguenza l'altezza del segnale digitale in cui viene convertito. I dati vengono infine inviati a un computer che, mettendo in relazione il picco di fluorescenza con il tempo di migrazione, trasforma il segnale fluorescente in dato di lunghezza espresso in bp o in sequenza nucleotidica. Le taglie dei prodotti di PCR di ogni campione vengono confrontate con quelle dei frammenti contenuti nel

ladder allelico. Il *ladder* è costituito da una miscela di alleli di lunghezza nota (sono gli alleli più comuni, di un particolare STR, presenti nella popolazione e pertanto rappresentativi della variabilità di un determinato STR) e viene utilizzato per correlare la taglia del prodotto di amplificazione con il numero di ripetizioni da cui è formato; in questo modo viene determinato il genotipo del campione. Ogni picco del campione non deve differire in lunghezza più di 0.5 bp dal corrispondente picco del ladder, altrimenti l'allele non viene assegnato e il picco viene definito *off-ladder* (OL). Uno specifico software, alla fine della corsa elettroforetica di ogni campione produce un file chiamato *raw data*, un grafico cartesiano che mette in relazione le *Unità di Fluorescenza Relativa* (RFU) sull'asse Y con il numero di *data points* sull'asse X.

- **Interpretazione dei risultati:** la conversione dell'elettroferogramma in profilo genetico viene effettuata tramite dei software, ma i profili generati dai campioni devono essere interpretati da personale esperto. Sono state sviluppate linee guida per l'interpretazione di profili genetici per assicurare che i risultati ottenuti siano affidabili; questo aspetto è di fondamentale importanza, soprattutto quando si devono analizzare campioni che contengono quantità molto basse di DNA, DNA degradato o profili misti. Ogni laboratorio dovrebbe sviluppare una propria strategia interpretativa basata su studi di validazione interni e sui risultati riportati in letteratura (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*, SWGDAM, 2010). Alcune delle linee guida più importanti per una corretta interpretazione degli elettroferogrammi sono rappresentate dalle seguenti:
 - bisogna stabilire un valore minimo per l'altezza dei picchi da considerare alleli e tutti i picchi al di sotto di tale valore vengono considerati rumore di fondo;
 - l'elettroferogramma deve mostrare picchi bilanciati, cioè di altezza comparabile; in particolare ai singoli loci, in presenza di eterozigosi, i picchi dovrebbero avere circa la stessa altezza. Per valutare il bilanciamento delle altezze dei picchi di uno stesso locus si calcola il rapporto tra l'altezza dell'allele più piccolo e quella dell'allele più grande: solitamente tale rapporto è sempre maggiore del 90% (>0.90), ma viene posto come valore soglia >0.60 ;
 - bisogna considerare la percentuale massima di *stutter* prodotte a ogni locus. Le *stutter* sono dei picchi aspecifici dovuti allo slittamento ed all'errato appaiamento a livello della regione ripetuta dei due filamenti di DNA durante la reazione di PCR. Sono dei picchi, solitamente più corti di una ripetizione rispetto al picco allelico più vicino. La presenza di *stutter* è di grande rilievo per l'interpretazione di tracce miste in quanto può risultare difficile stabilire se un picco sia una *stutter* o un allele vero. Va ricordato

che la percentuale massima di *stutter* osservata in ogni singolo locus viene riportata nel manuale d'uso dello specifico kit di amplificazione. La *stutter* viene individuata mediante il rapporto tra l'altezza o l'area del picco minore e l'altezza o l'area del picco maggiore: questo rapporto è generalmente al di sotto del 15%.

DISAMINA DELLA RELAZIONE TECNICA INDAGINI DI GENETICA FORENSE REDATTA DALLA DR. SSA PATRIZIA STEFANONI

Dalla disamina della Relazione Tecnica Indagini di Genetica Forense (**RTIGF**), redatta in data 12 giugno 2008 dalla Dr.ssa Patrizia Stefanoni, Direttore Tecnico Principale Biologo della Polizia di Stato, si evincono i seguenti dati in merito al prelievo di eventuali tracce biologiche, alle analisi di laboratorio eseguite ed all'interpretazione degli elettroferogrammi relativi al Rep.36.

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

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

CAMPIONATURE SUL REP.36 (COLTELLO)

In sede di Udienza GUP (04.10.2008) e in Corte d'Assise (udienza del 23.05.2009) la Dr.ssa Stefanoni ha precisato che sul coltello in esame non erano presenti tracce visibili ad occhio nudo e che i prelievi sono stati effettuati in parti dello stesso ove, in base alla propria esperienza, sarebbe stato possibile trovare materiale biologico. (Udienza GUP 04.10.08, pag. 17-18 *“per quanto riguarda la traccia A ... non era visibile nulla però la nostra esperienza, il buon senso l'abbiamo repertato là.....quella della traccia B non è stato proprio un caso...la campionatura è stata fatta in quel punto perché ad una visione sempre soltanto visiva quindi con nessuno strumento...erano visibili ad occhio nudo delle striature”*. Corte d'Assise (verbale d'udienza del 23.05.09, pag. 81) *“.. queste graffiature è l'unico dato che mi poteva diciamo guidare in una campionatura che altrimenti, come poi è successo in seguito è stata assolutamente casuale, le altre campionature che sono state fatte sul coltello, quindi mi riferisco alla.. anche la C in realtà che è contestuale alla A e la B come campionature, ma anche in particolare quelle successive, la E e la G sono state fatte*

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 simili), 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**

Sono riportate, inoltre, (cfr. SAL) le seguenti informazioni: *Tipo di Traccia, Descrizione Traccia, Quantità estratto, Ubicazione estratto, Analisi eseguite, Data 1^ estrazione.*

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

La predetta metodica, ampiamente nota in ambito forense, è annoverata tra le *metodiche di orientamento* per la diagnosi di sangue e qualora risulti positiva necessita di ulteriori indagini, cosiddette di certezza, per formulare la corretta diagnosi di sangue.

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

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

⊗ = negativa

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

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

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

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

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

Si ritiene che sarebbe stato necessario procedere all'analisi morfologica per la ricerca di cellule, eventualmente presenti, mediante colorazione con uno dei reattivi comunemente impiegati in istologia (ematossilina). Tale indagine, di semplice e rapida esecuzione, avrebbe richiesto un minimo quantitativo di materiale che non avrebbe in alcun modo compromesso le successive indagini di laboratorio ma avrebbe potuto chiarire la natura del materiale asportato dal reperto in esame.

Nonostante la negatività del test per la diagnosi di sangue e le omesse indagini per la ricerca di cellule (e quindi la mancata identificazione del materiale asportato dal reperto 36) *la CT ha ipotizzato la presenza di “presunte cellule di sfaldamento” sul materiale prelevato dall'impugnatura del coltello* (tracce A-D-F) *e di “presunto materiale biologico” di altra natura* (verosimilmente sangue considerate le indagini mirate alla ricerca della perossidasi ematica) *sul materiale prelevato dalla lama* (tracce B-C-E-G).

Le ipotesi formulate dalla CT, circa la natura del materiale analizzato, sono del tutto arbitrarie in quanto non supportate da alcun riscontro *scientificamente* obiettivo.

ESTRAZIONE DEL DNA

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

Dalla Scheda Avanzamento Lavori (SAL) si evince che

- l'estrazione del DNA dalle tracce A-B-C è stata eseguita in data 13-11-07
- l'estrazione del DNA dalle tracce D-E-F-G- è stata eseguita in data 17-12-07

La “*Quantità di estratto*” era pari a 50µl per ogni campione (cfr SAL).

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 presunte cellule di sfaldamento eseguita	traccia B presunta sostanza biologica eseguita	traccia C presunta sostanza biologica eseguita
Quantificazione 7700 Sequence Detector <i>ABI PRISM™</i> della <i>Applied Biosystems</i>	☑	☑	⊗

☑ = positiva

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

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

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**".

Va sottolineato che dalla disamina dei *rapporti di Real Time PCR esibiti risulta che la quantificazione mediante detta metodica è stata eseguita*, in data 18 dicembre 2007, *soltanto sugli estratti di DNA indicati con le seguenti numerazioni:*

48649 = traccia D

48651 = traccia E

48654 = traccia F

48655 = traccia G

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

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

1. A (codice campione ID 47329)

2. B (codice campione ID 47330)

3. C (codice campione ID 47331)

eseguite mediante il *Fluorimetro Qubit™* della ditta *Invitrogen* con il *Kit dsDNA HS*. Si tratta di un test selettivo per il DNA a doppio filamento, ma non specifico per il DNA umano. Possono essere accuratamente e facilmente quantificati campioni con concentrazione di DNA con range compreso fra 0.2-100 ng.

Dalla scheda allegata si evince che si è proceduto alla preparazione dei seguenti reagenti:

- *Soluzione madre: per ciascun campione 199 µl di Buffer e 1 µl di reagent*
- *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*

Mediante il *Fluorimetro Qubit™* sono stati ottenuti i seguenti valori di concentrazione delle campionature:

- **Traccia A (codice campione ID 47329): 0.08 ng/µl**
- **Traccia B (codice campione ID 47330): too low**
- **Traccia C (codice campione ID 47331). too low**

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

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

ESCLUSO DALLA CIRCOLAZIONE PUBBLICA
30 LUG. 2009
CANCELLATO

CAMPIONE	VALORE $\mu\text{g/mL}$	CONCENTRAZIONE CAMPIONE $\text{ng}/\mu\text{l}$
Standard 1	1.0	
Standard 2	0.5	
1%47326	0.5	
2%47327	0.5	
3%47328	0.5	
4%47329	0.5	
5%47330	0.5	
6%47331	0.5	

13 novembre 2007

Da ciò deriva che **quanto riportato a pag. 78 della RTIGF** (e confermato nell'interrogatorio GUP, pag 178, ove specifica di aver eseguito la quantificazione mediante Real Time e di non aver eseguito la quantificazione per l'Y) **non è conforme a quanto in realtà è stato eseguito**: infatti, dalle tabelle si evince che **la quantificazione del DNA estratto da tutte le campionature prelevate dal Rep.36 è stata effettuata utilizzando apparecchiatura 7700 Sequence Detector ABI PRISM™** (Applied Biosystems) per contro dalle schede allegate si evince che **la metodica predetta è stata eseguita solo per le tracce D-E-F-G mentre per le tracce A-B-C è stato utilizzato un metodo diverso avvalendosi dell'utilizzo del Fluorimetro Qubit™ non menzionato nella CT definitiva, come sarebbe stato corretto e doveroso.**

In merito all'**interpretazione della quantificazione** va rilevato che a pag. 78, si legge "**le tracce risultate positive alla quantificazione (tracce A e B), sono state sottoposte ad amplificazione e successiva elettroforesi capillare...**".

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

Non è, per contro, comprensibile quale criterio sia stato adottato nella *valutazione della positività alla quantificazione della traccia B e della negatività della traccia C* dal momento che *per ambedue le tracce è stato ottenuto lo stesso risultato “too low”*, ovverosia 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 “**AmpFI STR Identifier**” della Applied Biosystem (Foster City, CA) secondo gli “User Manual”.*

Si ricorda che, per quanto riguarda il kit *AmpFI STR Identifier*, le indicazioni fornite dalla ditta produttrice, per una corretta amplificazione, sono le seguenti:

- *N. campioni x 10.5 µl di AmpFI STR PCR Reaction Mix*
- *N. campioni x 0.5 µl di AmpliTaq Gold DNA Polymerase*
- *N. campioni x 5.5 µl di AmpFI STR Identifier Primer Set*
- *10 µl di DNA con concentrazione ± 0.125 ng/µl*
- *Volume finale della reazione 25 µl*

Il range di concentrazione del DNA consigliato dalla ditta produttrice è pari a 0.5-1.25 ng/µl.

Parallelamente ai campioni in esame ***devono essere allestiti controlli*** al fine di monitorizzare l'efficacia delle condizioni di amplificazione prescelte e/o la presenza di contaminazione.

I controlli includono tipicamente un “controllo negativo” ed un “controllo positivo”.

Il “***controllo negativo***” è costituito da: ***Mix di amplificazione di PCR (senza alcun DNA template) + acqua o buffer*** (utilizzati nelle fasi precedenti di estrazione e diluizione), negli stessi volumi utilizzati per amplificare le tracce in esame.

La finalità dell'inserimento nella fase di amplificazione del controllo negativo è quella di accertare se i reagenti utilizzati per l'estrazione e per la diluizione del DNA, ottenuto dai campioni in esame, siano privi di DNA ovvero ***consente di verificare se sia presente contaminazione da DNA estraneo.***

Il “***controllo positivo***” è costituito da: ***Mix di amplificazione di PCR + DNA template standard di sequenza nota*** (fornito dalla ditta produttrice del kit), negli stessi volumi utilizzati per l'amplificazione delle tracce in esame.

La finalità del controllo positivo è di assicurare che i componenti ed i parametri della reazione siano corretti e pertanto idonei ad amplificare le regioni di DNA di interesse, in sintesi ***consente di monitorizzare l'efficacia delle condizioni sperimentali prescelte.***

Tenuto conto di quanto riportato nella RTIGF (pag.78) e dell'assenza di annotazioni specifiche nel SAL si deve ritenere che non sia stata apportata alcuna modifica alle indicazioni fornite dalla ditta produttrice del kit circa i volumi da impiegare per la reazione di amplificazione.

In realtà dall' esame della documentazione in atti emergono numerose lacune sulle modalità di amplificazione.

In particolare:

1. non sono mai indicati i **volumi della Mix**: è noto, infatti, che il bilanciamento di una reazione PCR dipende dalla concentrazione dei singoli reagenti utilizzati;
2. non è mai indicato il **quantitativo di DNA** utilizzato per ogni reazione PCR: è altrettanto noto che i migliori risultati sono ottenuti quando il DNA template è aggiunto nella quantità che corrisponde al range indicato dal kit.

Da qui la necessità di quantificare preventivamente l'estratto.

In merito al **punto 2.** sono necessarie ulteriori puntualizzazioni:

- si rileva, a pag. 79 della RTIGF, che le tracce indicate con le lettere C-D-E-F-G (tracce, peraltro, risultate negative alla quantificazione del DNA) sono state concentrate mediante *Speed-Vac SC110*, ma non risulta che sia stata ripetuta la quantificazione degli estratti concentrati. Si dà atto, nella RTIGF, che dalle tracce predette non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione;
- in assenza di qualunque annotazione circa modifiche apportate ai protocolli di amplificazione si deve ritenere, come già precedentemente rilevato, che per le **tracce A e B** sia stato seguito il protocollo allegato al kit: ovverosia che siano stati impiegati volumi totali di 25 µl costituiti rispettivamente da:

15 µl di Mix di amplificazione + 10 µl di DNA estratto dalla traccia A

15 µl di Mix di amplificazione + 10 µl di DNA estratto dalla traccia B

In relazione all'estratto della **traccia A** qualora fossero stati utilizzati i volumi indicati nel kit *Identifiler* si dovrebbe supporre che il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione PCR sia stato di complessivi 0.8 ng ($0.08 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 0.8 \text{ ng}$), quindi, un quantitativo di DNA che rientra nel range suggerito dal kit (0.5-1.25 ng/µl di DNA template) e che, come vedremo successivamente, ha fornito un tracciato elettroforetico in accordo con il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione.

Notevoli perplessità, invece, sorgono sul quantitativo di DNA estratto dalla **traccia B** che sarebbe stato aggiunto alla mix di reazione. 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.

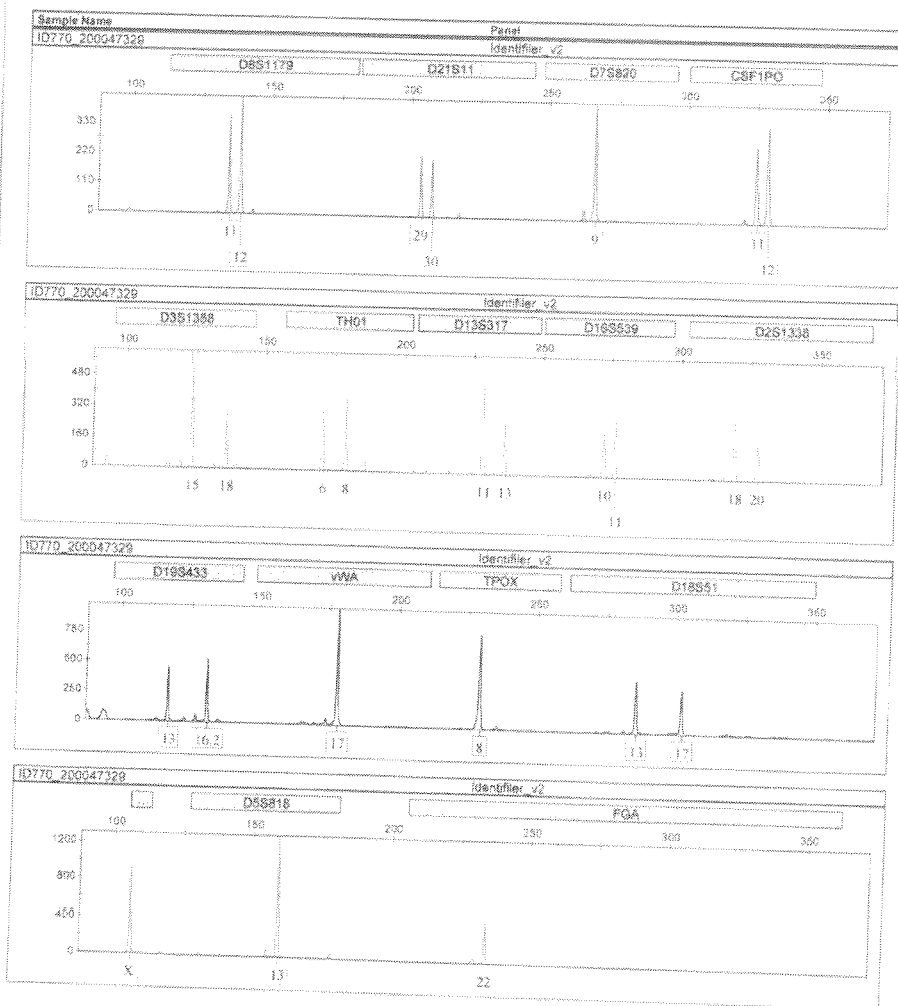
Si sottolinea che l'amplificazione è stata eseguita una sola volta (pag. 21-22 trascrizione dell'interrogatorio GUP alla domanda "...l'esame su un dato di traccia di questo genere dovrebbe essere ripetuto più volte per essere ritenuto affidabile? La CT risponde "*In teoria sì*" a domanda "*Lei quante volte l'ha fatto* " risponde "*In questo caso una sola volta*".

ELETTROFORESI CAPILLARE

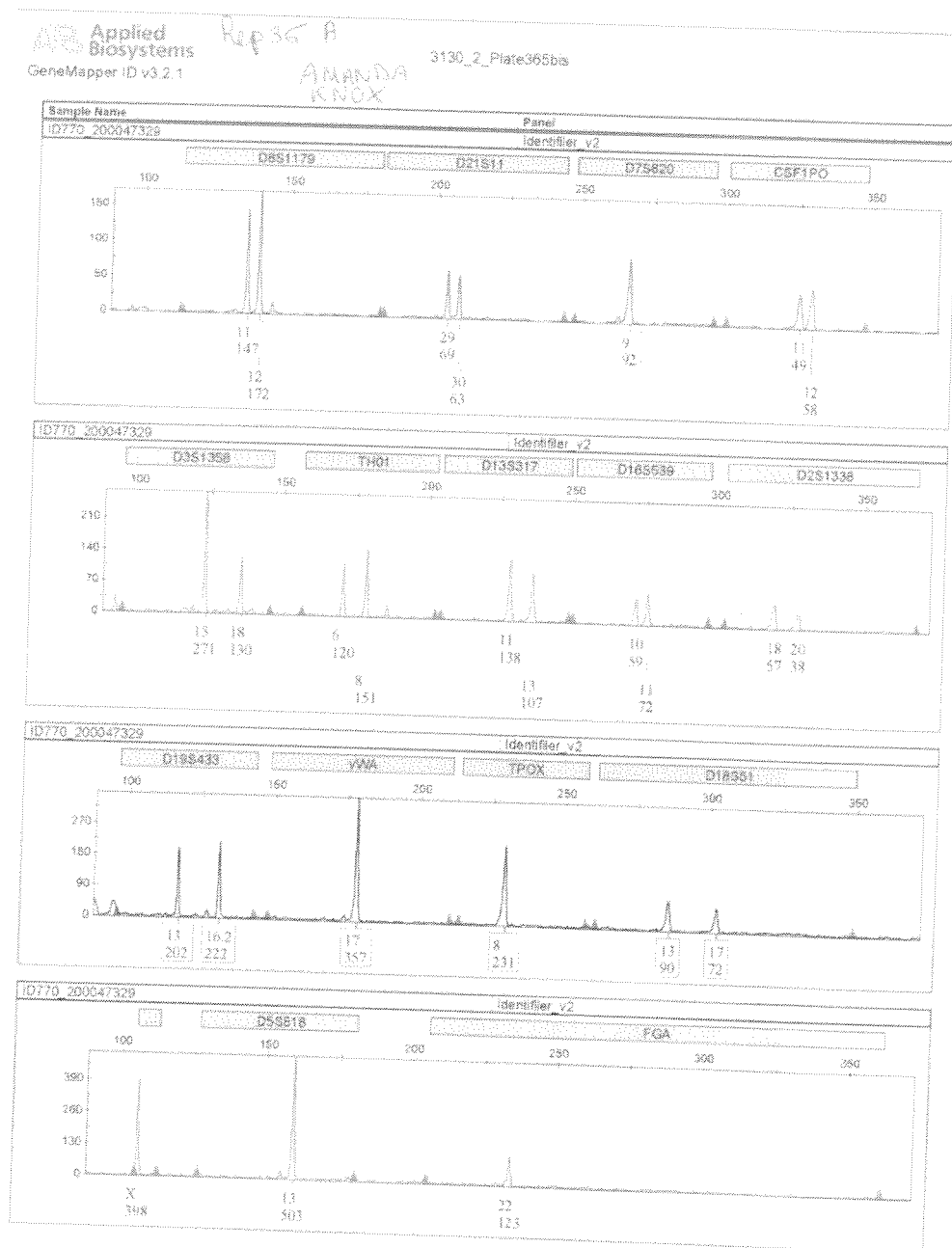
I prodotti di amplificazione ottenuti dalle tracce A e B sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare mediante strumentazione *ABIPRISM 3130 Genetic Analyzer* utilizzando il software di analisi "*Gene Mapper*".

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

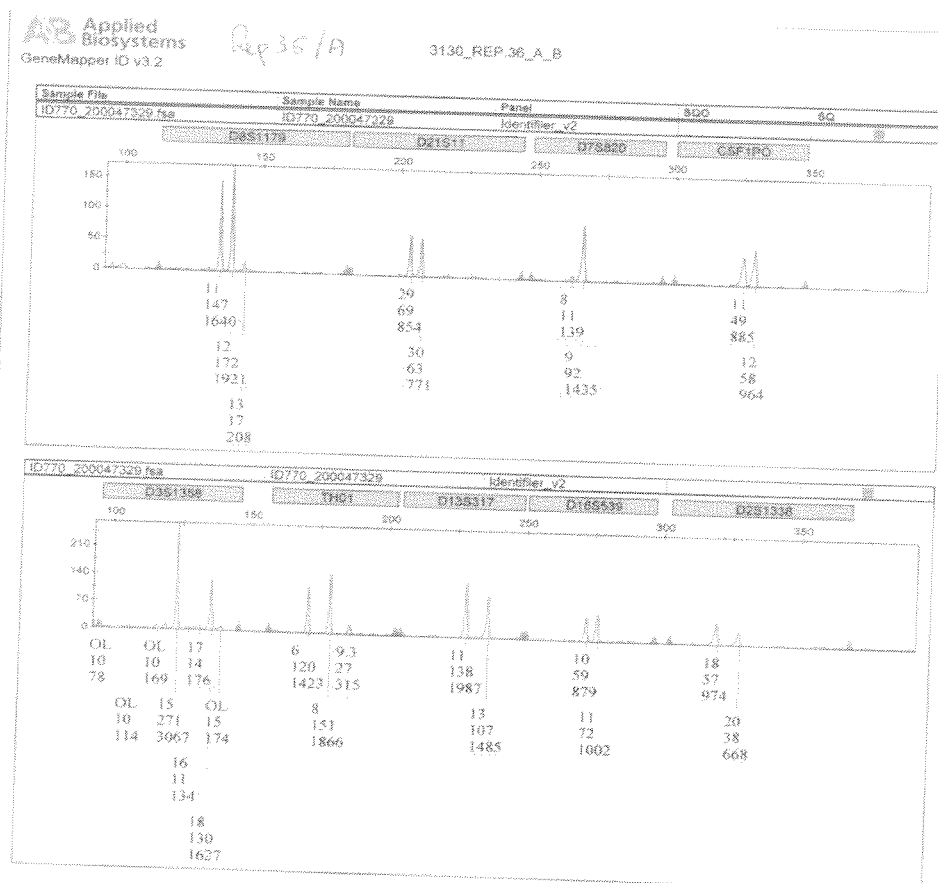
Si riporta di seguito l'**elettroferogramma** relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla **traccia A** (impugnatura del coltello), allegato alla RTIGF.

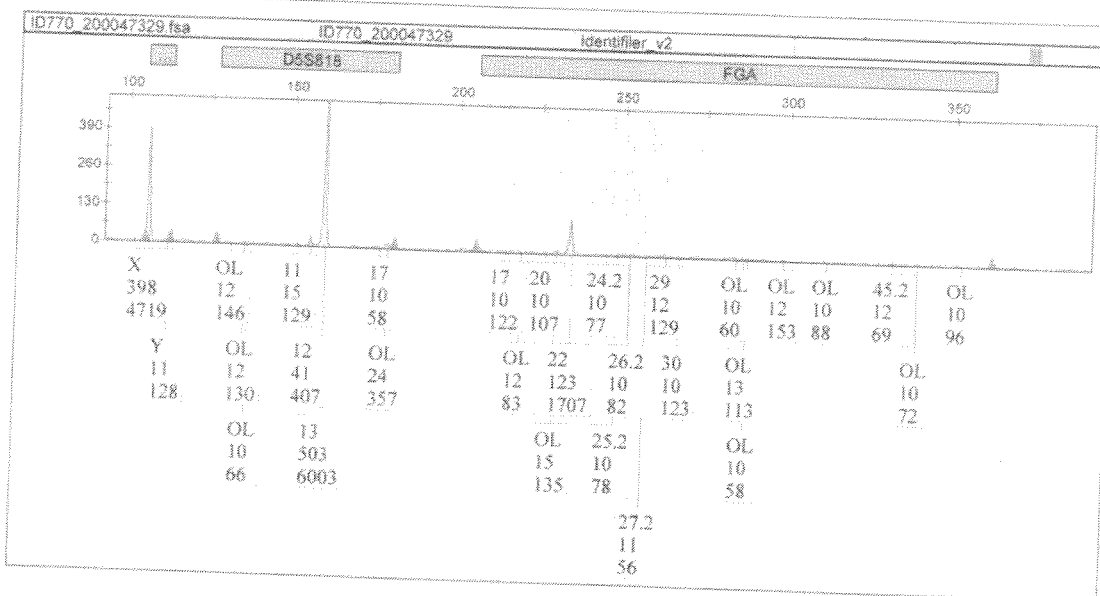


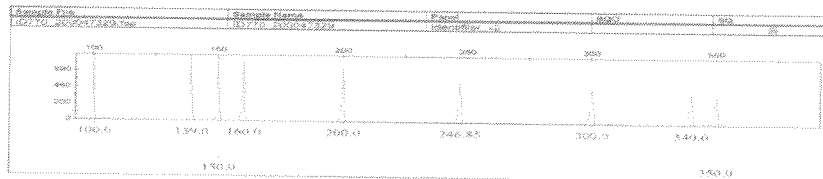
In data 29 aprile 2011 ci è stato inviato, su CD-rom, l'elettroferogramma relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla traccia A ove sono indicate le altezze dei picchi allelici:



Ed in data 11 maggio 2011 ci è stato inviato, via e-mail, l' elettroferogramma, relativo alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla traccia A, ove sono indicate le altezze e le aree dei picchi





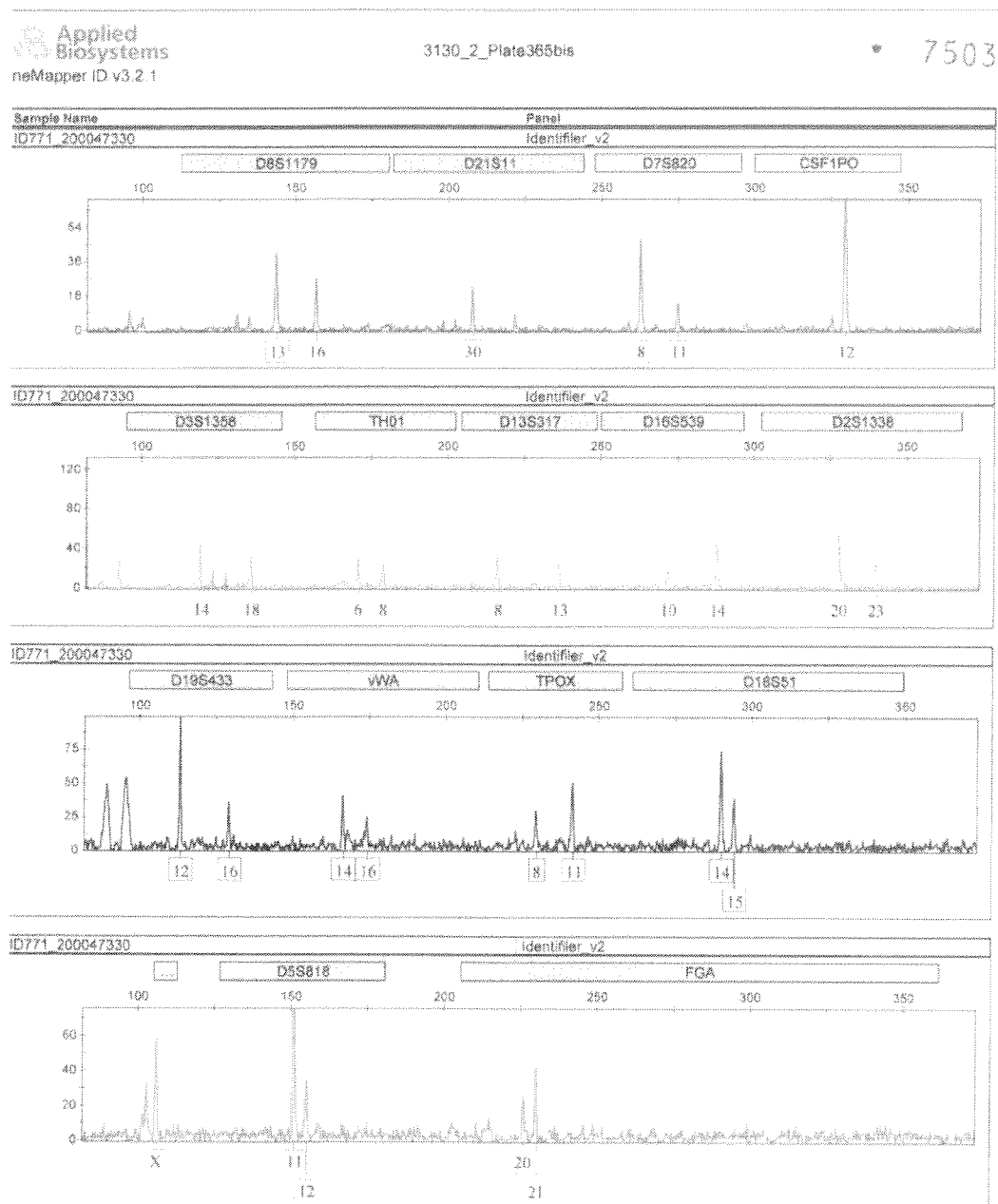


In merito alla corsa elettroforetica del DNA amplificato dalla **campionatura A**, da tutti gli elettroferogrammi si rileva che: a) *sono presenti picchi che superano la soglia di 50 RFU* (si sottolinea che 50 RFU è la soglia raccomandata dal manuale del kit e al di sotto della quale non è consigliato 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:

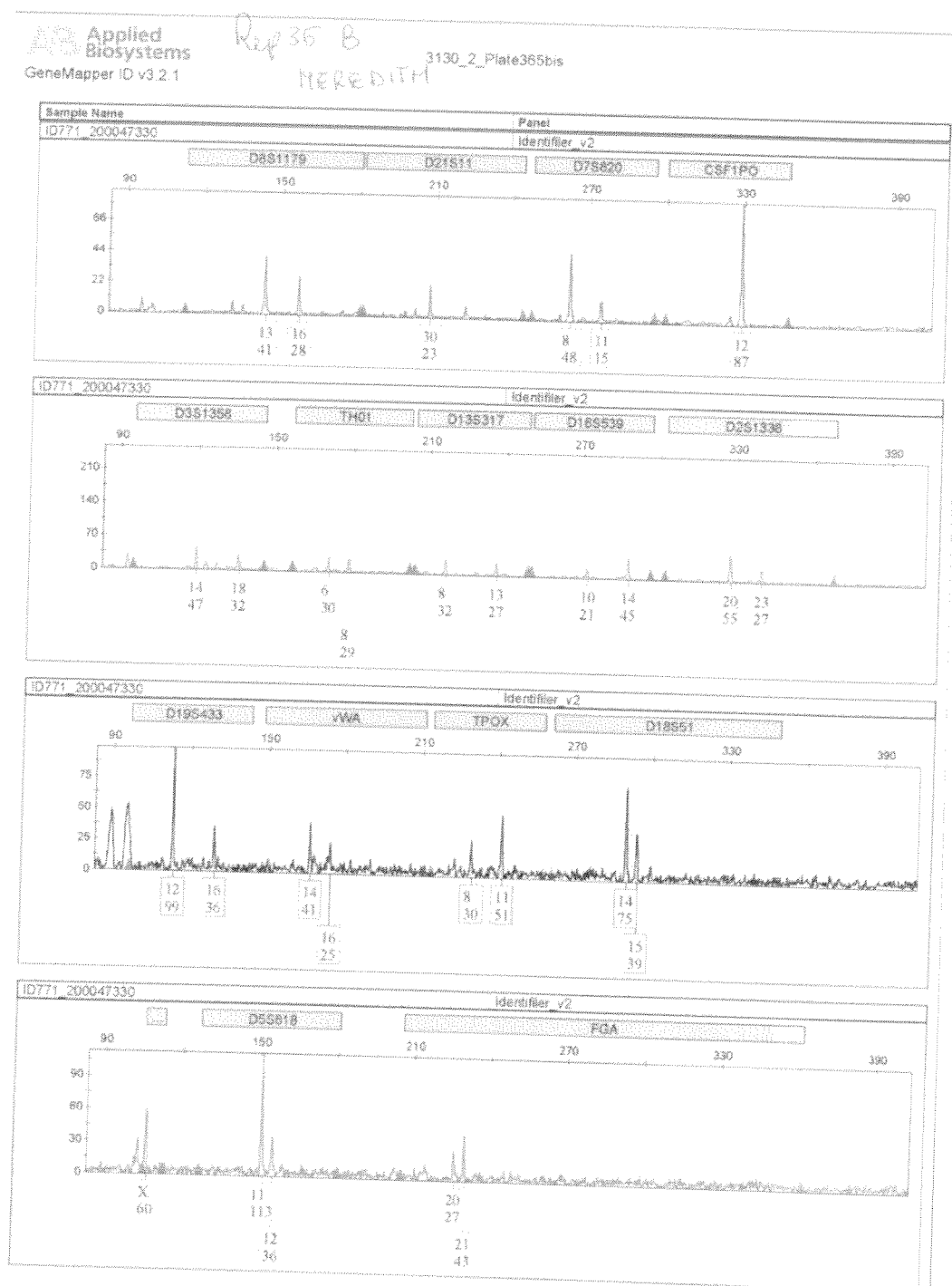
<i>Locus</i>	<i>Campionatura A</i>	
	<i>Altezza picchi</i>	<i>Bilanciamento degli eterozigoti</i> $Hb=\varphi_a/\varphi_b$
D8S1179	allele 11 ↑ 147 allele 12 ↑ 172	0.85
D21S11	allele 29 ↑ 69 allele 30 ↑ 63	0.91
D7S820	allele 9 ↑ 92	-
CSF1PO	allele 11 ↑ 49 allele 12 ↑ 58	0.84
D3S1358	allele 15 ↑ 271 allele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

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

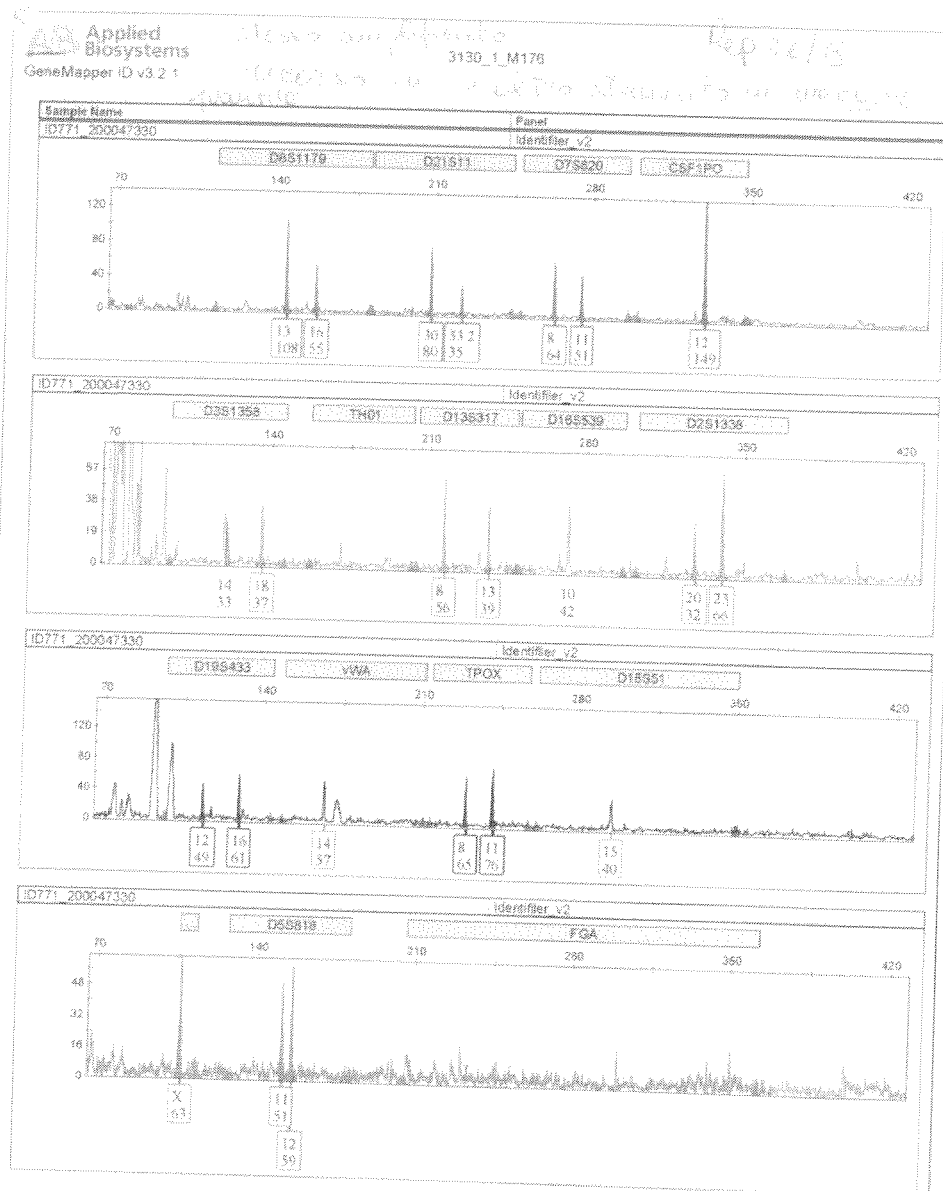


In data 29 aprile 2011 ci sono stati inviati, su CD-rom, gli elettroferogrammi relativi alle due corse elettroforetiche del DNA amplificato dalla traccia B, ove sono indicate le altezze dei picchi allelici (elettroferogrammi datati rispettivamente *I corsa*: Sep 23, 2008 10:35 AM; *II corsa* Sep 25,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

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



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



Thu Sep 25 2008 01:17PM, CEST

Printed by: gmid

Page 1 of 1

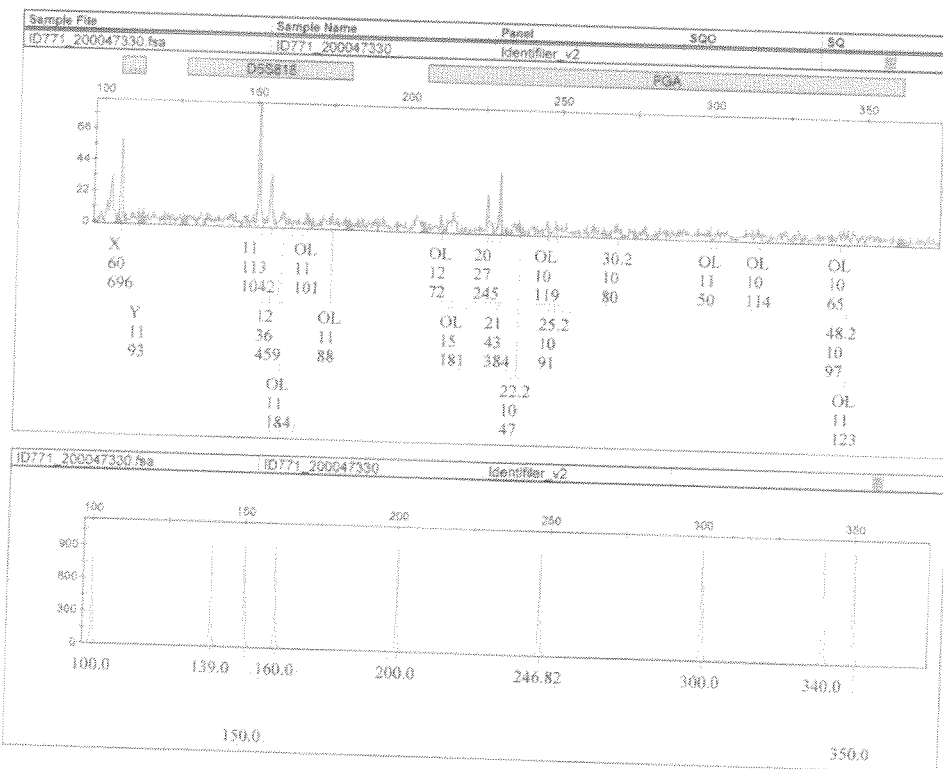
I CORSA ELETTROFORETICA (mag 11, 2011 04:48 PM)

1. Introduction

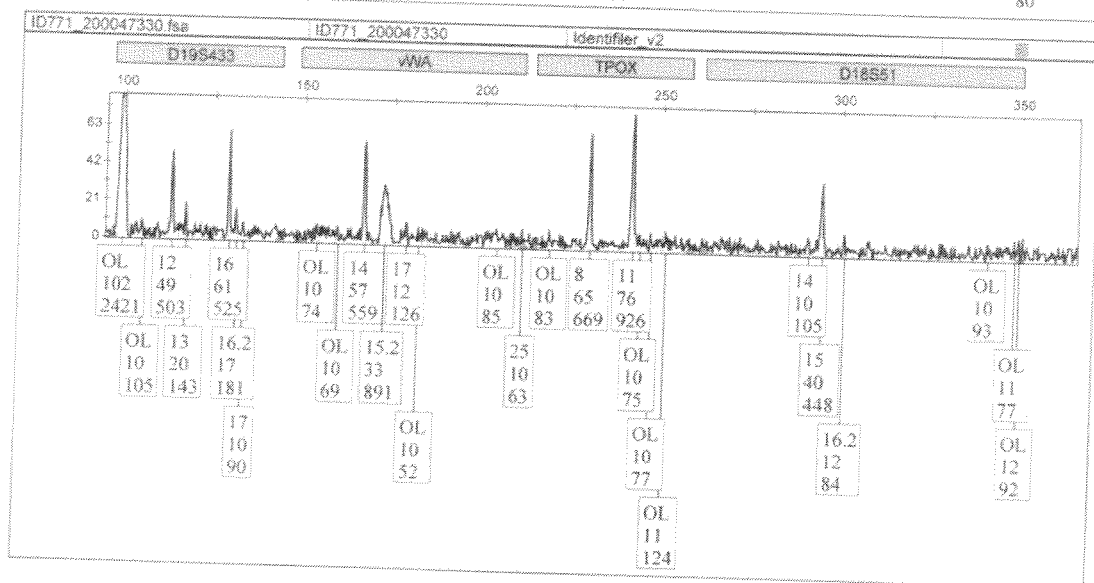
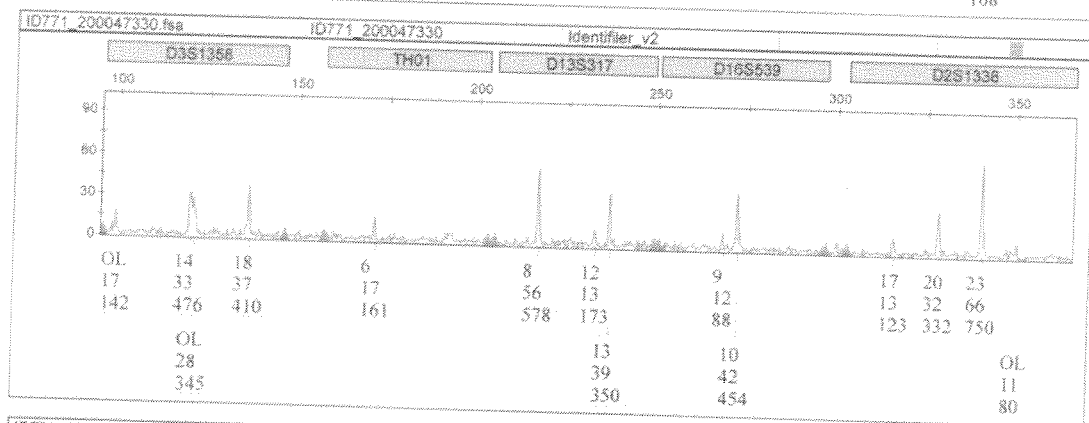
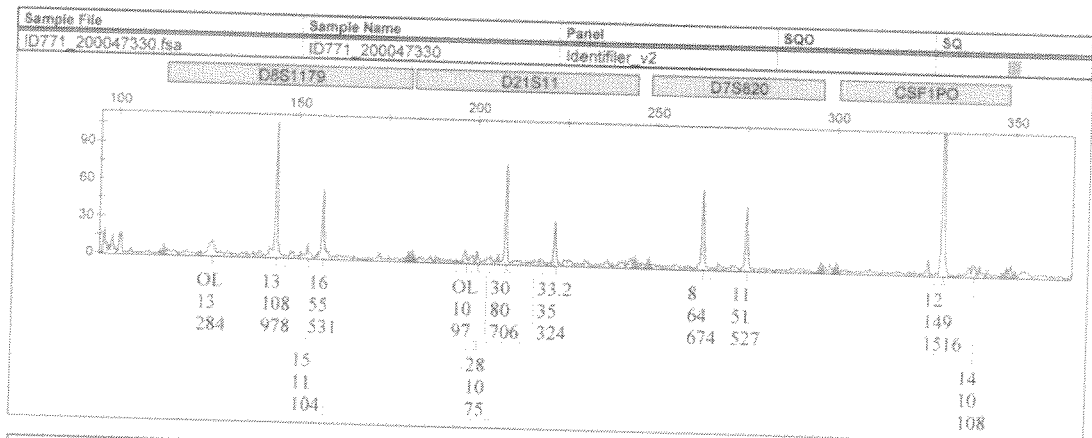


Printed by: grid

Page 1 of 2



II (025)



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

Dall'esame della I corsa elettroforetica, datata "*Sep 23,2008 10:35 AM*", va rilevato che: a) tale tracciato presenta *picchi che sono nettamente al di sotto della 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 sbilanciati* in quanto il rapporto tra molti picchi è <0.60 (Gill.P et al., 2006).

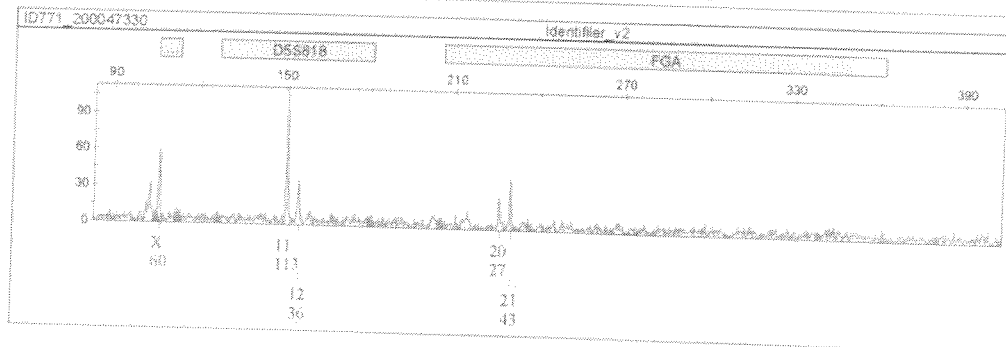
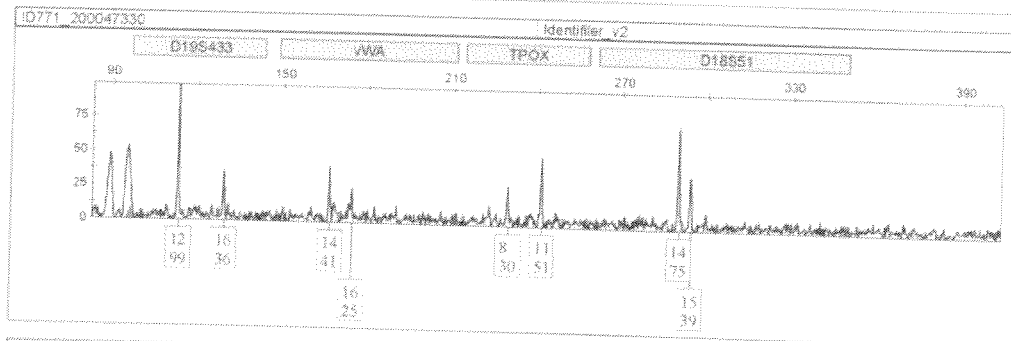
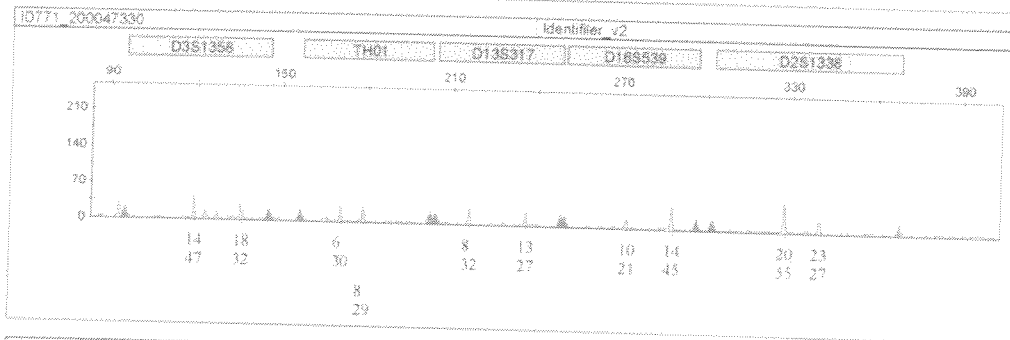
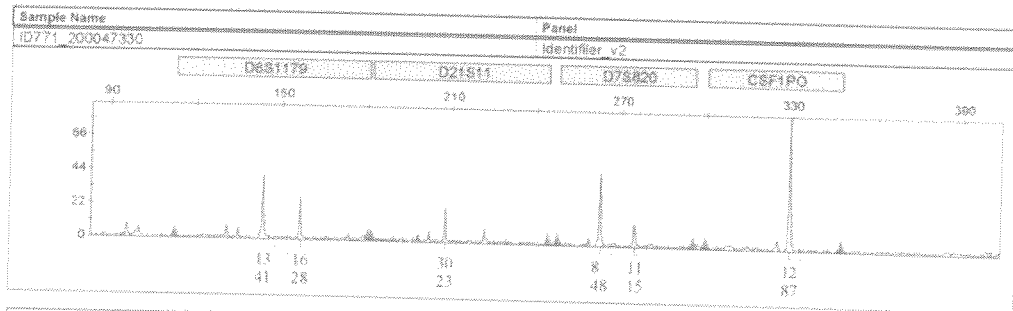
I CORSA ELETTROFORETICA (Sep 23, 2008 10:35 AM)

Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2.1

Rep 35 B

3130_2_Plate365bis

NEREDITH



Tue Sep 23, 2008 10:35AM, CEST

Printed by: gmid

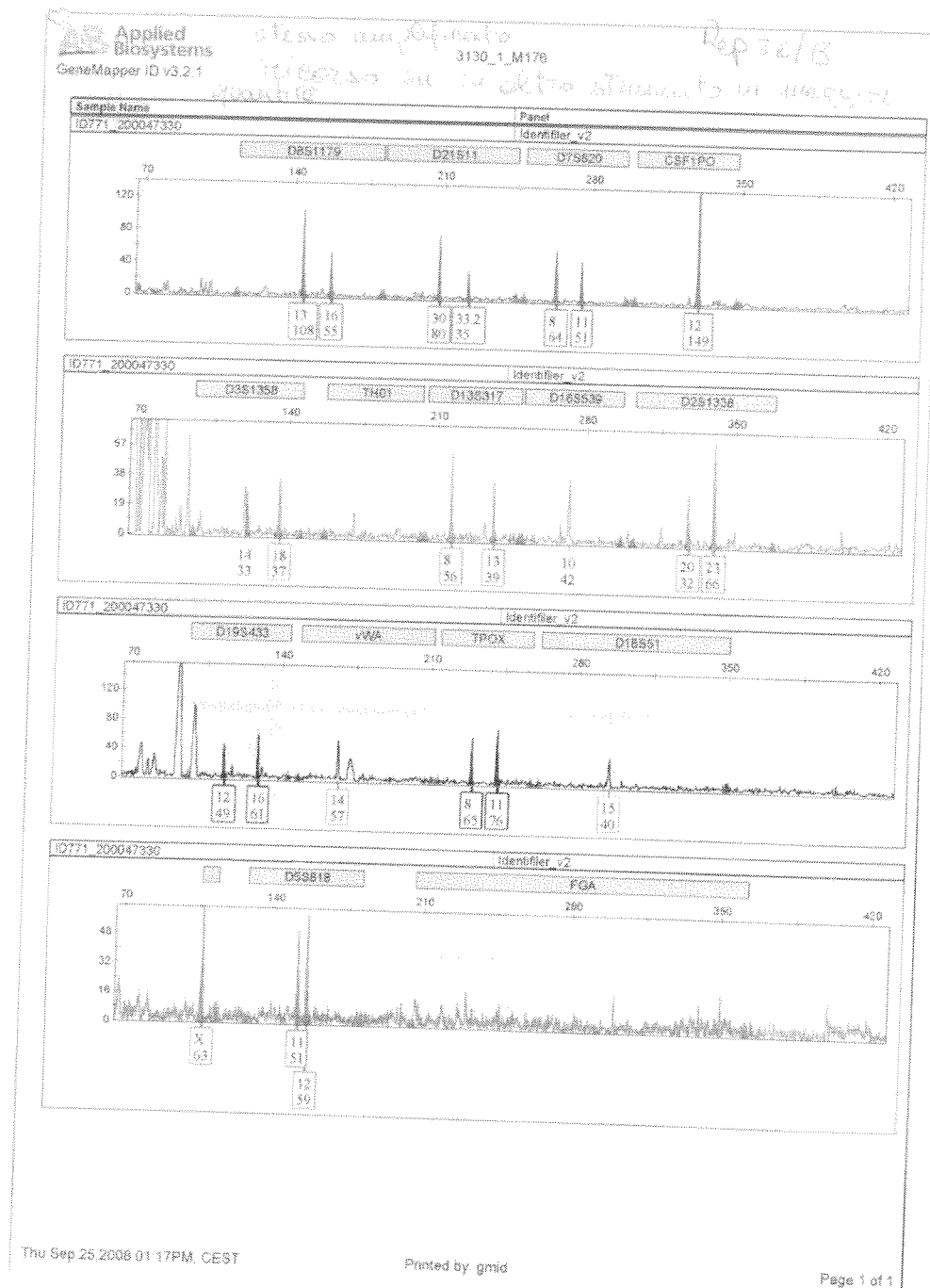
Page 1 of 2

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

<i>Locus</i>	<i>Campionatura B I corsa elettroforetica</i>	
	<i>Altezza picchi</i>	<i>Bilanciamento degli eterozigoti $Hb = \varphi_d / \varphi_b$</i>
D8S1179	allele 13 ↑ 41 allele 16 ↑ 28	0.68
D21S11	allele 30 ↑ 23	-
D7S820	allele 8 ↑ 48 allele 11 ↑ 15	0.31
CSF1PO	allele 12 ↑ 87	-
D3S1358	allele 14 ↑ 47 allele 18 ↑ 32	0.68
TH01	allele 6 ↑ 30 allele 8 ↑ 29	0.96
D13S317	allele 8 ↑ 32 allele 13 ↑ 27	0.84
D16S539	allele 10 ↑ 21 allele 14 ↑ 45	0.46
D2S1338	allele 20 ↑ 55 allele 23 ↑ 27	0.49
D19S433	allele 12 ↑ 99 allele 16 ↑ 36	0.36
VWA	allele 14 ↑ 41 allele 16 ↑ 25	0.60
TPOX	allele 8 ↑ 30 allele 11 ↑ 51	0.58
D18S51	allele 14 ↑ 75 allele 15 ↑ 39	0.52
D5S818	allele 11 ↑ 113 allele 12 ↑ 36	0.31
FGA	allele 20 ↑ 27 allele 21 ↑ 43	0.62

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

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



In merito alla valutazione dell'altezza dei picchi nella campionatura B, la stessa CT a specifica domanda (GUP, pag. 20) *“Lei quando nella sua esperienza definisce il valore RFU piuttosto basso”* afferma *“al di sotto dei 50 inizio ad avere maggiore attenzione nel valutare”*. In merito alle spiegazioni richieste dal GUP (pag. 21) circa il campione con codice identificativo 47330 (traccia B Rep.36) *“Perfetto! Qui che abbiamo?”* la CT risponde *“Allora qui abbiamo un profilo genetico che sicuramente ha una intensità di R.S.U. minore del precedente”* D. *“Siamo nell'ordine di?”* R. *“Diciamo siamo nell'ordine che ne so sempre lo stesso punto genetico che ho definito prima a cui osserviamo un 41 e 28”* D. *“Quindi per lei sarebbe già un pochetto a rischio, come abbiamo detto prima un po' basso?”* R. *“Sì, sì, sì”*.

Ancora a domanda del Dr. Biondo (trascrizione udienza GUP, pag. 72) *“C'è stato un altro aspetto per cui quando si fa una analisi di D.N.A. dove i picchi, le altezze riportate in R.S.U. sono basse lei ha definito che c'è un rischio, questo rischio ce lo può spiegare?”* La CT risponde *“Allora c'è un rischio nel senso che io praticamente nel valutare un profilo genetico che ha un'altezza di picchi piuttosto bassa, appunto, più o meno al disotto di 50 RFU, 50, 60 io ho il rischio di compiere una operazione che è una cosa, diciamo, che nessun genetista forense vorrebbe augurarsi cioè di interpretare male quel profilo ... cioè nel senso che io posso sbagliare la valutazione, valuto un picco in maniera sbagliata perché magari è troppo basso e quindi corro il rischio magari di escludere dal quadro investigativo una persona che può essere la vittima...”*.

A pag. 21-22 dell'interrogatorio GUP alla domanda *“...l'esame su un dato di traccia di questo genere dovrebbe essere ripetuto più volte per essere ritenuto affidabile?”* La CT risponde *“In teoria sì”* a domanda *“Lei quante volte l'ha fatto”* risponde *“In questo caso una sola volta”* D. *“Una sola volta e quindi è stato in teoria perché dovrebbe essere ritenuto più affidabile se lo si fa più volte?”* R. *“Perché c'è la riproducibilità del dato che, diciamo, è una buona norma in qualunque esperimento scientifico a prescindere dalla genetica forense, un dato ovviamente per essere ritenuto valido deve essere ripetibile”*.

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).

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

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

Si ritiene opportuno, a questo punto, fornire alcuni chiarimenti sulla definizione del termine Low Copy Number ed illustrare quali siano le esperienze, i suggerimenti e le raccomandazioni delle Comunità Scientifica Internazionale al fine di tentare di risolvere alcune delle problematiche più frequenti inerenti i campioni biologici aventi un basso quantitativo di DNA (LCN).

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

Quando, circa un decennio fa, la tecnica conosciuta come tipizzazione LCN è stata sviluppata essa veniva riferita all'analisi di campioni contenenti meno di 100 pg di DNA (Gill P. et al., 2000; Gill P., 2001; Budowle B. et al., 2009), mentre più recentemente il valore di templatato corrispondente alla definizione di LCN è considerato inferiore ai 200 pg, valore maggiormente associabile alle quantità di DNA descritte da diversi Autori (Caddy B., Taylor D.R., Limcare A.M., 2009) quale soglia stocastica per la tipizzazione convenzionale degli STR (Moretti T.R. et al., 2001(a); Moretti et al., 2001 (b)).

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

Numerosi studi di validazione sono stati condotti sui kit commerciali per la tipizzazione del DNA e sono state chiaramente definite le condizioni nelle quali tali kit producono risultati attendibili (*Micka K.A. et al., 1999; Cotton E.A. et al., 2000; Krenke B.E. et al., 2002; Holt C.L. et al., 2002; Collins P.J. et al., 2004; Mulero J.J. et al., 2008*). Le quantità ottimali di template sono, quindi, ben specificate ed il range varia solitamente tra 0.5-2 ng di DNA stampo (1 ng viene di solito considerata la quantità ottimale per la maggior parte dei kit in commercio).

Riportiamo di seguito quanto emerge dalla letteratura internazionale in merito al contributo scientifico di autorevoli scienziati in tema di Low Copy Number.

Il tragico attacco terroristico ad Omagh, Irlanda del Nord, nel 1998 (bombardamento di un mercato, con bilancio di 29 vittime e 200 feriti) ha sollevato per la prima volta la questione della validità della tipizzazione LCN e del suo utilizzo in casi giudiziari poiché il presunto colpevole dell'attentato era stato in un primo momento arrestato sulla base dei risultati della tipizzazione LCN, ma, in un secondo tempo, scarcerato a causa della presunta carenza di adeguate misure di sicurezza nella raccolta, trasporto e manipolazione dei reperti sequestrati, nonché di adeguate precauzioni a livello di laboratorio per la tipizzazione LCN (*The Queen v Sean Hoey. Neutral Citation Number [2007] NICC 49*).

Le critiche sollevate da tale caso giudiziario hanno, pertanto, portato alla creazione di una Commissione di revisione delle tecnologie per la tipizzazione LCN: tale Commissione ha, quindi, affermato (*Caddy B., Taylor D.R., Lincare A.M., 2009* - noto anche come "*Caddy Report*") che la tipizzazione LCN, così come praticata specificamente nel Regno Unito, è un metodo "*robusto*" e "*adeguato allo scopo*", offrendo però al contempo una serie di raccomandazioni utili al fine di migliorare l'affidabilità della metodica ed evidenziando, tra le altre, le seguenti problematiche relative alla tipizzazione di LCN:

- ***maggiore rischio potenziale di errore rispetto ai protocolli di tipizzazione STR convenzionali;***
- *errori di interpretazione dovuti al drop-in e drop-out allelico, allo sbilanciamento di altezza dei picchi e ad ampi picchi di stutter;*
- ***necessità di un robusto e affidabile metodo di quantificazione al fine di determinare la quantità di DNA disponibile per l'analisi;***

- i profili LCN non sono generalmente riproducibili e, a causa dell'errore potenziale, il valore di prova dei risultati può non essere valutato correttamente;
- l'interpretazione di profili derivati da misture da tipizzazione LCN è problematica e al momento non esistono linee guida per l'interpretazione basate su studi di validazione affidabili;
- **a causa della sensibilità del metodo e della tipologia di campioni in esame (ad esempio, campioni "da contatto"), il profilo ottenuto dalla tipizzazione LCN potrebbe non essere rilevante per il caso specifico;**
- la prova non può essere usata al fine della dimostrazione di non colpevolezza;
- indicazioni relative all'adeguata raccolta dei reperti e protocolli riguardo la manipolazione degli stessi non sono stati chiaramente stabiliti né presentati;
- reagenti, accessori e strumentario di laboratorio possono contenere bassi livelli di DNA estraneo che può a sua volta complicare l'interpretazione dei risultati di tipizzazione LCN.

1. Metodiche di tipizzazione LCN

Esistono numerose alternative per procedere alla tipizzazione LCN aumentando la sensibilità dell'analisi. Queste comprendono: aumento del numero di cicli di PCR (*Gill P. et al., 2000; Whitaker J.P. et al., 2001; Gill P., 2001; Kloosterman A.D. et al., 2003; Budowle B. et al., 2009;*); Nested PCR (*Strom C.M., Rechitsky S., 1998*); riduzione del volume di PCR (*Gaines M.L. et al., 2002; Leclair B. et al., 2003; Budowle B. et al., 2009*); Whole Genome Amplification pre-PCR (*Hanson E.K., Ballantyne J., 2005*); potenziamento del segnale proveniente dal marcatore fluorescente; uso di formammide di maggiore purezza nella preparazione del campione per l'elettroforesi capillare (*Budowle B. et al., 2009*); lavaggio post-PCR al fine di rimuovere gli ioni che competono con il DNA durante l'iniezione elettrocinetica (*Smith P.J., Ballantyne J., 2007; Foster L. et al., 2008; Budowle B. et al., 2009*); aumento del tempo di iniezione (*Budowle B. et al., 2009*).

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

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

In particolare, poiché la tipizzazione LCN non può per definizione fornire risultati riproducibili e quindi lo stesso risultato non può essere atteso qualora lo stesso campione venga analizzato una seconda volta, il metodo non può essere considerato robusto secondo gli standard convenzionali (*Budowle B. et al., 2009*).

2. Procedure di laboratorio

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

3. Problemi associati a basse quantità di templat

Sono numerosi i problemi che insorgono dall'analisi di quantità sub-ottimali di DNA templat in una PCR e tali problemi diventano sempre più evidenti con la riduzione della quantità del templat. Inoltre, l'interpretazione delle misture deve ancora essere ben definita.

I punti fondamentali del problema relativo alla bassa quantità di templat sono i seguenti: effetti stocastici, soglia di rilevazione, interpretazione del profilo, drop-out allelico e sbilanciamento dei picchi eterozigoti, stutter, contaminazione, analisi dei replicati, controlli appropriati, limitazioni di applicazione.

3.1 Effetti stocastici: A causa della cinetica del processo di PCR, una bassa quantità di template iniziale sarà soggetta ad effetti stocastici; infatti l'attacco del primer può non avvenire allo stesso modo per ogni allele ad un dato locus durante i primi cicli e pertanto si potrà notare un notevole sbilanciamento tra prodotti allelici o, in alcuni casi, la perdita totale di uno od entrambi gli alleli. In altre parole, un DNA template con le caratteristiche di LCN in una PCR potrà manifestare fenomeni stocastici di amplificazione visibili sia come sostanziale sbilanciamento di due alleli ad un dato locus eterozigote che come drop-out allelico o aumento delle stutter (Gill P. et al., 2000; Whitaker J.P. et al., 2001; Kloosterman A.D. et al., 2003; Smith P.J., Ballantyne J., 2007; Forster L. et al., 2008; Budowle B. et al., 2009).

3.2 Soglia di rilevazione: Solitamente, per la PCR è raccomandato l'utilizzo di DNA in quantità tali da ridurre gli effetti stocastici a livelli gestibili. Tuttavia, poiché differenze nella quantizzazione del template ed eventuali imprecisioni nel volume pipettato possono influenzare la quantità del DNA effettivamente presente nella PCR, deve essere usata una soglia stocastica di interpretazione dei risultati per la tipizzazione degli STR (*Minimum Interpretation Threshold "MIT"*, Budowle B. et al., 2009).

Un'altezza (o area) minima dei picchi, stabilita da studi di validazione interni al singolo laboratorio, serve pertanto come controllo stocastico ed ***i picchi che appaiono al di sotto di tale soglia non devono essere interpretati o possono esserlo con estrema cautela e per scopi ben limitati.*** Per quanto riguarda la tipizzazione LCN è necessario sottolineare che l'altezza dei picchi è sostanzialmente aumentata grazie a cicli di PCR aggiuntivi o a procedure di lavaggio post-PCR e pertanto, poiché la situazione di LCN si riferisce all'interpretazione di risultati che normalmente risulterebbero al di sotto della soglia stocastica di interpretazione, non può in questo caso sussistere il criterio basato sull'altezza minima dei picchi quale quello usato per la tipizzazione standard degli STR (con campioni contenenti dai 250 pg a 1 ng di DNA). Attualmente non esiste quindi un valido metodo per stabilire una soglia per la tipizzazione LCN e questo continuerà ad essere uno dei maggiori punti deboli dell'applicazione.

3.3 Interpretazione del profilo: I due fattori che influenzano la robustezza della tipizzazione LCN sono gli effetti stocastici e la sensibilità di rilevazione. I protocolli proposti per l'interpretazione di profili generati da LCN considerano, quindi, questi elementi caratteristici (Gill P. et al., 2000), ma mentre tali linee guida suggerite per l'interpretazione sono basate su studi di profili da una singola sorgente usando campioni

pressoché ottimali, la scarsa qualità che spesso caratterizza i campioni di interesse forense e le misture aumentano i problemi di interpretazione dei dati LCN.

Ad oggi non sono state ancora descritte delle linee guida ben sviluppate per l'interpretazione di LCN nei casi di misture. Poiché molti campioni da contatto sono misture (Gill P., 2001; Caddy B. et al., 2009), tale lacuna negli studi di validazione e nelle linee guida interpretative deve essere considerata una seria carenza.

3.4 Drop-out allelico: Il drop-out allelico è il fenomeno correlato alla tipizzazione LCN più semplice da descrivere. Se ad esempio un allele 15 viene osservato nella prova LCN, allora sulla base di quella prova ogni individuo omozigote per l'allele 15 oppure eterozigote 15, X (dove X può essere qualunque allele) non può essere escluso come potenziale contributore per quel campione. Al fine di supportare la prova, la regola del 2p può essere usata per ogni singolo allele ad un determinato locus (Budowle B. et al., 1991) e tale calcolo sarà di tipo conservativo. L'osservazione di 2 alleli ad un locus può essere ritenuta la rappresentazione di un profilo eterozigote e pertanto suggerire che il drop-out allelico non è avvenuto. Il *Likelihood ratio* per un campione da unica sorgente può essere calcolato usando $1/2fa$ per gli omozigoti e $1/2fafb$ per gli eterozigoti, dove fa è la frequenza dell'allele a ed fb la frequenza dell'allele b (Gill P. et al., 2000). Gill et al. (2000) raccomandavano inoltre di modificare i calcoli considerando la probabilità del drop-out allelico ($p(D)$). La $p(D)$ è basata sull'osservazione sperimentale. Tuttavia è difficile giustificare $p(D)$ basandosi esclusivamente su studi sperimentali usando campioni ottimali e applicando tale calcolo ad ogni singolo caso reale. Il drop-out è, infatti, correlato sia alla quantità che alla qualità del campione in esame. Questi parametri sono spesso indefinibili nei campioni LCN e sono specifici per ogni singolo campione. Il drop-out allelico non può essere chiamato in causa solo sulla base di studi di validazione controllati condotti in laboratorio e quindi ulteriori ricerche devono necessariamente essere portate avanti prima di poter fornire dei valori di $p(D)$.

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

replicate non è ancora stata studiata approfonditamente e si attendono inoltre raccomandazioni sull'interpretazione delle stutter in campioni misti.

3.6 Contaminazione: la Commissione DNA della ISFG nelle sue raccomandazioni per l'interpretazione delle misture dà la seguente definizione di contaminazione: *“DNA introdotto dopo il crimine e a partire da una sorgente non correlata alla scena del crimine: gli investigatori, i tecnici di laboratorio, lo strumentario del laboratorio”* (Howitt T., 2003; Gill P., Kirkham A., 2004).

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

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

Un'ulteriore difficoltà, evidente in particolare a proposito delle misture, risiede nella determinazione di quale allele possa costituire un drop-in. Infatti, queste difficoltà tendono a creare degli squilibri nella decisione se ci siano o meno i presupposti per una contaminazione.

Affermazioni sul profilo ricavato dal campione in esame riguardo la determinazione di quale sia un vero allele e quale un drop-in devono essere necessariamente pronunciate senza conoscere quale sia il profilo del sospettato; solo così può essere, infatti, garantito un approccio qualitativamente ineccepibile ed equilibrato nell'interpretazione del profilo emergente dal campione in esame. L'interpretazione del profilo ottenuto dal campione effettuata avendo a disposizione il profilo di riferimento del sospettato è indicativo di disequilibrio ed è in pieno contrasto con la natura assolutamente oggettiva delle scienze forensi.

A causa dei limiti della tipizzazione LCN occorre quindi estrema attenzione a non oltrepassare le pratiche di interpretazione di qualità al fine di garantire la minimizzazione dell'errore interpretativo.

Al di là dei rischi dovuti alla manipolazione dei campioni, quando viene analizzata una quantità così piccola di materiale di partenza, inevitabilmente si verifica un'esagerazione dei fenomeni stocastici a livello dei campioni stessi e ***aumentando la sensibilità del sistema aumenterà anche il rischio di contaminazione del campione in esame*** (Budowle B. et al., 2009).

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 repertazione delle prove ed alla stessa unità del DNA*** (Gill P., Kirkham A., 2004).

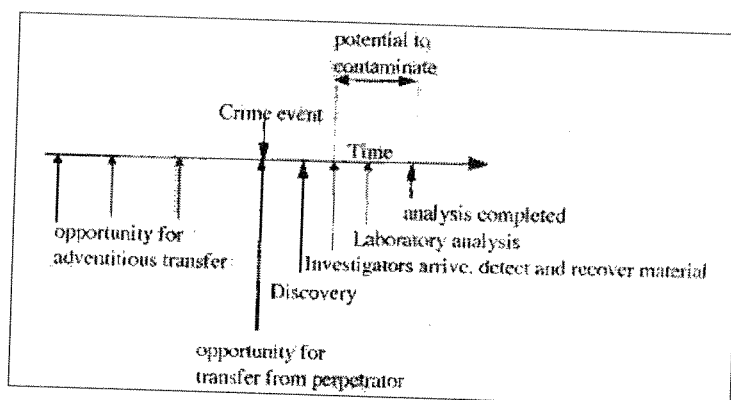


Figura 1: sequenza temporale generalizzata volta ad illustrare le possibili modalità attraverso le quali può avvenire la propagazione di un profilo di DNA.

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

rappresentano eventi tra loro dipendenti). A tale riguardo gli Autori sottolineano che il rischio principale della contaminazione (casuale) è l'errata esclusione, in particolare qualora il profilo contaminante mascheri quello del colpevole.

Gli Autori affermano che a loro parere le limitazioni descritte riguardo il Low Template - DNA (LT-DNA) devono essere applicate a tutti i metodi di tipizzazione del DNA, giacché potenzialmente tutti i profili di DNA possono essere soggetti a quegli stessi fenomeni che originariamente venivano attribuiti al LT-DNA. Essi ritengono, altresì, che *qualora vengano prese le dovute cautele e il Giudice reso edotto delle limitazioni della tecnica utilizzata, sarà compito di quest'ultimo valutare il peso della prova, mentre non spetta allo scienziato il ruolo di decidere, basandosi su criteri puramente arbitrari, se tale prova in esame debba o meno essere portata all'attenzione del Tribunale.*

I predetti Autori sottolineano, ancora, che un aspetto fondamentale è quello relativo al *peso della prova*. *Quest'ultima può nascere attraverso tre principali modalità: a) in modo cosiddetto "innocente"; b) come risultato dell'evento criminoso stesso; c) come risultato di contaminazione o trasferimento involontario* (Gill P., 2002). Esiste l'opinione pubblica generalizzata che *"se la prova del DNA corrisponde con il sospettato allora deve essere lui il colpevole del reato"*, e questa opinione si estende purtroppo anche ad alcuni scienziati, giudici ed avvocati. Esiste infatti la percezione che la mancata condanna significhi fallimento della scienza: ciò è estremamente pericoloso ed è quindi *fondamentale diffondere l'idea che la condanna o meno di un sospettato sia una questione irrilevante per lo scienziato, la cui responsabilità deve essere soltanto quella di illustrare correttamente la prova nel contesto dello specifico caso in esame.*

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

Si riportano di seguito le “**Precauzioni contro la contaminazione**” suggerite da **Butler J.M.** (2009) nei casi di campioni di materiale biologico contenenti basso quantitativo di DNA:

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

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

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

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

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

- *Le aree di lavorazione pre e post PCR dovrebbero essere fisicamente separate*
- *Lo strumentario così come le pipette e i reagenti per la PCR dovrebbero essere tenuti separati dagli altri strumenti di laboratorio, in particolare quelli usati per l'analisi dei prodotti di PCR*
- *Guanti monouso dovrebbero essere indossati e cambiati frequentemente*
- *Le reazioni dovrebbero essere preparate sotto una cappa aspirante, se disponibile*
- *Dovrebbero essere usati puntali aerosol-resistenti che dovrebbero essere cambiati per ogni campione al fine di prevenire cross-contaminazione durante il trasferimento dei liquidi*

- *I reagenti dovrebbero essere preparati con attenzione al fine di evitare la presenza di qualsiasi DNA o nucleasi contaminanti*

- *L'irradiazione ultravioletta della zona di preparazione della PCR quando la stessa area non è in uso così come la pulizia delle aree di lavoro e dello strumentario con isopropanolo e/o soluzioni di candeggina al 10% aiutano ad assicurare che molecole di DNA estraneo siano distrutte prima dell'estrazione del DNA o della preparazione della PCR.*

Il prodotto di PCR può evidenziare risultati che provengono da DNA amplificato che contamina un campione che non è stato ancora amplificato. Poiché il DNA amplificato è molto più concentrato rispetto al DNA templato non amplificato, il primo sarà copiato in modo preferenziale durante la PCR e quindi il campione non amplificato sarà nascosto.

Il trasferimento inavvertito anche di un minimo volume di un amplificato PCR in un campione di DNA non amplificato può risultare nell'amplificazione e nell'evidenziazione delle sequenza "contaminante".

Per questo motivo i campioni in esame vengono usualmente lavorati in laboratorio prima dei campioni di riferimento del sospettato al fine di evitare qualsiasi possibilità di contaminazione della prova con il DNA già amplificato del sospettato".

3.7 Analisi dei replicati

L'approccio maggiormente usato per la designazione di un allele in un campione LCN richiede la suddivisione del campione in 2 o più aliquote e la registrazione dei soli alleli che sono comuni ad almeno due replicati (Gill P. et al., 2000; Gill P., 2001; Gill P. et al., 2007). Il vantaggio di questo approccio è che se il drop-in avviene in modo casuale ed infrequente, l'osservazione di un allele per più volte aumenta l'affidabilità che esso sia effettivamente derivato dal campione in esame (assumendo che durante la fase di campionamento non si sia verificata contaminazione).

La maggior parte degli scienziati che lavorano con LCN sottolineano la necessità di effettuare 2-3 replicati e affermano che un allele deve essere osservato almeno 2 volte per poter essere denominato come tale (Taberlet P. et al., 1996, addirittura invocano fino a 7 replicati per aumentare l'affidabilità nella denominazione degli alleli): la ridondanza allelica nei replicati è pertanto alla base della affidabilità della tipizzazione LCN.

Tuttavia sia il numero esatto dei replicati che il numero di volte che uno stesso allele viene osservato ed il grado di affidabilità (quantitativamente o qualitativamente) devono essere meglio precisati.

Nella pratica, comunque, è necessario considerare che l'effettuazione di un numero maggiore di 2-3 replicati spesso non è possibile; pertanto le linee guida interpretative e le affermazioni sul grado di affidabilità devono essere applicate e dichiarate sulla base delle analisi di 2-3 replicati.

Il buon senso suggerirebbe che dividere un campione in multiple aliquote aumenti i limiti della tipizzazione LCN (Budowle B. et al., 2009) e che ogni sforzo possibile dovrebbe essere compiuto al fine di concentrare quanto più templatato possibile in una unica reazione: tuttavia, *ad oggi quello della ridondanza allelica rappresenta l'unico approccio accettato.*

Finora gli studi effettuati sulle diluizioni e sulla ridondanza si sono basati su campioni di controllo da laboratorio, del tutto diversi da quelli provenienti dai reperti relativi ai casi reali i quali posseggono quantità indeterminate (e spesso degradate) di DNA e possono contenere inibitori della PCR in grado di influenzare anche il drop-out allelico.

Pertanto, sulla base di queste numerose incertezze, sarebbe auspicabile la pronta definizione di *quali siano effettivamente i dati da riportare nella relazione finale considerando il numero dei replicati, il grado di affidabilità correlato all'incertezza sulla natura del campione in esame e alla sua qualità.*

3.8 Controlli

Un ulteriore problema caratteristico della tipizzazione LCN è quello relativo al numero e al tipo di campioni di controllo che dovrebbero essere utilizzati. Ad esempio, ancora non si è discusso riguardo il numero di controlli negativi che dovrebbero essere analizzati per verificare la sporadicità del drop-in. Inoltre, dovrebbe essere chiarito meglio che cosa sia da considerare un controllo positivo: dovrebbe essere ragionevole che i controlli positivi siano della stessa quantità di DNA presente nel campione da esaminare, cosa, in pratica, molto difficile poiché la quantità di DNA in un campione è sconosciuta e difficilmente approssimabile per campioni misti. Forse dovrebbe essere proposto un range di quantità di templatato (come ad esempio da 20 pg a 200 pg). Se un controllo positivo si avvicina in termini di quantità ad un campione LCN, allora si verificherà drop-out e probabilmente anche drop-in allelico: pertanto, se un controllo positivo non fornisce con attendibilità un risultato certo, allora il controllo stesso perde

la sua funzione. Queste problematiche relative a cosa rappresenti un controllo positivo appropriato devono essere affrontate.

3.9 Limiti della tipizzazione LCN

Alcune differenze della tipizzazione LCN rispetto a quella convenzionale degli STR possono incidere sulla sua utilità (Gill P., 2001; Budowle B. et al., 2009).

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

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

A tale riguardo gli aspetti fondamentali da ricordare sono i seguenti:

- 1- *la tipizzazione di LCN non è una tecnica riproducibile e questo limite deve sempre essere ben evidenziato nelle relazioni;*
- 2- *la contaminazione da manipolazione è possibile e tale possibilità deve essere sempre considerata;*
- 3- *un campione concentrato può fornire all'analisi dei risultati migliori rispetto ai replicati i quali usano la ridondanza allelica a fini interpretativi;*
- 4- *il numero e il tipo dei controlli utilizzati dovrebbe essere chiaramente definito e a questi dovrebbe essere attribuita una affidabilità quantitativa o qualitativa;*
- 5- *linee-guida di interpretazione non sono ad oggi ben definite e quelle esistenti riguardano solo i campioni da unica sorgente mentre l'interpretazione delle misture non è stata ancora validata;*
- 6- *la contaminazione o drop-in allelico può avere diverse origini;*

7- a causa dell'aumentata sensibilità della metodica, il trasferimento secondario non può essere escluso come possibile spiegazione per i risultati di tipizzazione LCN ottenuti;

8- kit per gli STR, reagenti ed altri materiali possono non essere stati sottoposti ad efficaci controlli di qualità al fine di riconoscere un'eventuale contaminazione da DNA estraneo;

9- interpretazioni statistiche e dati di supporto per il calcolo delle probabilità hanno bisogno di essere meglio definiti e sviluppati al fine di colmare l'incertezza associata con la tipizzazione LCN;

10- poiché l'analisi fornisce risultati da campioni infinitesimali, l'origine tissutale del DNA non può, ad oggi, essere desunta.

Secondo **Budowle B. et al. (2009)** *la tipizzazione LCN per sua natura non può essere considerata una metodica robusta.* Mentre gli sforzi riguardo l'implemento dell'uso di tale metodica si sono principalmente focalizzati sulla riduzione della contaminazione all'interno del laboratorio e sull'utilizzo della ridondanza per l'affidabilità, un approccio più adeguato potrebbe oggi essere quello di migliorare le fasi di repertazione, estrazione e PCR.

Gli approcci da considerare comprendono:

- il **miglioramento della metodologia di repertazione sulla scena del crimine** e la preparazione del personale addetto alle indagini in tale luogo;

- **l'incremento nell'efficienza del recupero e della resa da uno strumento di raccolta e/o dall'estratto al fine di cercare di aumentare la quantità di DNA templatato** disponibile in modo da non dover classificare tale campione come LCN ma poterlo quindi analizzare secondo le metodiche convenzionali (Budimlija Z.M. et al., 2005; Schiffner L.A. et al., 2005);

- **migliorare la PCR in modo che gli effetti stocastici siano meno importanti con quantità limitate di DNA templatato;**

- **considerare gli SNPs come markers genetici di primaria utilità per il DNA di bassa quantità e degradato** (Budowle B., van Daal A., 2008; Sanchez J.J. et al., 2006);

- **migliorare la qualità del campione di DNA (e la quantità del templatato disponibile) usando DNA repair e/o metodiche di Whole Genome Amplification** (Smith P.J., Ballatyne J., 2007; Nunez A.N. et al., 2008).

Caragine T. et al. (2009) illustrano le modifiche apportate ai protocolli comunemente utilizzati in ambito di analisi STR al fine di migliorare il basso tasso di successo relativo alla tipizzazione LCN.

Tali modifiche consistono sostanzialmente:

- *nel potenziamento della PCR tramite l'aumento del numero di cicli;*
- *nella riduzione del volume di reazione ed nel raddoppio del tempo di annealing;*
- *modifiche a livello dell'elettroforesi capillare, ove si è proceduto all'aumento del tempo di iniezione e del voltaggio (Bajda E. et al., 2004).*

Sottolineano gli Autori che ***intensificare il segnale del DNA attraverso queste metodiche aumenta inevitabilmente il rischio di evidenziare una contaminazione.***

Le misure di protezione consigliate e utilizzate dagli Autori stessi al fine di ***ridurre al minimo la possibilità di contaminazione*** sono le seguenti:

- *il personale di laboratorio - che deve sempre indossare doppi guanti, cuffia per capelli, calzari, occhiali di protezione e camice - deve lavorare esclusivamente in locali dedicati all'analisi di campioni LT-DNA o di pre-amplificazione;*
- *Per ogni fase della procedura devono essere, quindi, allestite delle cappe aspiranti (Kwok S., Higuchi R., 1989). I guanti monouso devono essere sostituiti tra l'esame dei singoli reperti, tra un'analisi e l'altra, e più volte durante la preparazione di uno stesso campione;*
- *Le superfici dei piani di lavoro, i materiali e lo strumentario devono essere lavati prima con candeggina al 10%, poi con acqua ed infine con etanolo al 70%, sia prima che dopo ogni procedura e così anche tra l'analisi di un reperto e l'altro*
- *Deve essere altresì effettuata una profonda pulizia settimanale dell'intero laboratorio e delle attrezzature. Tutto lo strumentario e l'acqua devono essere irradiati in cappa a raggi UV prima dell'uso;*
- *Riguardo invece alle procedure manuali si sottolinea che deve essere aperta una sola provetta-campione alla volta, usando un apritore per provette pulito o in alternativa un fazzoletto di carta;*
- *Prima di analizzare i campioni all'elettroforesi capillare, lo standard (quello utilizzato dagli Autori per questo studio di validazione è il GeneScan® 500 LIZ® Size Standard) deve essere fatto correre da solo per verificare l'assenza di DNA esogeno nel capillare;*

• *Tutti i reagenti utilizzati nelle fasi di estrazione, quantificazione, amplificazione e separazione devono essere preventivamente testati al fine di verificare l'assenza di DNA esogeno.*

Sia i campioni in esame che i controlli negativi utilizzati per gli esperimenti illustrati in questo lavoro sono stati amplificati in triplo con il kit AmpFISTR Identifier[®] secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice, con l'eccezione del tempo di annealing di 2 minuti e il volume di reazione dimezzato, con 2.5 U di Taq per 31 cicli di PCR. I dati sono stati poi analizzati con i software di analisi GeneScan[®] e Genotyper[®] (Applied Biosystems) con una soglia di altezza dei picchi di 75 RFU (Relative Fluorescence Units).

Il profilo di consenso, chiamato anche profilo composito, è stato quindi generato includendo tutti gli alleli che erano stati denominati in almeno 2 su 3 replicati.

L'amplificazione di campioni LT-DNA produce tipicamente fenomeni stocastici come il drop-in e il drop-out allelico, lo sbilanciamento dei picchi nell'ambito dello stesso locus e un aumento degli stutter. Nello studio in esame, tali effetti sono stati evidenziati per quantità di DNA pari ed inferiori a 100 pg, ed in particolare per valori al di sotto di 50 pg. Nonostante gli effetti di drop-out per le più basse quantità di DNA, questa metodica che prevede il potenziamento dei suddetti parametri ha permesso di ottenere buone intensità di picchi, spesso oltre 1000 RFU.

Gli esperimenti praticati hanno inoltre mostrato che, nonostante la scrupolosa applicazione di adeguati protocolli al fine di minimizzare le possibili sorgenti di drop-in interne al laboratorio, ci si deve comunque sempre aspettare di osservare alcuni alleli spuri nei controlli negativi.

Recentemente anche **Butler J.M.** e **Hill C.R.** (2011) hanno affermato che, trovandosi di fronte alle scarse informazioni fornite da basse quantità di DNA, gli scienziati forensi si troveranno sempre ad affrontare la questione di quanto spingere oltre le metodiche di analisi del DNA. L'analisi di "low copy number" (LCN) nota anche come analisi di "low template DNA" (LT-DNA), si riferisce al potenziamento della sensibilità di riconoscimento usualmente attraverso l'aumento del numero di cicli di PCR. Gli effetti stocastici correlati a questo tipo di analisi sono il drop-out allelico o di locus, mentre *l'aumento di sensibilità della metodica rappresenta un maggiore*

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.

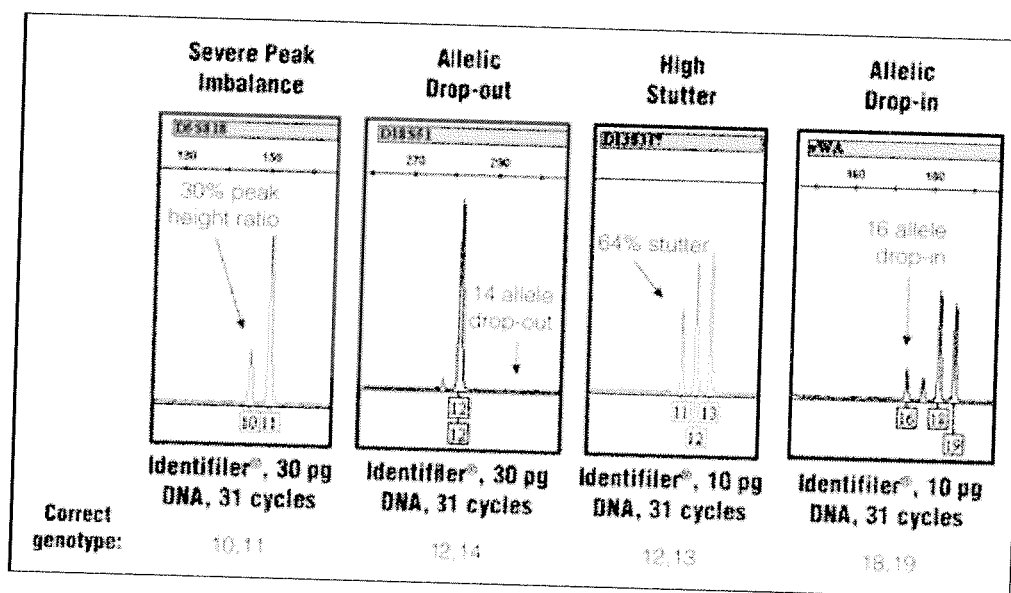


Figura 2. Effetti stocastici che avvengono casualmente durante l'amplificazione di basse quantità di DNA con un aumentato numero di cicli di PCR.

Mentre gli effetti stocastici si verificano sempre qualora basse quantità di DNA siano sottoposte a PCR (Figura 2), ***un approccio con replicati di amplificazione con lo sviluppo di un profilo di consenso a partire dagli alleli replicati può fornire risultati attendibili*** (Figura 3). Tuttavia, risultati di amplificazione a partire da una singola analisi possono essere inattendibili a causa del drop-out o drop-in allelico, così come precedentemente notato. I singoli risultati possono variare anche tra i replicati, ma un profilo di consenso combinato può fornire una risposta accurata qualora gli alleli che si ripetono vengano riportati.

Ogni laboratorio si trova a dover affrontare l'analisi di campioni con basse quantità di DNA. I laboratori ed il personale tecnico devono decidere se tentare o meno una "*enhanced interrogation technique*" quale l'incremento del numero di cicli, la desalificazione dei campioni o l'aumento dell'iniezione all'elettroforesi capillare. Se viene applicato tale approccio, devono essere attuati studi di validazione al fine di sviluppare appropriate linee guida interpretative e stabilire il grado di variazione che può essere atteso nell'analisi di basse quantità di DNA. Decidere quando interrompere l'analisi o l'interpretazione dei risultati può essere difficile. Alcuni laboratori interrompono l'analisi sulla base di una determinata quantità di DNA di partenza, utilizzando i dati relativi alla validazione per stabilire una soglia di quantizzazione. Altri usano soglie stocastiche che vengono utilizzate nell'interpretazione dei dati per decidere quali risultati di tipizzazione STR sono affidabili (ad esempio laddove non ci si aspetti di trovare drop-out allelico a quel determinato locus). Gli Autori concludono quindi affermando che l'esecuzione di esperimenti simili a quelli descritti in questo articolo può aiutare a determinare un'appropriata soglia stocastica.

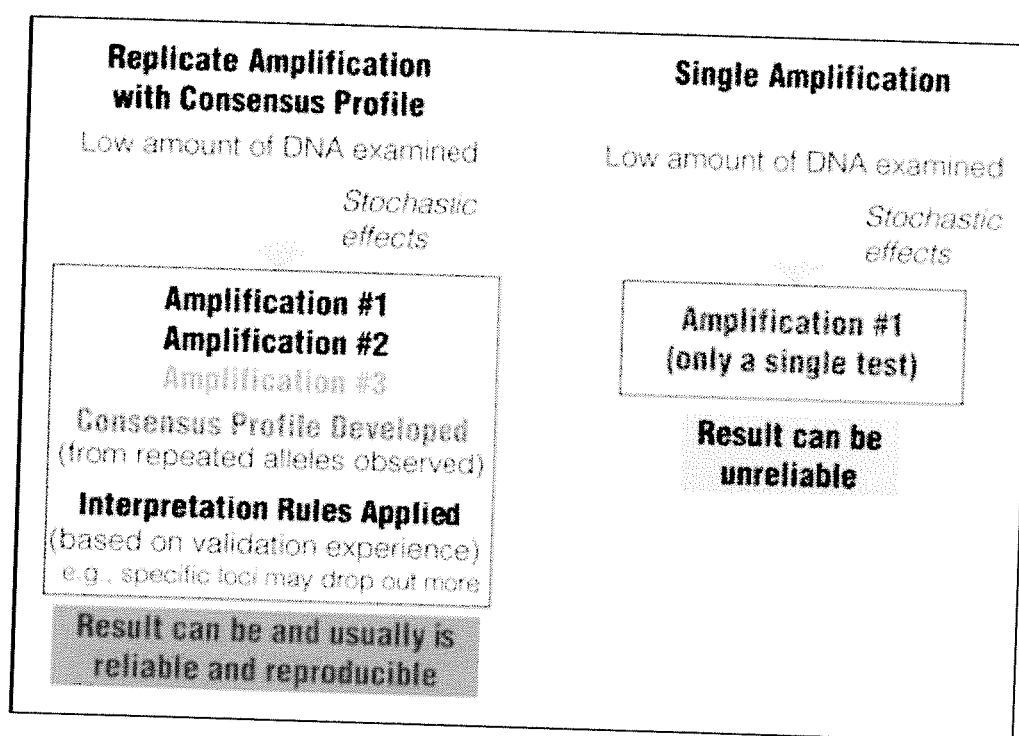


Figura 3. Confronto tra approcci diversi nell'analisi di basse quantità di DNA. L'amplificazione di replicati con sviluppo di un profilo di consenso e l'applicazione di regole interpretative basate sull'esperienza di validazione possono portare a risultati affidabili.

Solo pochi mesi fa, da parte di alcuni scienziati (*"Publications and letters related to the forensic genetic analysis of low amounts of DNA"*, *Forensic Science International: Genetics* 5 (2011) 1-5, Editorial) è stato sottolineato il fatto che, in particolare nel corso degli ultimi due anni, numerose pubblicazioni, comunicazioni e lettere su numerose riviste scientifiche hanno affrontato il tema delle problematiche scientifiche, tecniche e giuridiche legate alle metodiche ed ai protocolli per la tipizzazione LCN. L'improvviso incremento nelle pubblicazioni relative a tale argomento è stato stimolato da due importanti casi giudiziari, rispettivamente di Regno Unito e Stati Uniti (*The Queen v Sean Hoey*, Neutral Citation Number [2007] NICC 49; *The People v. Hemant Megnath*, Ind. No. 917/2007, *Frye Hearing*, 2010), che hanno stimolato un acceso dibattito sulla questione se la tipizzazione di basse quantità di DNA con l'utilizzo di procedure di laboratorio modificate quali l'aumento del numero di cicli della PCR, metodiche di purificazione post-PCR e/o condizioni di aumentata iniezione all'elettroforesi capillare siano state sufficientemente validate dai laboratori che le

applicano nei casi di routine. Inoltre, ulteriori problematiche affrontate hanno riguardato il fatto che non siano ancora disponibili approcci adeguati e generalmente accettati per quanto concerne l'interpretazione biostatistica dei risultati ottenuti a partire dai protocolli così modificati, sebbene l'idea di base di usare un maggior numero di cicli di PCR per i campioni più difficili sia stata pubblicata ormai più di un decennio fa (*Gill P. et al., 2000; Whitaker J.P. et al., 2001*). La stessa rivista scientifica in questione afferma inoltre di aver accettato, nel corso dell'ultimo anno, numerose lettere all'Editore con l'intenzione di assicurare un libero scambio di opinioni ma di essersi infine vista costretta ad interrompere questa serie di scambi poiché questi, anziché tendere ad apportare nuove indicazioni o conoscenze sull'argomento, si limitavano ad affermazioni provocatorie e sterili critiche. Tuttavia, gli Editori della stessa rivista invitano all'invio di lavori relativi a ricerche scientifiche originali che possano fornire nuove informazioni sulla validazione e l'interpretazione dei risultati ottenuti dalla tipizzazione di DNA di bassa quantità e/o qualità.

Si ritiene opportuno, infine, riportare, per completezza, le **modalità di acquisizione del Rep.36**.

Dal verbale d'udienza della Corte d'Assise del 28/02/2009 (pag.175), l'ispettore Finzi Armando in servizio presso la Squadra Mobile a domanda se in occasione della perquisizione in casa di Raffaele Sollecito *"Indossavate degli abiti ordinari oppure avete usato delle precauzioni?"* R *"Eravamo tutti in borghese, chiaramente e prima di fare ingresso all'interno dell'abitazione abbiamo indossato tutti quanti guanti e calzari"*.

Non è chiaro da chi sia stato repertato il coltello: (Corte d'Assise ud. 27/02/2009, pag.158) Chiacchiera Marco: ***"L'ho preso, messo dentro la busta, chiuso, sigillato e riportato in questura"***; Finzi Armando: ***"E' il primo oggetto che ho preso, mi sono girato e l'ho fatto vedere al dottor Chiacchiera dicendogli che secondo me quel coltello lo dovevamo prendere perché dopo intuito investigativo..."*** (Corte d'Assise ud. 28/02/2009, pag.178) ed è stato posto dentro una *"busta nuova dove io tengo i guanti, i guanti nuovi"* *"...Ho aperto la busta e l'ho messo all'interno della busta simile a questa, dopodiché l'ho messo all'interno della cartellina e l'ho chiusa e ho continuato la perquisizione"* (Finzi Armando, Corte d'Assise ud. 28/02/2009, pag.179); D *"Quindi allora possiamo chiarire, lei inserisce il coltello che trova in questa busta cartacea simile a quella e la sigilla è giusto dire questo, con dello schoth?"* R *"Sì, non li sul*

posto, in Questura dopo aver fatto l'atto la sigillo con un filo di schoth, ma non era proprio sigillata, erano due lembi, ho chiuso due lembi tanto per non far aprire la busta" (Corte d'Assise ud. 28/02/2009, pag.190).

Dagli atti emerge un ulteriore passaggio di mano del reperto 36 in Questura (Corte d'Assise, ud. 28/02/2009, pag. 202: Gubbiotti Stefano *"Ho preso il coltello e l'ho messo all'interno della..."* D *"L'ha tolto dalla busta con i guanti?"* R *"L'ho tolto dalla busta con i guanti perché il volume della busta, non mi permetteva di poterla mettere all'interno di questa scatola"* *"E l'ho messo nella scatola e l'ho repertata, poi l'ho chiusa con il nastro"*.

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

Da quanto precedentemente esposto riteniamo che dalla documentazione in atti emergano inesattezze e lacune sui procedimenti analitici eseguiti sul reperto 36.

In particolare:

- in merito alla natura del materiale repertato **non sussistono elementi scientificamente probanti la possibile natura ematica della traccia B** (lama del coltello) in quanto sia la diagnosi generica di sangue sia la diagnosi di specie umana sono risultate negative.

Altrettanto **priva di basi scientifiche è la presenza di presunte cellule di sfaldamento** sulle campionature effettuate sull'impugnatura del coltello.

Pertanto ribadiamo che le ipotesi formulate dalla CT circa la natura del materiale prelevato sul Rep.36 sono del tutto arbitrarie in quanto non supportate da riscontri obiettivi.

- Va sottolineato che è del tutto carente la documentazione in atti relativa alla **tracciabilità** delle operazioni analitiche eseguite.

In particolare:

- a) per quanto riguarda le analisi di **quantificazione** del DNA, sia nella Relazione Tecnica Indagini di Genetica Forense (RTIGF) sia in sede GUP, la CT ha ripetutamente affermato di avere eseguito la quantificazione *mediante Real Time PCR su tutte le*

campionature effettuate sul coltello, **ma questa affermazione è smentita dalla documentazione prodotta**: in realtà per le campionature A-B-C è stato utilizzato il Fluorimetro QubitTM.

Per quanto riguarda la **traccia A** (impugnatura del coltello) emerge dai risultati ottenuti (Fluorimetro QubitTM) che la concentrazione di DNA in tale campione era pari a 0,08 ng/μl.

Tenuto conto che la “quantità di estratto” era di 50 μl (cfr. SAL), moltiplicando 0.08 ng/μl x 50 μl, il DNA totale era pari a 4 ng, quantitativo certamente rilevante, che consentiva di ritenere **positiva alla quantificazione** la traccia A.

Il quantitativo di DNA utilizzato per la successiva amplificazione (0.8 ng) rientrava nel range suggerito dal kit (0.5-1.25 ng/μl di DNA template) ed ha fornito un tracciato elettroforetico di buona qualità, in accordo con il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione.

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”**, ovverosia 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).**

b) in merito all’**estratto** ottenuto dalla **campionatura B** (lama del coltello), dallo Stato Avanzamento Lavori (SAL) si evince che tale estratto era pari a 50 μl. In sede di

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 immagina?*” 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 del 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 quantità sub-ottimali di DNA (sbilanciamento dei picchi, drop-in, drop-out) Autori diversi hanno proposto approcci scientifici in gran parte sovrapponibili che possano rendere più agevole l’interpretazione dei dati ottenuti.

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, poiché il DNA amplificato è molto più concentrato del DNA templatato 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...”*).

Altro elemento fondamentale riguarda il procedimento da seguire per un'affidabile *interpretazione dei risultati* e per la designazione di un allele in un campione LCN. Il *procedimento* riconosciuto valido dalla Comunità Scientifica Internazionale è dato *dall'analisi dei replicati* ovverosia si richiede la suddivisione del campione in due o più aliquote e vanno considerati alleli solo quei picchi che si ripetono in almeno due replicati.

Il vantaggio di questo approccio consiste nel fatto che se la contaminazione avviene in maniera casuale ed infrequente l'osservazione di un allele per più volte aumenta l'affidabilità che esso sia effettivamente derivato dal campione in esame, *assumendo che durante la fase di campionamento non si sia verificata contaminazione.*

La maggior parte degli scienziati che lavorano su LCN sottolineano la *necessità di effettuare 2-3 replicati ed affermano che un allele deve essere osservato almeno due volte per poter essere denominato come tale*: la ridondanza allelica è a tutt'oggi la metodica riconosciuta ed accettata, ed è alla base dell'affidabilità della tipizzazione LCN: (udienza GUP 05.10.08, pag. 21-22, alla domanda "...l'esame su un dato di traccia di questo genere dovrebbe essere ripetuto più volte per essere ritenuto affidabile? La CT risponde "In teoria si" a domanda "Lei quante volte l'ha fatto" risponde "In questo caso una sola volta" D. "Una sola volta e quindi è stato in teoria perché dovrebbe essere ritenuto più affidabile se lo si fa più volte?" R "Perché c'è la riproducibilità del dato che, diciamo, è una buona norma in qualunque esperimento scientifico a prescindere dalla genetica forense, un dato ovviamente per essere ritenuto valido deve essere ripetibile").

Pertanto tenuto conto che nel caso specifico:

- *non risulta che le modalità di sopralluogo siano state eseguite secondo i protocolli internazionali al fine di minimizzare la contaminazione ambientale;*
- *non sono stati applicati i protocolli internazionali di raccolta e campionamento del reperto al fine di minimizzare la contaminazione da manipolazione;*
- *non è noto se nel laboratorio siano state applicate le rigorose procedure di decontaminazione al fine di minimizzare la contaminazione da laboratorio;*
- *non è stato impiegato un metodo affidabile per la quantificazione del DNA sulle tracce A-B-C e la quantificazione eseguita con Fluorimetro Qubit™ ha fornito, per*

le tracce B-C un risultato “too low” indicativo della presenza di un quantitativo di DNA al di sotto della soglia di sensibilità del Fluorimetro (<200 pg/μl) e quindi indicativo della presenza di un reperto verosimilmente LCN;

- *dai tracciati elettroforetici esibiti si evince che il campione indicato con la lettera B (lama del coltello) doveva essere considerato un campione LCN (sbilanciamento dei picchi, RFU al di sotto di 50 per la maggior parte degli alleli) ed in quanto campione LCN avrebbero dovuto essere applicate tutte le cautele indicate dalla Comunità Scientifica Internazionale tra le quali ricordiamo:*

a) *rigoroso rispetto delle modalità di decontaminazione dello strumentario , del laboratorio e del personale stesso* (come già detto, non sono riportate la procedure adottate per minimizzare la contaminazione);

b) *analisi del reperto in un laboratorio ove non erano stati analizzati i reperti ascrivibili alla vittima*, al fine di evitare qualsiasi possibilità di contaminazione della prova con DNA già amplificato. *Per contro è stato riferito che il reperto è stato inserito per le analisi in un contesto ove erano già stati esaminati un numero rilevante di campioni appartenenti alla vittima* (Verbale udienza Corte d’Assise del 23.05.09, pag. 29-30) “...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...);

c) *esecuzione di 2-3 amplificazioni di replicati con sviluppo di un profilo di consenso. Nel caso in esame l’amplificazione è stata eseguita una sola volta* pertanto la mancata amplificazione di replicati con sviluppo di un profilo di consenso fornisce risultati inaffidabili, (Udienza GUP 05.10.08, pag. 21-22, alla domanda “...l’esame su un dato di traccia di questo genere dovrebbe essere ripetuto più volte per essere ritenuto affidabile? La CT risponde “In teoria sì” a domanda “Lei quante volte l’ha fatto “ risponde “In questo caso una sola volta” D.” Una sola volta e quindi è stato in teoria *perché dovrebbe essere ritenuto più affidabile se lo si fa più volte?*” R “Perché c’è la riproducibilità del dato che, diciamo, è una buona norma in qualunque esperimento scientifico a prescindere dalla genetica forense, *un dato ovviamente per essere ritenuto valido deve essere ripetibile*”;

d) impiego di controlli negativi nella procedure di amplificazione al fine di verificare la presenza di contaminazione, Negli elettroferogrammi allegati non sono riportati né i controlli negativi né i controlli positivi.

Ciò premesso nel caso specifico si possono trarre le seguenti conclusioni:

- relativamente **alla campionatura A** (impugnatura del coltello: cod. identificativo 47329), tenuto conto delle considerazioni precedentemente espresse circa il tracciato elettroforetico che presenta picchi che superano la soglia di 50 RFU e bilanciamento allelico ($Hb = \varphi_a / \varphi_b > 0.60$) in accordo con il presumibile quantitativo di DNA utilizzato per la reazione (0.8 ng), *si concorda con la conclusione cui è giunta la CT circa l'attribuzione del profilo genetico ottenuto da tale campionatura a Knox Amanda Marie;*

- relativamente alla **campionatura B** (lama del coltello: codice identificativo 47330), sulla base delle considerazioni precedentemente espresse circa il tracciato elettroforetico che presenta picchi al di sotto della soglia di 50 RFU e sbilanciamento allelico ($Hb = \varphi_a / \varphi_b < 0.60$) indicativo di un campione Low Copy Number (LCN), tenuto conto che nel caso specifico non è stata seguita alcuna delle raccomandazioni della Comunità Scientifica Internazionale, relativa al trattamento di campioni Low Copy Number (LCN), *non si condividono le conclusioni circa la certa attribuzione del profilo rilevato sulla traccia B alla vittima Kercher Meredith Susanna Cara poiché il profilo genetico, così come ottenuto, appare inattendibile in quanto non supportato da procedimenti analitici scientificamente validati.*

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

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

Dalla disamina della Relazione Tecnica Indagini di Genetica Forense (RTIGF), redatta in data 12 giugno 2008 dalla dr.ssa Patrizia Stefanoni, Direttore Tecnico Principale Biologo della Polizia di Stato, si evincono i seguenti dati in merito al prelievo di tracce biologiche, alle analisi di laboratorio eseguite ed all'interpretazione degli elettroferogrammi relativi al Rep. 165B.

ANALISI DI LABORATORIO

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

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

Codice Sample ID= 48896

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

Tipo di Traccia: PRESUNTA SALIVA

Descrizione Traccia: Presunte cellule di sfaldamento-B (ganci)

Quantità estratto: 50

Ubicazione estratto: 271/F1

Analisi eseguite

Data 1^ estrazione: 29-12-07

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

Si ritiene che sarebbe stato necessario procedere all'analisi morfologica per la ricerca di cellule, eventualmente presenti, mediante colorazione con uno dei reattivi comunemente impiegati in istologia (ematossilina). Tale indagine, di semplice e rapida esecuzione, avrebbe richiesto un minimo quantitativo di materiale che non avrebbe in alcun modo compromesso le successive indagini di laboratorio ma avrebbe potuto chiarire la natura del materiale asportato dal reperto in esame.

Nonostante le omesse indagini per la ricerca di cellule (e quindi la mancata identificazione del materiale asportato dal reperto 165B) la CT ha ipotizzato la presenza di "presunte cellule di sfaldamento" sul predetto reperto.

L'ipotesi formulata dalla CT, circa la natura del materiale analizzato (ipotesi confermata in sede di udienza GUP e in Corte d'Assise), è del tutto arbitraria in quanto non supportata da alcun riscontro *scientificamente* obiettivo.

ESTRAZIONE DEL DNA

L'**estrazione del DNA** è stata eseguita dal Rep.165B utilizzando l'estrattore automatico *BioRobot "EZI" (Qiagen)* (pag.201 della RTIGF).

Dalla Scheda Avanzamento Lavori (SAL) si evince che:

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

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Successivamente è stata eseguita la quantificazione del DNA estratto dal Rep.165B.

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

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

Da quanto riportato nella tabella predetta si evince che la quantificazione del DNA è stata effettuata 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 detta quantificazione.

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

$$48896 = 0.14$$

$$48896 = 0.09$$

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

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

AMPLIFICAZIONE STRs AUTOSOMICI

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

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

A pag 31 della CT sono riportate le modalità di “*amplificazione mediante PCR*” degli STRs autosomici:

*“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 “**AmpFISTRIdentifiler**” della Applied Biosystem (Foster City, CA) secondo gli “User Manual”.*

Si ricorda che, per quanto riguarda il kit *AmpFISTR Identifiler*, le indicazioni fornite dalla ditta produttrice, per una corretta amplificazione, sono le seguenti:

- *N. campioni x 10.5 µl di AmpFISTR PCR Reaction Mix;*
- *N. campioni x 0.5 µl di AmpliTaq Gold DNA Polymerase;*
- *N. campioni x 5.5 µl di AmpFISTR Identifiler Primer Set;*
- *10 µl di DNA con concentrazione ± 0.125 ng/µl;*
- *Volume finale della reazione 25 µl;*

Il range di concentrazione del DNA consigliato dalla ditta produttrice è pari a 0.5-1.25 ng/µl.

Parallelamente ai campioni in esame **devono essere allestiti controlli** al fine di monitorizzare l'efficacia delle condizioni di amplificazione prescelte e/o la presenza di contaminazione.

I controlli includono tipicamente un “controllo negativo” ed un “controllo positivo”.

Il “**controllo negativo**” è costituito da: *Mix di amplificazione di PCR (senza alcun DNA templat) + acqua o buffer* (utilizzati nelle fasi precedenti di estrazione e diluizione), negli stessi volumi utilizzati per amplificare le tracce in esame.

La finalità dell’inserimento nella fase di amplificazione del controllo negativo è quella di accertare se i reagenti utilizzati per l’estrazione e per la diluizione del DNA, ottenuto dai campioni in esame, siano privi di DNA ovverosia *consente di verificare se sia presente contaminazione da DNA estraneo*.

Il “**controllo positivo**” è costituito da: *Mix di amplificazione di PCR + DNA templat standard di sequenza nota* (fornito dalla ditta produttrice del kit), negli stessi volumi utilizzati per l’amplificazione delle tracce in esame.

La finalità del controllo positivo è di assicurare che i componenti ed i parametri della reazione siano corretti e pertanto idonei ad amplificare le regioni di DNA di interesse, in sintesi *consente di monitorizzare l’efficacia delle condizioni sperimentali prescelte*.

Tenuto conto di quanto riportato nella RTIGF (pag. 202) e dell’assenza di annotazioni specifiche nel SAL si deve ritenere che non sia stata apportata alcuna modifica alle indicazioni fornite dalla ditta produttrice del kit circa i volumi da impiegare per le reazioni di amplificazione ovverosia che sia stato impiegato un volume totale di 25 µl costituito rispettivamente da:

15 µl di Mix di amplificazione + 10 µl di DNA estratto

Pertanto, il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione PCR è stato di 1.15 ng (0.115 ng/µl x 10 µl=1.15 ng).

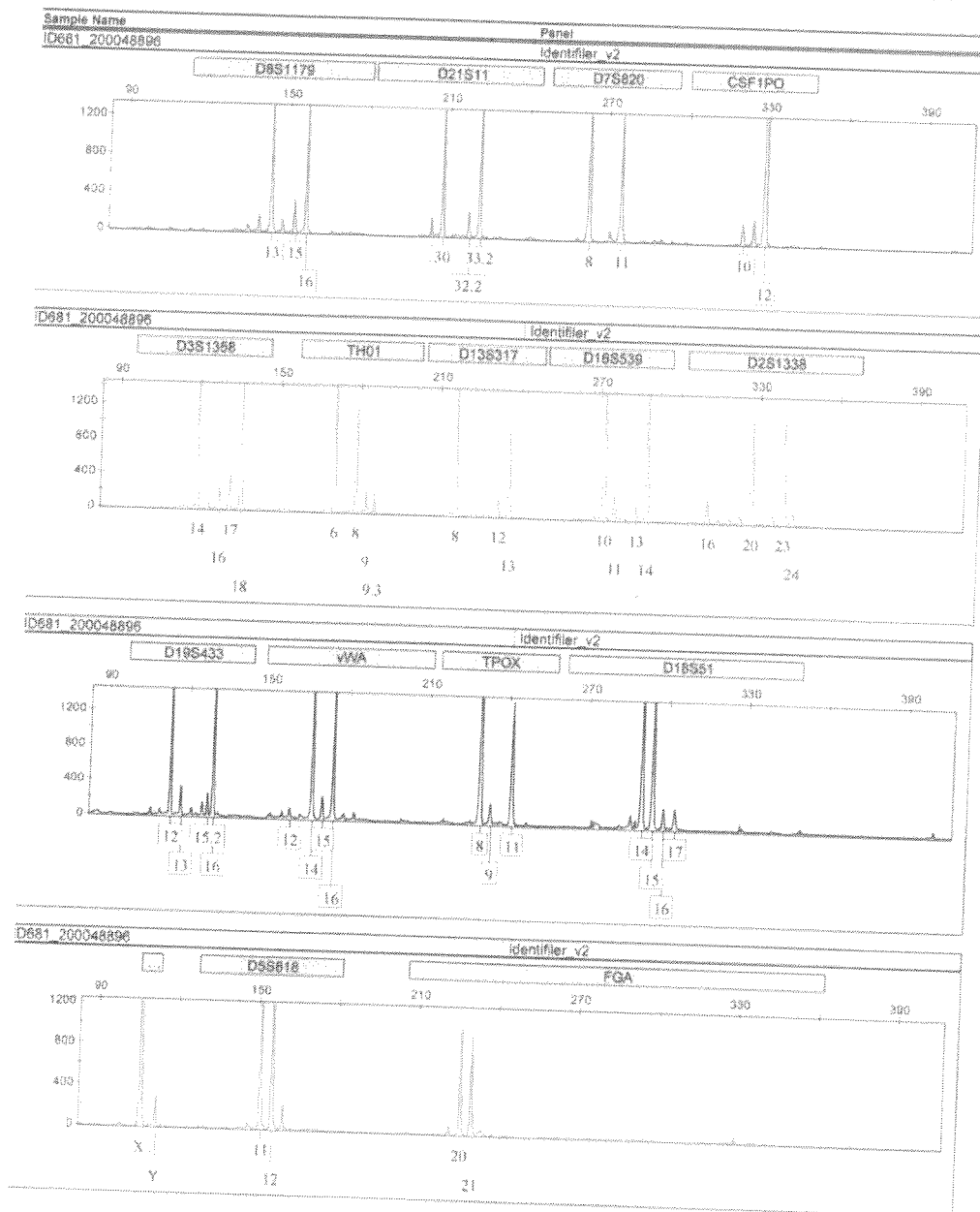
Quindi un quantitativo di DNA che rientra nel range suggerito dai kit (0.5-1.25 ng/µl di DNA templat).

ELETTROFORESI CAPILLARE STRs AUTOSOMICI

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

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

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



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

Successivamente la CT conclude che "Il confronto effettuato tra il genotipo derivante dalla traccia B del Rep.165 con quelli appartenenti a **SOLLECITO Raffaele** e **KERCHER Meredith Susanna Cara** (riscontri effettuati, rispettivamente, con il profilo genetico 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 é compatibile con l'ipotesi di **mistura di sostanze biologiche** (presumibilmente cellule di sfaldamento) appartenenti a **SOLLECITO Raffaele** ed a **KERCHER Meredith Susanna Cara**".

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

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”*.

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 %.

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

“6. Treatment of stutter

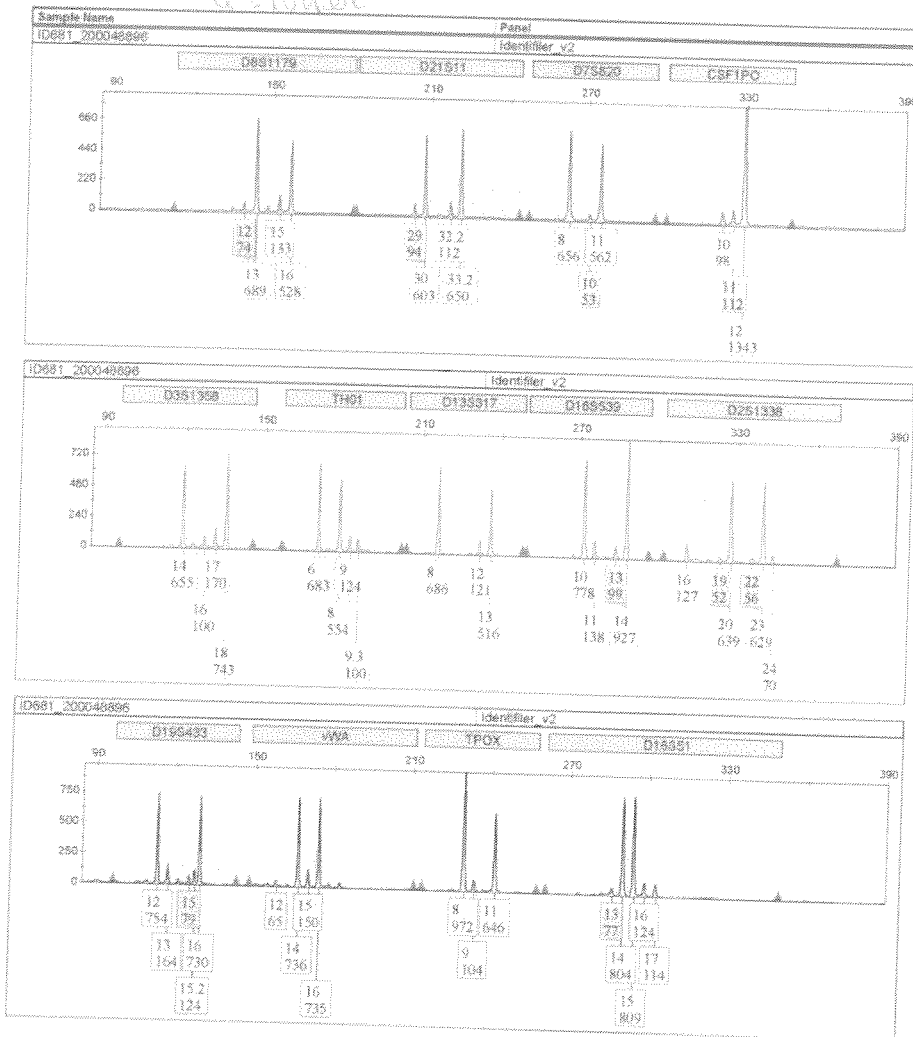
Le caratteristiche delle bande stutter (una ripetizione in meno rispetto all’allele vicino) sono state valutate in relazione alla misura dell’allele vicino associato.

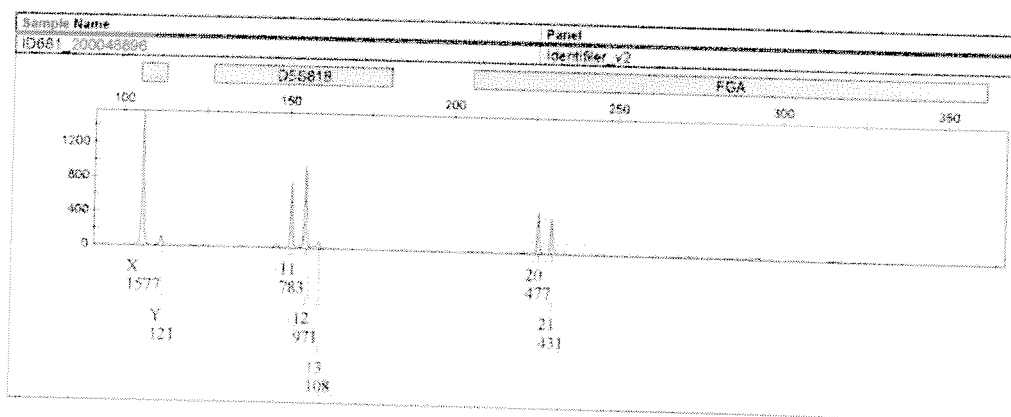
L’area o l’altezza dei picchi stutter viene misurata come proporzione (St_p) dell’area o altezza dell’allele vicino.

$$St_p = \Phi_{stutter} / \Phi_{allele}$$

In generale $St_p < 0.15$ ”

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

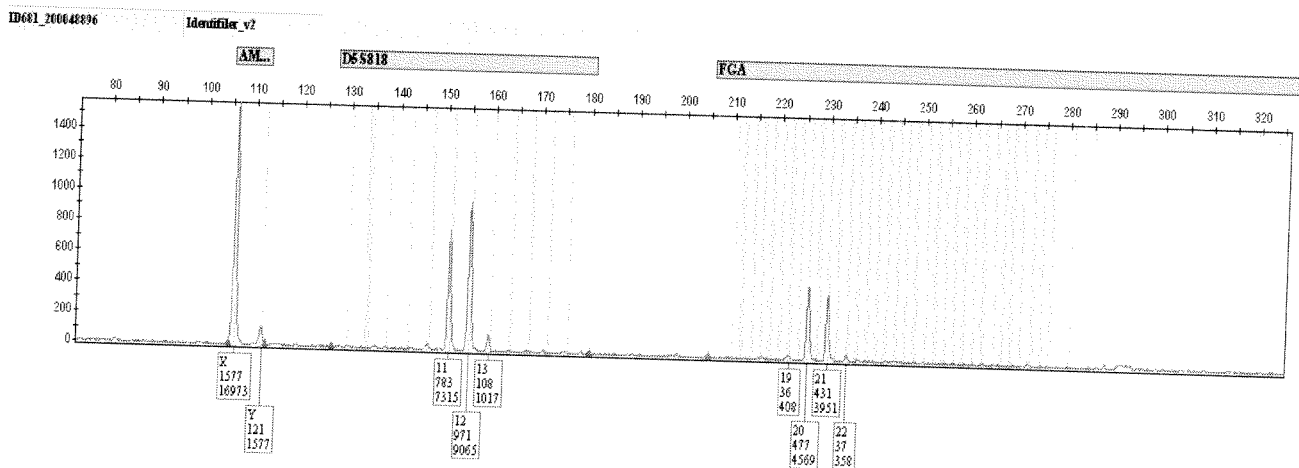
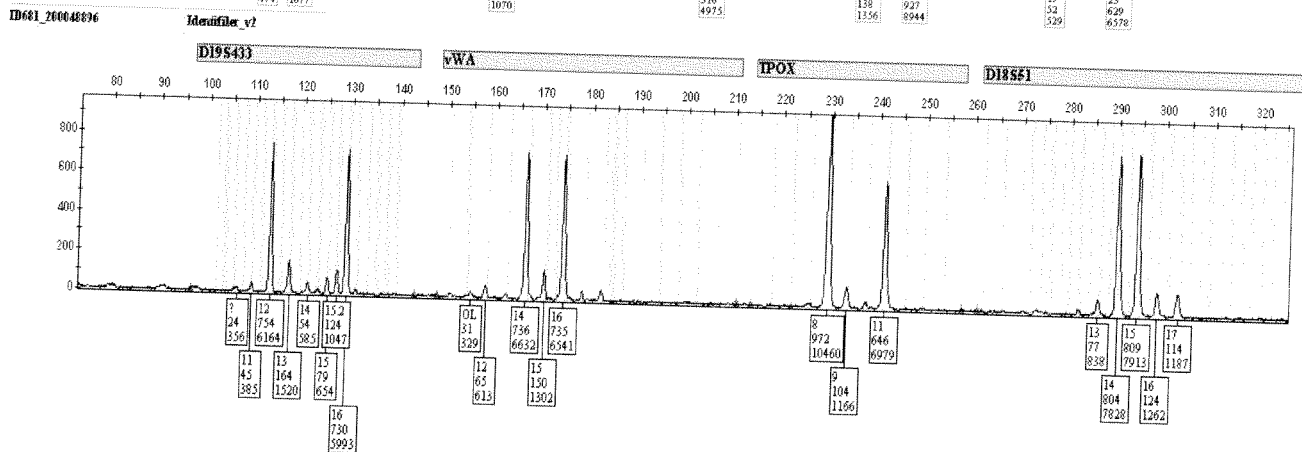
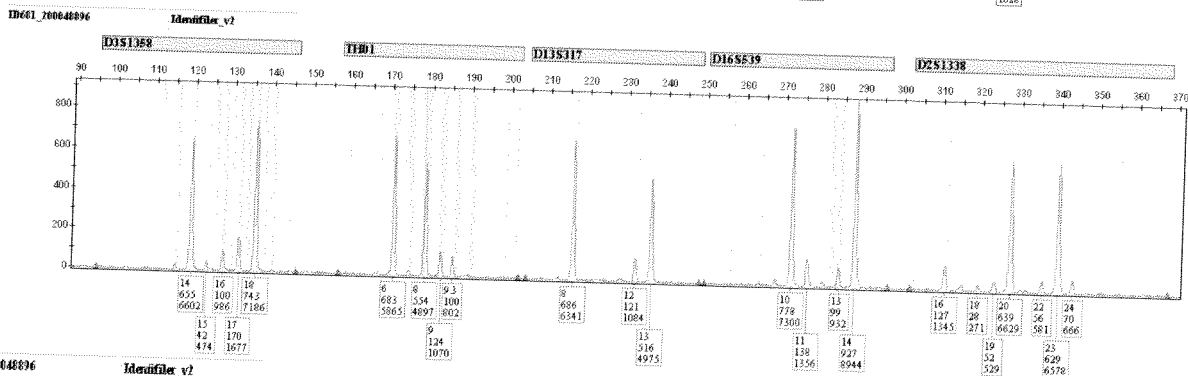
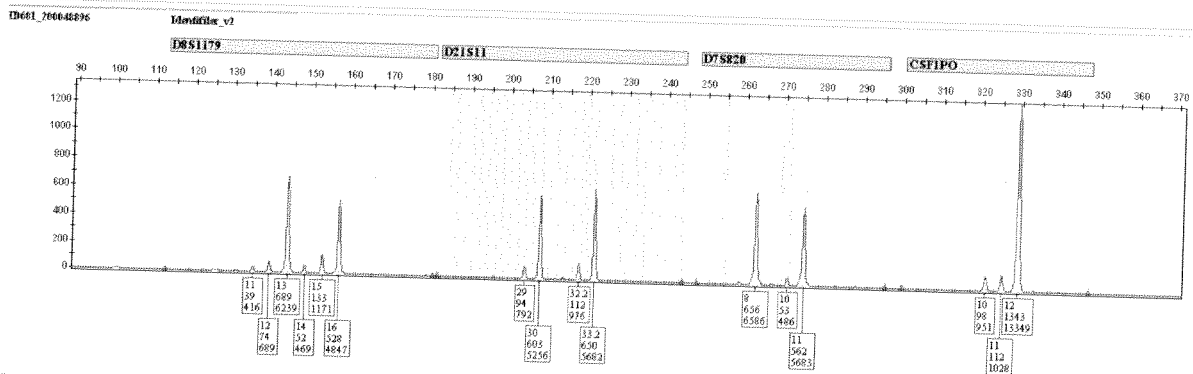




Al fine di valutare se l'interpretazione delle stutter nell'elettroferogramma allegato alla RTIGF sia stata effettuata, come affermato dalla CT, secondo gli “*standard internazionali*” e secondo quanto raccomandato dalla ISFG, è stato esaminato il tracciato elettroforetico, inviatoci dalla Dr.ssa Stefanoni,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

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

Si riporta di seguito il tracciato inviatoci in data 10 maggio 2011:

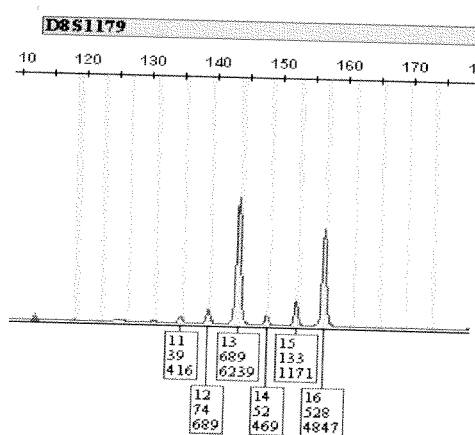


Campione ID 681 200048896 (Rep.165B – gancetti reggiseno)
 Legenda: Il riquadro posto sotto l'allele indica, in sequenza, i seguenti valori
 -ALLELE- ALTEZZA PICCO IN RFU- AREA PICCO-

Alla luce dei dati numerici relativi all'altezza dei picchi presenti nell'elettroferogramma, e chiariti i criteri per definire le stutter, si possono formulare le seguenti osservazioni in merito all'interpretazione dei picchi effettuata dalla CT.

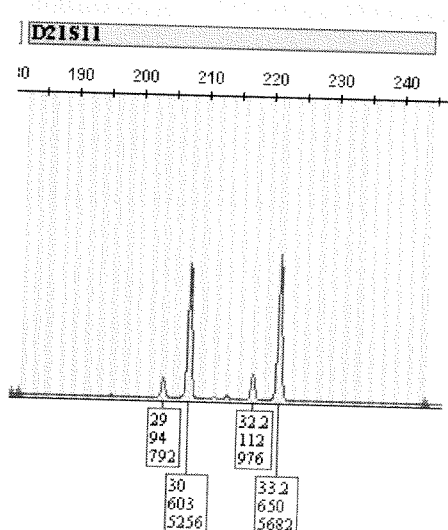
Verranno analizzati di seguito alcuni marcatori del DNA, già oggetto di contestazione, riportando per ognuno di essi i valori numerici relativi all'altezza dei picchi, altezza che verrà utilizzata per valutare, secondo le Raccomandazioni della Società Internazionale di Genetica Forense (ISFG), se i picchi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

D8S1179



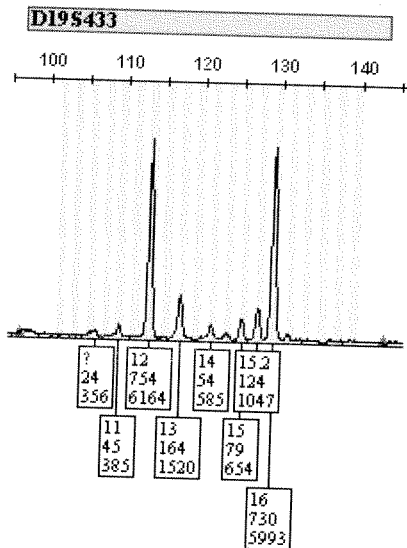
Picco 13 ↑ 689 = allele
 Picco 14 ↑ 52 (39.09% dell'allele 15) = allele
 Picco 15 ↑ 133 (25.18% dell'allele 16) = allele
 Picco 16 ↑ 528 = allele

D21S11



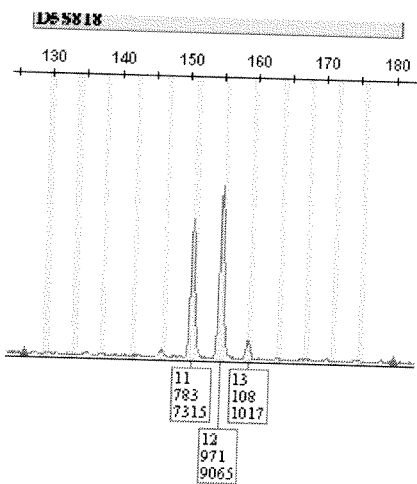
Picco 29 ↑ 94 (15.58% dell'allele 30) = allele
 Picco 30 ↑ 603 = allele
 Picco 32.2 ↑ 112 = allele
 Picco 33.2 ↑ 650 = allele

D19S433



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

D5S818



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

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

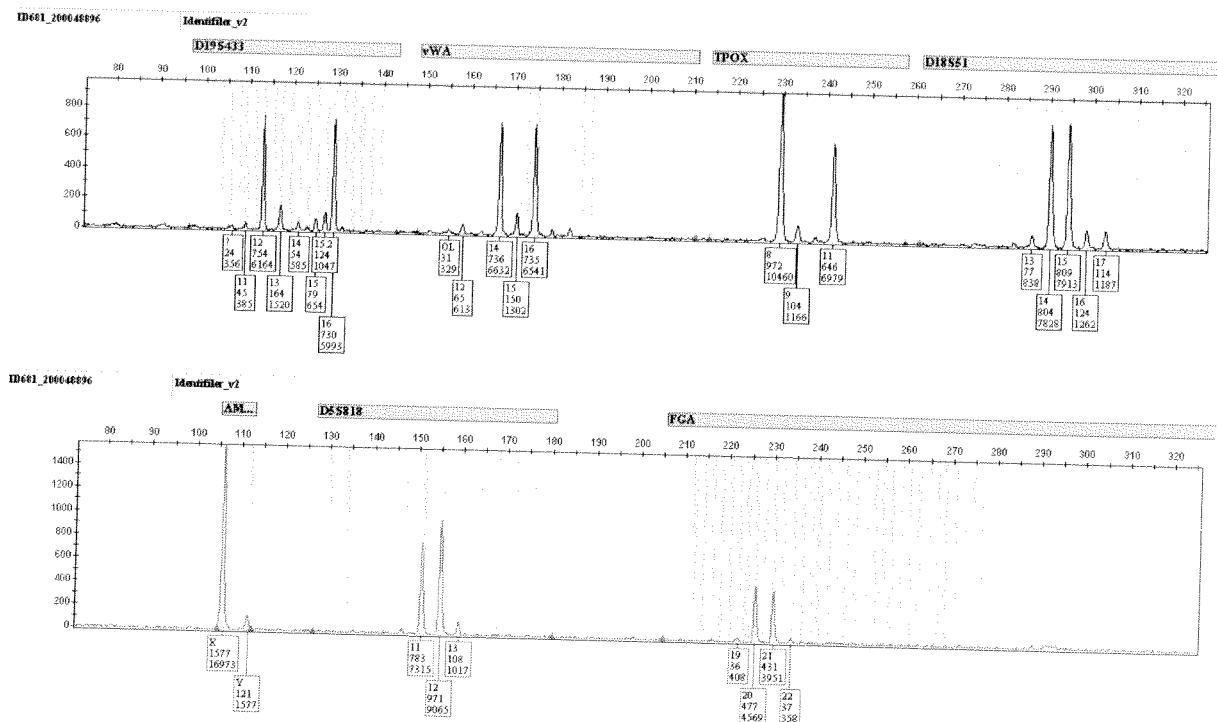
In merito alla valutazione delle stutter si ribadisce che la CT pur avendo affermato che ci sono **“...comunque delle raccomandazioni per l'interpretazione corretta quindi sono delle linee guida...”** (GUP 04.10.2008, pag.102), in pratica non ha applicato correttamente le raccomandazioni esplicitate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



Pertanto, l'interpretazione dell'elettroferogramma è ben più complessa ed articolata di quella riportata nella RTIGF. Infatti, anche qualora si volesse limitare, arbitrariamente, l'applicazione della Raccomandazione 6 a quei picchi in posizione stutter al di sopra della soglia di 50 RFU, *si evidenzia comunque un profilo dovuto alla commistione di più individui costituiti da un contributore maggiore e da più contributori minori*, come riassunto nella tabella che si riporta di seguito:

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

AMPLIFICAZIONE DEL CROMOSOMA Y

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

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

Si ricorda che, per quanto riguarda il kit *AmpFlSTR Yfiler*, le indicazioni fornite dalla ditta produttrice, per una corretta amplificazione, sono le seguenti:

- *N. campioni x 9.2 µl di AmpFlSTR Yfiler PCR Reaction Mix;*
- *N. campioni x 0.8 µl di AmpliTaq Gold DNA Polymerase;*
- *N. campioni x 5 µl di AmpFlSTR Yfiler Primer Set;*
- *DNA 10 µl;*
- *Volume finale della reazione 25 µl;*

Il range di concentrazione del DNA consigliato dalla ditta produttrice è pari a 0.5-1.00 ng/µl.

Tenuto conto di quanto riportato nella RTIGF (pag. 202) e dall'assenza di annotazioni specifiche nel SAL si deve ritenere che non sia stata apportata alcuna modifica alle indicazioni fornite dalla ditta produttrice del kit circa i volumi da impiegare per la reazioni di amplificazione, ovverosia che sia stato impiegato un volume totale di 25 µl costituito rispettivamente da:

15 µl di Mix di amplificazione + 10 µl di DNA estratto per l'Yfiler.

Pertanto, il quantitativo di DNA utilizzato per la reazione PCR è stato di 1.15 ng (0.115 ng/ µl x 10 µl=1.15 ng).

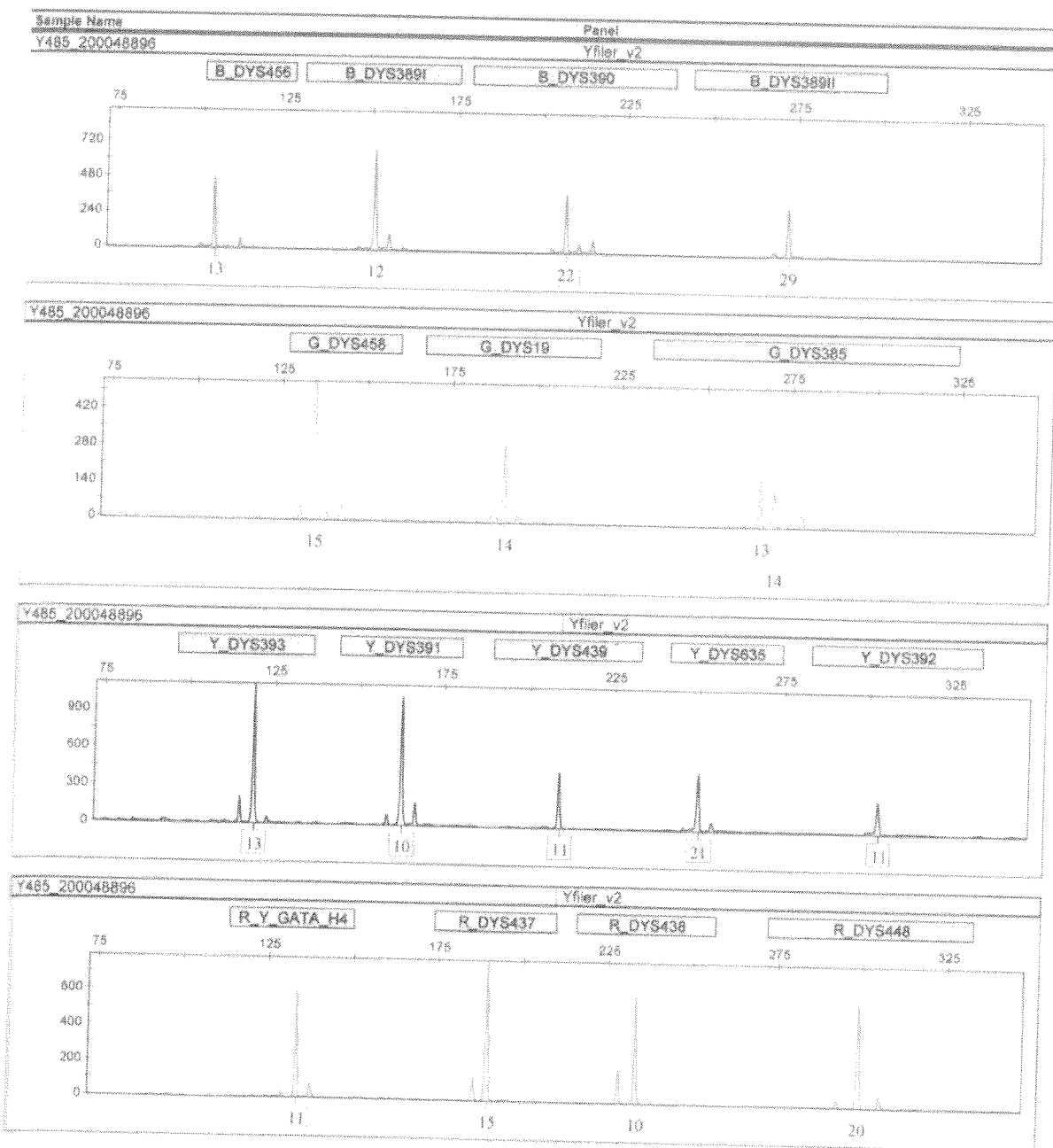
Quindi un quantitativo di DNA che rientra nel range suggerito dai kit (0.5-1.00 ng/μl di DNA templato).

ELETTROFORESI CAPILLARE

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

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

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



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

Si riporta di seguito la tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dalla CT per il cromosoma Y:

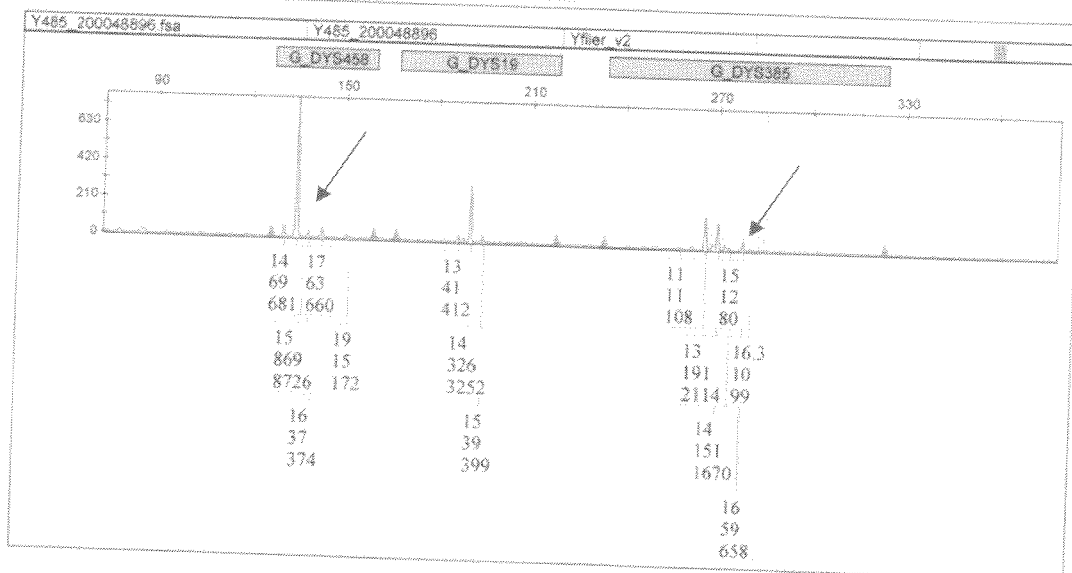
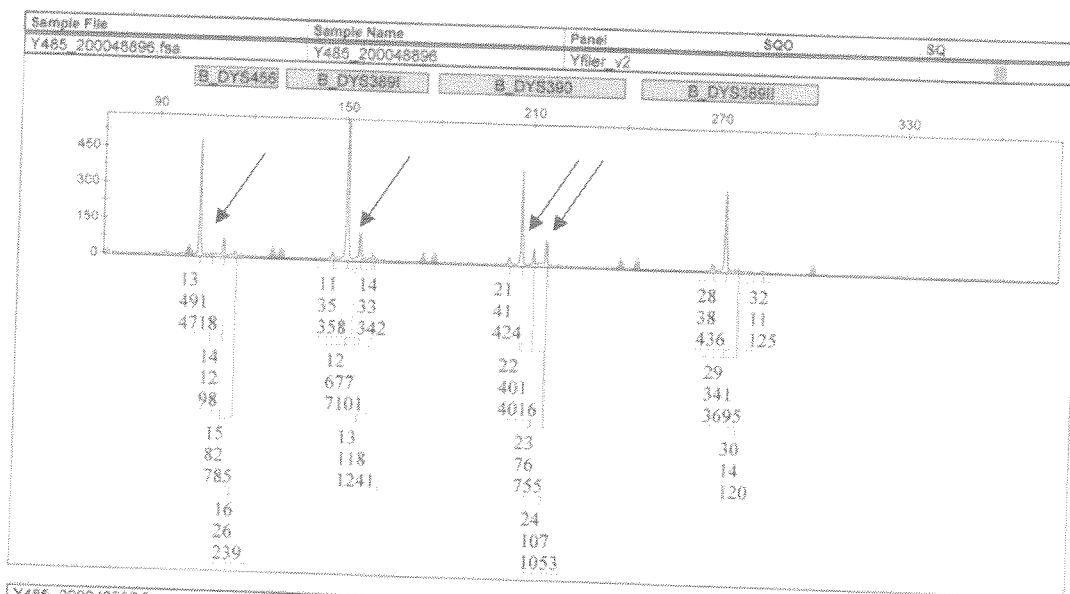
	SOLLECITO R.
locus genetico	aplotipo Y traccia B
DYS456	13
DYS389I	12
DYS390	22
DYS389II	29
DYS458	15
DYS19	14
DYS385	13, 14
DYS449	13
DYS426	10
DYS448	11
DYS439	21
DYS437	11
YGATAH4	11
DYS437	15
DYS438	10
DYS448	20

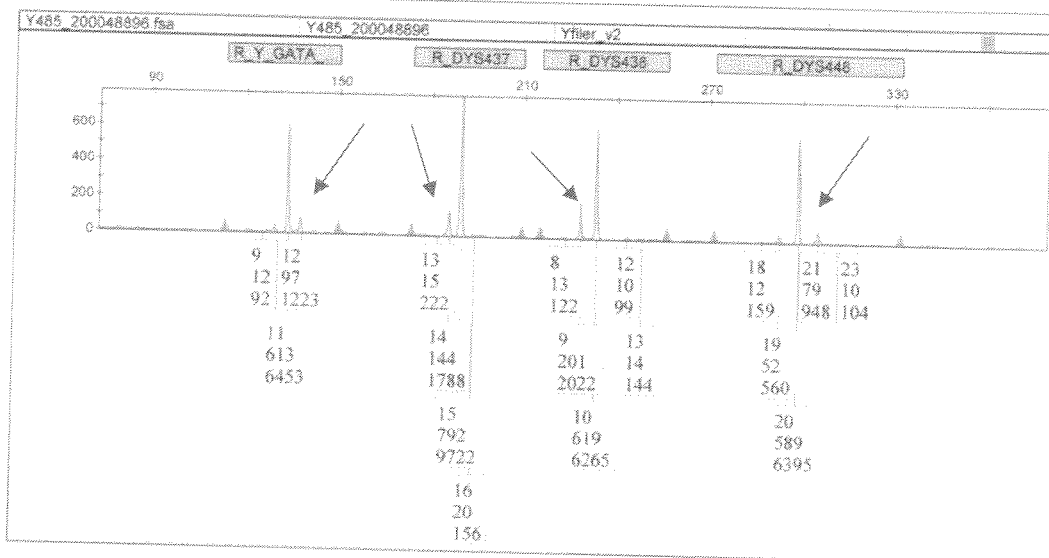
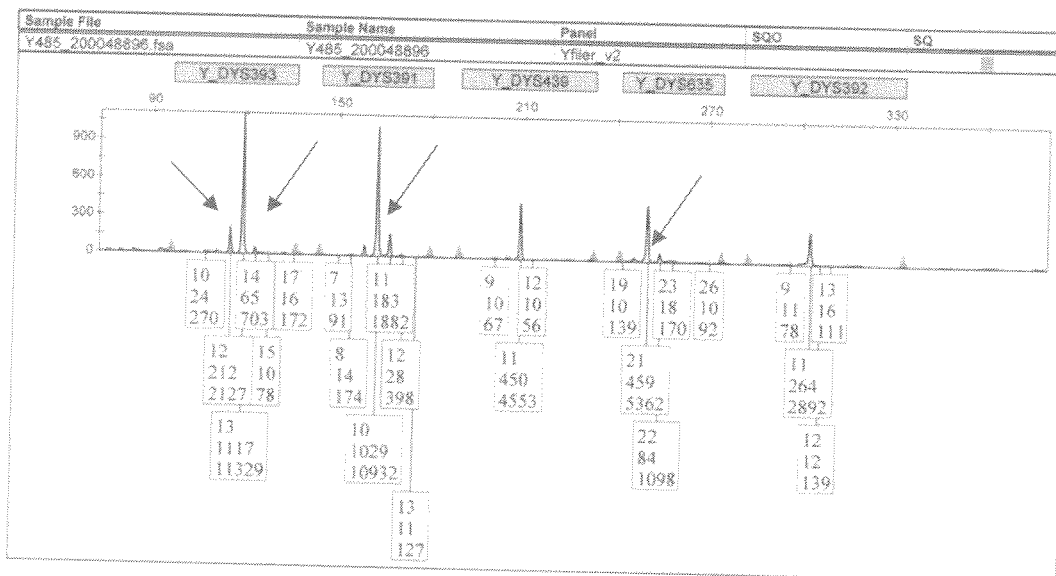
Successivamente ci è stato fornito dalla Dr.ssa Stefanoni il tracciato elettroforetico (*mag 11,2011 04:08 PM*) della medesima corsa ma con le indicazioni relative all'altezza e alle aree di tutti i picchi presenti nel tracciato predetto.

Alla luce dei valori numerici relativi all'altezza dei picchi presenti nell'elettroferogramma si possono formulare le seguenti osservazioni in merito all'interpretazione degli alleli effettuata dalla CT.

Si evince dall'osservazione dell'elettroferogramma che, oltre ai picchi indicati nella RTIGF come alleli, sono presenti picchi ulteriori con altezze che superano la soglia di 50 RFU i quali, pur non essendo in posizione stutter, non sono stati presi in considerazione dalla CT.

Si riportano di seguito gli elettroferogrammi ove sono segnalati con una freccia i picchi non riportati nella RTIGF:





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

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

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

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

Quindi si concorda sull'affermazione della Dr.ssa Stefanoni circa *“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”*.

Riteniamo che la CT sia giunta a questa conclusione restrittiva a due soli individui (Meredith Kercher e Raffaele Sollecito) a seguito di una non corretta interpretazione degli elettroferogrammi degli STRs autosomici per aver disatteso le raccomandazioni della ISFG circa la corretta interpretazione delle misture (***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*) ed il punto 7 delle predette raccomandazioni ISFG (**Punto n. 7** Drop-out: *“La considerazione sul drop-out è analoga alle stutters”*). Raccomandazioni che, qualora fossero state seguite, avrebbero consentito di giungere alla conclusione che nella traccia oltre al profilo della vittima (maggiore contributore) erano presenti più contributori minori.

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

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

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

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

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

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

Inoltre, **la documentazione circa la possibile contaminazione del reperto, sia prima che dopo il recupero, è inadeguata.** La semplice negatività del controllo di amplificazione, peraltro non allegata, non è sufficiente a escludere contaminazioni ambientali del reperto precedenti l'estrazione e amplificazione del DNA. Infatti, **sarebbe stato necessario ottenere i profili allelici presenti nel contesto dell'ambiente.**

Il reperto fu recuperato sul pavimento, ove era prevedibilmente a contatto con polvere ambientale che, in ambienti chiusi frequentati da esseri umani, è composta in larga misura da elementi (cellule, peli, capelli, etc) di origine umana.

Si è dimostrato che la polvere di ambienti chiusi può contenere decine di microgrammi di DNA per grammo, dipendendo il quantitativo di DNA dall'intensità della frequentazione degli individui e dalla quantità di polvere che si accumula nello specifico ambiente.

E' stato ampiamente dimostrato che la presenza di polvere ambientale costituisce una significativa sorgente di contaminazione in investigazioni forensi, poiché il DNA derivante da tale polvere può evidenziarsi sotto forma di alleli in analisi di polimorfismi.

Il rischio di interpretare non correttamente tali contaminanti ambientali da polvere può essere minimizzato solo avendo l'accortezza di istituire *procedure di controllo estremamente stringenti*, ivi inclusa *l'analisi di estratti da tamponi di cotone sterile imbevuti di buffer sterile passati sulle superfici ambientali per prelevare campioni di polveri* (Toothman MH. et al., 2008).

In ogni caso, i profili allelici ottenuti da polvere ambientale, o da campioni contaminati con polvere ambientale, possono essere ritenuti indicativi degli individui che hanno frequentato quel determinato ambiente.

Tuttavia, è stato evidenziato dai predetti Autori, che la correlazione diretta tra frequentazione umana e livelli di polvere con la quantità e la qualità del DNA umano in essa presente è difficile da generalizzare a causa di potenziali effetti di altri fattori non controllati. Infatti, variabili ambientali, inclusa la luce, il calore e l'umidità possono degradare il DNA, e residui di detergenti (ad es. candeggina) possono distruggere il DNA. Inoltre, i sistemi di ventilazione possono fungere da veicolo di trasferimento della polvere tra le diverse stanze introducendo DNA proveniente da individui che non necessariamente hanno frequentato uno specifico ambiente (Toothman MH. et al., 2008).

Per avanzare ipotesi interpretative, sarebbe stato necessario, a nostro avviso, procedere ad amplificazioni multiple sul reperto 165B i cui alleli avrebbero dovuto essere comparati con gli alleli ottenuti da amplificati multipli effettuati su estratti di multipli prelievi di polvere ambientale.

Solo alleli riscontrati sul Rep.165B, e non sulla polvere ambientale, avrebbero potuto essere considerati di possibile rilievo indiziario, e ciò indipendentemente dall'altezza e dall'area dei picchi ad essi relativi. Non essendo ciò stato fatto, i profili allelici del reperto 165B non sono, a nostro avviso, da considerarsi probatori.

Inoltre, tenuto conto di quanto precedentemente 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, le dichiarazioni rese in udienza **si ritiene che nei sopralluoghi effettuati in Via della Pergola non siano stati applicati i corretti protocolli e procedure universalmente dettate, anche al fine di scongiurare il rischio di contaminazione ambientale.**

Ed in particolare si sono evidenziate palesi carenze nei seguenti punti:

- **Non risulta che siano state delimitate specifiche aree per il contenimento della contaminazione**, ovvero si è provveduto solo al livello più esterno non preoccupandosi dei livelli di sicurezza più interni ivi compresa la “*crime scene*”; questo comporta, comunque, la possibilità di una contaminazione data dall’eventuale trasferimento tra gli ambienti interni dell’abitazione, ivi compresa la stanza in cui fu trovato il corpo di Meredith Kercher (*crime scene*).
- Relativamente a quanto appena esposto **non risulta che si sia provveduto a creare un corridoio di sicurezza per l’accesso interno con criteri di anticontaminazione fra i vari ambienti**; ed in effetti su questi due primi punti la stessa Dott.ssa Stefanoni ha affermato nella deposizione del 4/10/2008 a pag. 38-39 : “... avendo noi i calzari, essendo entrati più volte ovviamente per le attività di sopralluogo in quella stanza ed essendo copioso il sangue Ecco il pavimento la seconda volta sicuramente era più sporco, tra virgolette, cioè il sangue si era effettivamente diffuso rispetto all’inizio del sopralluogo... è questo il punto, cioè la contaminazione è da intendersi come un qualcosa di esogeno portato dall’esterno all’interno sulla scena del crimine ... l’unica cosa che è potuta succedere in generale in qualunque sopralluogo è quella di trasferire un qualcosa che però già c’è se questo qualcosa è stato spostato, questo non si può escludere però sicuramente dall’esterno cioè non è stato portato nulla ... D. Quindi al massimo lei può ipotizzare uno spostamento di un DNA già presente in loco ? ... R. Sì...”. Ed ancora a pag. 83-84: “... D. Invece i calzari non vengono cambiati mentre si gira per la casa ? R. No generalmente no... D. Quindi sostanzialmente chi entrava in una stanza e poi usciva poteva rientrare nella stanza? R. Si poteva rientrare...D. ... si entrava e si usciva dalle stanze senza che vi fosse il cambio di calzari... ? R. Sì... ”.
- **Non risulta che si sia predisposto idoneo luogo per lo stoccaggio del materiale usa e getta** utilizzato durante i sopralluoghi (si è anche utilizzato il cestino della spazzatura presente in casa Sollecito); in tal senso si sottolinea il possibile aumento di rischio contaminazione per la giacenza di materiale utilizzato e quindi contaminato.
- **Risultano carenze nella registrazione degli accessi nell’area del crimine**, ovvero non si è tenuto correttamente un registro di chi è entrato negli ambienti. Ma non solo; si è verificato accesso, nell’immediatezza dell’evento, da parte del personale del 118 senza alcun indumento protettivo, personale che fra l’altro ha toccato e rimosso

anche il piumone che copriva il corpo di Meredith (deposizione Napoleoni Monica udienza del 27/2/2009, pag. 228-229): “... R. io ho fatto un passo all'interno della stanza mentre la dottoressa del 118 scopriva il cadavere PM: ...quando è entrata aveva la tuta ? R: ... no, io ho indossato dei calzari e dei guanti sterili... PM: ecco tutti quelli che sono entrati avevano questa...? R: ... sì sì certo. Sì sì adesso tranne no il personale del 118...”. Ed ancora; si è ritenuto superflua la registrazione degli accessi (pag. 262-263): “... Avvocato : ... questa vostra presenza sa se è stata registrata ? R: che vuol dire registrare ?... Avvocato: è stato annotato questo vostro ingresso ? Perché io non lo trovo da nessuna parte ? R: il nostro ingresso non è stato annotato perché noi siamo andati con il Pubblico Ministero. Che faccio, annoto io se c'è un Pubblico Ministero ?... Però essendoci il Pubblico Ministero non annoto io né i miei colleghi...”.

- **Non sono stati utilizzati continuativamente e correttamente gli indumenti specifici anticontaminazione** ed in questo rientrano anche guanti, calzari, mascherine e copertura capo. Risultano, infatti, presenti, finanche nella scena del crimine, persone che indossano unicamente i calzari ed un paio di guanti, ovvero si trovano nella stanza di Meredith normalmente vestiti e, si sottolinea ancora, come personale del 118 sia entrato senza alcuna precauzione ed abbia anche movimentato la scena del crimine (vedasi riferimento precedente trascrizione); risulta anche come vi sia stato personale investigativo che non indossava correttamente protezione del capo e mascherina.

- **Non risulta sia stata data alcuna indicazione del corretto utilizzo dei guanti usa e getta**, ed in particolare sul loro cambio al momento della repertazione su ciascun oggetto di campionamento.

- **Non risulta che siano stati cambiati i calzari all'interno dell'abitazione** (vedasi riferimenti precedenti relativi alle trascrizioni) comportando l'eventualità di una possibile contaminazione. In tal senso si sottolinea quanto precedentemente esposto relativamente al *pavimento che: “... risulta essere maggiormente depositario di evidenze ma al tempo stesso è anche il più grande potenziale di contaminazione...”*. *Si ricorda che il gancetto è stato regolarmente osservato e filmato nel primissimo sopralluogo ed è rimasto nel pavimento per ben 46 gg, e come vi siano stati in questo jatus temporale ulteriori sopralluoghi e movimentazione di oggetti”*.

- **Non risulta sia stato corretto il protocollo durante il campionamento dei reperti**, ovvero mancato uso delle pinzette usa e getta, non asciugatura preventiva delle tracce biologiche, prelievo su aree di piccola concentrazione, mancato campionamento

di controllo, mancato avvolgimento in carta per alcuni campioni, agitato campionamento nell'aria.

- **I reperti sono stati manipolati da più persone senza cambio di guanti,** prelevati senza uso di pinzette idonee (Deposizione Dott.ssa Stefanoni del 4/10/2008 pag. 39 -40); “...D: ... quindi al massimo lei può ipotizzare uno spostamento di un DNA già presente in loco ? R. Sì.... D: ... per quello che riguarda quindi il ragionamento che lei ha appena fatto questo vale anche nel descrivere il passaggio di mano che viene pur sempre fotografato o meglio filmato Perché questo lembo di stoffa con i due gancetti passa dalla mano di un operatore alla mano di un secondo operatore ? R: Però se i guanti sono puliti è assolutamente ininfluyente”.

- **Risulta che la posizione iniziale di riscontro sul pavimento del gancetto non sia stata più la stessa dopo 46 gg;** ed inoltre è stato toccato successivamente più volte da più operatori, **dopo essere stato raccolto dal pavimento, e riposizionato nuovamente al suolo;** disatteso quindi quanto previsto nelle Tecniche di Investigazione della Scena del Crimine (*Techniques of Crime Scene Investigation, Barry Fischer – CRC ed.2003*), ovvero: **Registrare accuratamente la posizione degli oggetti prima di rimuoverli (attenzione: non tentare di rimettere gli oggetti nella posizione originaria).**

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

Da quanto precedentemente esposto si possono trarre le seguenti considerazioni sui procedimenti analitici eseguiti sul Rep.165B.

- In merito alla natura del materiale prelevato dal predetto reperto **non sussistono elementi scientificamente probanti la presenza di presunte cellule di sfaldamento**. Pertanto l'ipotesi formulata dalla CT circa la natura del materiale prelevato sul Rep.165B è del tutto arbitraria in quanto non supportata da riscontri obiettivi;
- Dal tracciato elettroforetico relativo agli **STRs autosomici**, si può affermare che relativamente ai marcatori *D8S1179*, *D21S11*, *D19S433*, *D5S818* vi è stata una **erronea interpretazione dei picchi presenti nel tracciato elettroforetico** in quanto sono stati considerati stutter picchi la cui altezza era oltre 50 RFU (*D19S433* picco 14↑54) o superavano la soglia del 15% dell'allele maggiore (*D8S1179*, *D21S11*, *D5S818*) o non erano in posizione stutter (*D5S818*) e che, pertanto, dovevano essere considerati alleli. Da ciò deriva che nel DNA estratto dal Rep.165B sono presenti più contributori minori che non sono stati evidenziati dalla CT;
- Dal tracciato elettroforetico relativo ai marcatori del **cromosoma Y**, oltre ai picchi indicati nella RTIGF come alleli, si evince la **presenza di picchi ulteriori** con altezze che superano la soglia di 50 RFU che, pur non essendo in posizione stutter, non sono stati presi in considerazione dalla CT. Da ciò deriva che nel DNA estratto dal Rep.165B sono presenti più contributori minori, a conferma di quanto già osservato negli elettroferogrammi degli STRs autosomici e che non sono stati evidenziati dalla CT;
- Riteniamo che la CT sia giunta alla conclusione restrittiva (presenza di due soli individui: la vittima e Raffaele Sollecito) a seguito di una non corretta interpretazione degli elettroferogrammi degli STRs autosomici per aver **disatteso le raccomandazioni della ISFG** circa la corretta interpretazione delle misture, raccomandazioni che, qualora fossero state seguite, avrebbero consentito di giungere alla conclusione che nella traccia oltre al profilo della vittima (maggiore contributore) erano presenti più contributori minori. Pertanto, 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”* 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.

CONCLUSIONI

Sulla base delle considerazioni dianzi espresse riteniamo di poter così rispondere ai quesiti posti in sede di conferimento dell'incarico:

“Esaminati gli atti di causa e svolte le indagini tecniche ritenute necessarie accerti il Collegio dei periti :

1. se è possibile, mediante nuovo accertamento tecnico, l'attribuzione ed il grado di attendibilità dell'eventuale attribuzione del DNA presente sui reperti 165b (gancetto del reggiseno) e 36 (coltello)”

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

2. *“se non è possibile, procedere a nuovo accertamento tecnico, valuti, in base agli atti, il grado di attendibilità degli accertamenti genetici eseguiti dalla Polizia scientifica sui reperti suddetti, con riferimento anche ad eventuali contaminazioni”*

Esaminati gli atti ed i documenti di causa, presa visione delle indagini di laboratorio eseguite sul Rep. 36 (coltello) e sul Rep. 165B (gancetti di reggiseno), si possono formulare le seguenti conclusioni:

REPERTO 36 (COLTELLO)

Relativamente agli accertamenti genetici eseguiti sulla **traccia A** (impugnatura del coltello) **si concorda con la conclusione cui è giunta la CT circa l'attribuzione del profilo genetico ottenuto da tale campionatura a Knox Amanda Marie.**

Relativamente alla **traccia B** (lama del coltello) riteniamo che **gli accertamenti tecnici effettuati non siano attendibili** per i seguenti motivi:

1. **non sussistono elementi scientificamente probanti la natura ematica della traccia B (lama del coltello);**
2. **dai tracciati elettroforetici esibiti si evince che il campione indicato con la lettera B (lama del coltello) era un campione Low Copy Number (LCN) e, in quanto tale, avrebbero dovuto essere applicate tutte le cautele indicate dalla Comunità Scientifica Internazionale;**
3. **tenuto conto che non è stata seguita alcuna delle raccomandazioni della Comunità Scientifica Internazionale, relativa al trattamento di campioni Low Copy Number (LCN), non si condividono le conclusioni circa la certa attribuzione del profilo rilevato sulla traccia B (lama del coltello) alla vittima Kercher Meredith Susanna Cara poiché il profilo genetico, così come ottenuto, appare inattendibile in quanto non supportato da procedimenti analitici scientificamente validati;**
4. **non sono state seguite le procedure internazionali di sopralluogo ed i protocolli internazionali di raccolta e campionamento del reperto;**
5. **non si può escludere che il risultato ottenuto dalla campionatura B (lama del coltello) possa derivare da fenomeni di contaminazione verificatasi in una qualunque fase della repertazione e/o manipolazione e/o dei processi analitici eseguiti.**

REPERTO 165B (GANCETTI DI REGGISENO)

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

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

I PERITI

Prof. Carla Vecchiotti



Prof. Stefano Conti



CORTE DI APPELLO DI PERUGIA
DEPOSITO IN CANCELLERIA

da *prof. Stefano Conti*
Perugia, *29-6-2011*

RESPONSABILE DELLA SEZIONE PENALE
CANCELLIERE (2)
(D.ssa Francesca Romana Marsella)